

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEVE JASSON FERNANDES ALVES

EMIÇÃO DE GASES DO EFEITO ESTUFA E MICROBIOTA DO SOLO  
AFETADOS PELO INIBIDOR DA NITRIFICAÇÃO DICIANODIAMIDA EM  
PLANTIOS DE MILHO E EUCALIPTO EM AMBIENTE CONTROLADO

CURITIBA

2021

STEVE JASSON FERNANDES ALVES

EMIÇÃO DE GASES DO EFEITO ESTUFA E MICROBIOTA DO SOLO  
AFETADOS PELO INIBIDOR DA NITRIFICAÇÃO DICIANODIAMIDA EM  
PLANTIOS DE MILHO E EUCALIPTO EM AMBIENTE CONTROLADO

Tese de Doutorado a ser apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica),  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alves, Steve Jasson Fernandes.

Emissão de gases do efeito estufa e microbiota do solo afetados pelo inibidor da nitrificação dicianodiamida em plantios de milho e eucalipto em ambiente controlado. / Steve Jasson Fernandes Alves. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Leonardo Magalhães Cruz.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Gases do efeito estufa. 2. Nitrificação. 3. Inibidores químicos. 4. Solos. 5. Microbiota. I. Título. II. Cruz, Leonardo Magalhães. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **STEVE JASSON FERNANDES ALVES** intitulada: **Emissão de gases do efeito estufa e microbiota do solo afetados pelo inibidor da nitrificação dicianodiamida em plantios de milho e eucalipto em ambiente controlado**, sob orientação do Prof. Dr. LEONARDO MAGALHÃES CRUZ, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 05 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica

11/02/2021 14:26:33.0

LEONARDO MAGALHÃES CRUZ  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/02/2021 12:28:45.0

JOSILÉIA ACORDI ZANATTA  
Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica

10/02/2021 14:28:38.0

RAFAEL MAZER ETTO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

10/02/2021 14:48:00.0

ANA CLAUDIA BONATTO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/04/2021 09:44:02.0

ROSE ADELE MONTEIRO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 73304

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 73304

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de conhecer o Setor de Ciências Bioquímicas e todo o pessoal que dele faz parte. Agradeço ao meu orientador Dr. Leonardo Magalhães Cruz pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e pela amizade. Obrigado por todos os ensinamentos passados, por toda a paciência, pelo auxílio em todas as reuniões e todas as conversas paralelas pelos corredores que foram essenciais não somente para esta tese, mas também para a minha formação científica.

Agradeço aos doutores Josiléia Acord Zanatta e Marcos Fernando Gluck Rachawl pela oportunidade de desenvolver o experimento na Embrapa Florestas, e também a toda a equipe que compõe o quadro de colaboradores desta instituição que é referência em pesquisa no Brasil e que sempre me deram suporte.

Agradeço aos professores Drº Emanuel Maltempi de Souza e Drº Marcelo Muller dos Santos pelas correções dos relatórios e da primeira versão da tese, todas as sugestões contribuíram para o enriquecimento e desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos demais professores do grupo pelas discussões e contribuições durante as reuniões, as quais foram de suma importância para a elaboração de todo o trabalho em especial a Drª Rose Adele Monteiro pela amizade e conselhos dados no decorrer do curso. Agradeço aos técnicos Roseli Prado e Bruna pela amizade e aprendizado no preparo das mais variadas soluções e meios de cultura, atenção, auxílio e carinho em todos os momentos.

Ao departamento de bioquímica e biologia molecular e à coordenação do curso de pós-graduação em bioquímica que permitiram a realização deste trabalho.

A todas as instituições financiadoras, a CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço ao Eduardo Balsanelli e Valter Baura pelos sequenciamentos e também por todo profissionalismo e paciência no auxílio de algumas dúvidas.

Agradeço aos meus familiares por todo apoio e compreensão, a minha mãe Sandra e meu pai Francisco ao meu irmão Michael e minha amada esposa Cristiane por serem meu sustento nesta longa jornada, a minha amada avó Alcina e avô Remi (in memoriam).

“Todo herói um dia vê sua força se esfacelar. Todo gigante por maior que seja, em algum momento se apequena. Todo pensador depara-se, cedo ou tarde, com suas loucuras. E todo mestre , em sua caminhada, se torna um menino diante do inexplorado”

Augusto Cury

## RESUMO

A contribuição dos fertilizantes nitrogenados para o aumento excessivo dos gases potencializadores do efeito estufa vem sendo bastante discutida, devido ao uso incorreto dos fertilizantes na agricultura e a baixa eficiência dos fertilizantes nitrogenados. Uma forma de reduzir estas emissões excessivas dos gases potencializadores do efeito estufa é a utilização de inibidores de nitrificação que auxiliam na permanência de isótopos de nitrogênio mais estáveis no solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do inibidor de nitrificação dicianodiamida na microbiota do solo com diferentes coberturas vegetais: “Solo-nu”, “Milho”, “Eucalipto” e o poder de inibição pelo fluxo dos gases  $N_2O$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$ . O experimento foi implantado em casa de vegetação em vasos contendo Cambissolo Húmico de textura média por 185 dias, foi realizada a leitura da concentração dos Gases e retiradas de amostras do solo para análise da microbiota. O DNA metagenômico foi extraído, sendo utilizado para amplificação da região variável V4 do gene 16S rRNA, as sequências foram analisadas pelo software Qiime2. Foi possível observar a eficácia do inibidor de nitrificação ao longo dos 185 dias amostrados reduzindo em até 95% a emissão acumulada de  $N-N_2O$ , 12% de  $C-CO_2$  e 10% de emissão  $C-CH_4$  em relação aos tratamentos que não continham DCD, foi possível observar através a influência do tempo amostrado e da cobertura sobre os filos presentes em cada amostra. Foi possível observar que o solo contendo a cobertura “Eucalipto” apresentou maior abundância de filos, podendo ser notado também que os filos em comum presentes nos três diferentes tipos de cobertura são *Proteobacterias*, *Actinobacterias*, *Firmicutes* não diferindo para as variáveis +DCD e -DCD. Os genes mais abundantes encontrados nas amostras através da predição gênica foram os responsáveis pelo processo da desnitrificação. A prática de aplicação de DCD em culturas agrícolas e florestais tende a ser vantajosa, em relação do ponto de vista ambiental, reduzindo consideravelmente a emissão de gás com grande potencial para efeito estufa. O inibidor dicianodiamida não altera a saúde do solo, mantendo a estrutura da comunidade microbiana inalterada e demonstra ser uma ferramenta eficiente para redução do potencial de aquecimento global parcial (PAGp).

Palavras chave: Gases do efeito estufa, Inibidores de nitrificação, Cobertura do Solo, Microbiota do Solo

## ABSTRACT

The contribution of nitrogen fertilizers to the excessive increase in greenhouse effect gases has been widely discussed, due to the incorrect use of fertilizers in agriculture and the low efficiency of nitrogen fertilizers. One way to reduce these excessive exemptions from greenhouse gases is the use of nitrification inhibitors that help the more stable nitrogen isotopes remain in the soil. The objective of this work was to evaluate the effect of the application of the nitrification inhibitor dicyandiamide in the microbiota of the soil with different vegetal coverings: "Bulk Soil", "Maize", "Eucalyptus" and the inhibiting power by the flow of  $N_2O$ ,  $CO_2$  gases and  $CH_4$ . The experiment was implanted in a greenhouse in pots containing Humic Cambisol of medium texture for 185 days, the reading of the concentration of the Gases was carried out and samples of the soil were taken for analysis of the microbiota. The metagenomic DNA was extracted and used to amplify the variable region V4 of the 16S rRNA gene, as sequences were analyzed by the Qiime2 software. It was possible to observe the effectiveness of the nitrication inhibitor over the 185 days sampled in up to 95% the accumulated emission of  $N-N_2O$ , 12% of  $C-CO_2$  and 10% of emission  $C-CH_4$ . In relation to the treatments that did not contain DCD, it was possible to observe through the sampled time and the coverage of the philosophers in each sample. It was possible to observe that the soil containing an "Eucalyptus" cover presented a greater phylum source, and it can also be noted that the common phyla present in the three different types of cover are *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, not differing for the variables + DCD and -DCD. The most abundant genes found in the samples through gene prediction were responsible for the denitrification process. The practice of applying DCD in agricultural and forestry crops tends to be advantageous, in relation to the environmental point of view, considerably reducing the emission of gas with great potential for greenhouse effect. The inhibitor dicyandiamide does not change the health of the soil, maintaining the microbial community structure unchanged and proves to be an effective tool for reducing the partial global warming potential (PAgP).

Keywords: Greenhouse gases, Nitrification inhibitors, Soil cover, Soil microbiota

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Ciclo do nitrogênio.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 14 |
| Figura 2 : Estrutura química dos principais inibidores de nitrificação.....                                                                                                                                                                                                                         | 20 |
| Figura 3 Representação esquemática ação inibitória dos inibidores de nitrificação nos processos de nitrificação e desnitrificação no solo .....                                                                                                                                                     | 21 |
| Figura 4 Vista superior do espaço amostral.....                                                                                                                                                                                                                                                     | 26 |
| Figura 5. Disposição das mudas no centro do vaso. ....                                                                                                                                                                                                                                              | 26 |
| Figura 6. Aparelho Picarro G2508 .....                                                                                                                                                                                                                                                              | 27 |
| Figura 7 Organograma de análises realizadas pelo programa qiime 2. ....                                                                                                                                                                                                                             | 32 |
| Figura 8 Fluxo de N- N <sub>2</sub> O medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.....                                                                                                                                            | 34 |
| Figura 9 Fluxos de C-CO <sub>2</sub> medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.....                                                                                                                                             | 35 |
| Figura 10 Fluxos de CH <sub>4</sub> medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.....                                                                                                                                              | 36 |
| Figura 11 Emissão Acumulada do Gás N <sub>2</sub> O. medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação. ....                                                                                                                            | 37 |
| Figura 12 Emissão Acumulada do Gás CO <sub>2</sub> medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação. ....                                                                                                                              | 39 |
| Figura 13 Acumulado do Gás CH <sub>4</sub> medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação. ....                                                                                                                                      | 40 |
| Figura 14 Altura das Plantas de Eucalipto ao longo dos 185 dias amostrados em casa de vegetação e submetido a tratamentos com DCD .....                                                                                                                                                             | 42 |
| Figura-15: Incremento médio mensal do Eucalipto e Peso seco do Eucalipto e Milho ao longo de 185 dias de cultivo em casa de vegetação e submetido a tratamentos com DCD. ....                                                                                                                       | 43 |
| Figura-16 . Distribuição das qualidades de bases por posição nas leituras de sequências amplicons do gene 16S RNA.....                                                                                                                                                                              | 45 |
| Figura 17 Distribuição de amostras para as sequências amplicons do gene 16S rRNA.....                                                                                                                                                                                                               | 47 |
| Figura 18 Curva de Rarefação das amostras de solo a partir das sequências de amplicons 16S rRNA em função da riqueza de OTU .....                                                                                                                                                                   | 48 |
| Figura 19 Figura 19 Significância Alfa, distribuição da diversidade alfa nas amostras .....                                                                                                                                                                                                         | 50 |
| Figura 20 Agrupamento de amostras de microbioma de solo submetido a tratamento com diferentes coberturas vegetais e aplicação de DCD a partir de distâncias de beta diversidade .....                                                                                                               | 52 |
| Figura 21 Identificação do filos bacterianos das bibliotecas metagenômicas baseado na taxonomia do gene 16S rRNA" .....                                                                                                                                                                             | 53 |
| Figura 22 Abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância no tratamento Solo nú. ....                                                                                                                                                                                           | 54 |
| Figura 23 Abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância no tratamento Eucalipto.....                                                                                                                                                                                          | 55 |
| Figura 24 Abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância no tratamento Milho.....                                                                                                                                                                                              | 56 |
| Figura 26 Agrupamento das amostras de solo com diferentes tipos de coberturas e tratamento com DCD em relação a beta diversidade, a partir das sequências amplicons do gene 16S rRNA. Análise de PCoA aplicada na matriz de distâncias entre amostras, calculada com a métrica de Bray-Curtis ..... | 57 |
| Figura 27 Diversidade dos genes responsáveis pelo processo de nitrificação-desnitrificação.....                                                                                                                                                                                                     | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

GEE

N<sub>2</sub>O

CH<sub>4</sub>

CO<sub>2</sub>

N

DCD

OTU's

ASV

IP

DAP

PAGp

GAZES DO EFEITO ESTUFA

Oxido Nitroso

Metano

Dióxido de Carbono

Nitrogênio

Dicianodiamida

Unidade taxonômica operacional

Variante de Sequência de Amplicon

Incremento Periódico

Dias após plantio

Potencial de Aquecimento Global Parcial

|       |                                                                |    |
|-------|----------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....                                               | 11 |
| 2     | OBJETIVOS .....                                                | 12 |
| 2.1.1 | Objetivo geral.....                                            | 12 |
| 2.1.2 | Objetivos específicos .....                                    | 12 |
| 3     | REVISÃO DE LITERATURA .....                                    | 13 |
| 3.1   | Gases do efeito estufa (GEE).....                              | 13 |
| 3.2   | Ciclo biogeoquímico do nitrogênio.....                         | 14 |
| 3.2.1 | Genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio .....      | 16 |
| 3.3   | Adubação nitrogenada em culturas agrícolas.....                | 17 |
| 3.4   | Inibidores de nitrificação .....                               | 19 |
| 4     | MATERIAL E MÉTODOS.....                                        | 24 |
| 4.1   | Coleta do solo.....                                            | 24 |
| 4.2   | Preparo e cultivo das plantas .....                            | 24 |
| 4.3   | Medidas de gases do efeito estufa .....                        | 26 |
| 4.4   | Medidas biométricas.....                                       | 29 |
| 4.5   | Coleta de amostras de solo e extração de DNA metagenômico..... | 29 |
| 4.6   | Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA .....           | 30 |
| 4.7   | Análise dos dados de sequência do gene 16S rRNA .....          | 30 |
| 4.8   | Análise de diversidade .....                                   | 31 |
| 5     | RESULTADOS e discussões .....                                  | 33 |
| 5.1   | Fluxo dos gases do efeito estufa .....                         | 33 |
| 5.2   | Emissão Acumulada dos Gases coletados.....                     | 37 |
| 5.3   | Medidas biométricas.....                                       | 42 |
| 5.4   | Análise do Microbioma do solo.....                             | 44 |
| 5.4.1 | Alfa e beta diversidade.....                                   | 49 |
| 5.4.2 | Beta diversidade .....                                         | 51 |
| 5.4.3 | Taxonomia .....                                                | 52 |
| 5.4.4 | Predição genica .....                                          | 58 |
| 6     | .CONCLUSÃO.....                                                | 61 |
| 7     | .REFERÊNCIAS .....                                             | 62 |
|       | ANEXO 1 – Tabelas e figuras suplementares.....                 | 76 |

## 1 INTRODUÇÃO

A contribuição da agricultura para as emissões dos Gases do efeito estufa (GEE) tem sido discutida em vários estudos (BURNEY et al., 2010). Os principais gases do efeito estufa (GEE) emitidos por atividades antrópicas são: óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e o metano ( $\text{CH}_4$ ). O  $\text{N}_2\text{O}$  tem potencial de aquecimento global de 298 vezes maior que o  $\text{CO}_2$ , sendo apontado como a principal molécula destruidora da camada de ozônio (RAVISHANKARA et al., 2009). Uma das principais causas pelo aumento de  $\text{N}_2\text{O}$  na atmosfera é o uso inadequado de fertilizantes nitrogenados na agricultura. Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) a quantidade de  $\text{N}_2\text{O}$  emitido pelo uso de fertilizantes nitrogenados é de 1% do N aplicado (IPCC, 2006). Por outro lado, autores como CRUTZEN et al. (2008) demonstram que esse número pode ser maior, indicando fator de emissão de 3 a 5% do N aplicado, onde os autores justificaram que a quantidade de  $\text{N}_2\text{O}$  emitida durante o cultivo de biomassa negava o efeito de redução de GEE na substituição de uso de combustíveis fósseis por biocombustíveis. A queima de combustíveis fósseis e o desmatamento contribuem, respectivamente, com 57 e 17 % dos 8,8 bilhões de toneladas de carbono liberados anualmente para a atmosfera (IPCC, 2007; IPCC, 2013). No que se refere às emissões de metano ( $\text{CH}_4$ ), as práticas agrícolas correspondem a cerca de 50% do total das emissões antropogênicas. Estima-se que um aumento de 45 % nos níveis atuais de  $\text{CO}_2$ , poderá elevar em 3°C a temperatura global média (IPCC, 2007). As emissões antrópicas globais de  $\text{N}_2\text{O}$  estão estimadas em 3,7 a 7,7 Tg N ano<sup>-1</sup>, com uma média estimada em 5,7 Tg N ano<sup>-1</sup> (IPCC, 1995). Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) de 1989, e a metodologia do IPCC, as emissões diretas de animais de pastoreio estão em torno de 1,6 Tg de N e as emissões a partir de solos agrícolas são estimadas em 2,5 Tg N, e as emissões indiretas resultantes de nitrogênio de origem agrícola na atmosfera e sistemas aquáticos em 1,9 Tg N-  $\text{N}_2\text{O}$  (IPCC, 1996).

O nitrogênio (N) é o nutriente que se encontra em grandes concentrações nos vegetais superiores. Sua ação no metabolismo das plantas tem sido bastante discutida em diversos estudos relacionados as espécies cultivadas, especialmente as

de ciclo anual, no entanto poucos estudos têm sido conduzidos com espécies florestais em condições tropicais (JESUS et al., 2012). A disponibilidade de N para grande parte das culturas agrícolas está relacionada ao conteúdo de matéria orgânica no solo e da taxa de mineralização, influenciando diretamente na resposta à adubação nitrogenada. GAZOLA et al., 2015 concluíram que a resposta de crescimento da planta em relação à aplicação de N ocorre em culturas florestais jovens e em culturas com um pequeno teor de matéria orgânica em seu solo. Em algumas situações solos com alto teor de matéria orgânica pode apresentar resposta, em que a baixa taxa de mineralização não é capaz de atender adequadamente a demanda por esses nutrientes vegetais (JESUS et al., 2012). Em culturas já estabilizadas, a reciclagem de N através da serapilheira normalmente atende à demanda por N das plantas e a resposta à adubação nitrogenada é pequena ou nula (GAMA-RODRIGUES et al., 2005).

O nitrogênio (N) é o elemento mineral exigido em maior quantidade pela cultura do milho, fazendo parte do grupo de nutrientes que mais limitam a produtividade de grãos, onde sua deficiência afeta diretamente o desenvolvimento da área foliar e a taxa de fotossíntese (GODOY JÚNIOR & GRANER, 1964; LEMAIRE & GASTAL 1997).

O milho (*Zea mays* L.) é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo, em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo. Devido à sua diversidade de aplicações, quer na alimentação animal quer na alimentação humana, assume importante papel socioeconômico, além de constituir indispensável matéria-prima para inúmeros complexos agroindustriais (FANCELLI & DOURADO NETO, 2004), contribuindo de forma direta na contaminação de afluentes e emissão de gases nocivos a atmosfera devido ao uso indiscriminado de fontes de nitrogênio durante o ciclo da cultura.

A implantação de espécies florestais com crescimento rápido, como as do gênero *Eucalyptus*, é uma das estratégias para aumentar a oferta de madeira e seus derivados para suprir a demanda crescente, diminuindo a pressão sobre as florestas nativas. As espécies pertencentes a este gênero crescem de forma satisfatória nas condições edafoclimáticas existentes em diferentes regiões do país e apresentam ampla plasticidade de uso da madeira (STURION & BELLOTE, 2000; MARTINEZ et al., 2012). Segundo a associação brasileira de produtores de florestas plantadas ABRAF (2013), esse gênero ocupa em torno de 71% das áreas das plantações florestais comerciais no Brasil. Entretanto, poucos estudos têm sido

conduzidos com as espécies florestais, especialmente em condições tropicais, sabendo da importância do N para o crescimento das plantas e maneiras de reduzir a perda tanto na forma de gás ou por lixiviação.

O uso de fertilizante nitrogenado além de poder gerar danos ao ambiente é uma prática comum e responsável por elevar os custos da produção agrícola, uma vez que parte do total aplicado é geralmente perdido. A eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é em média 50%, devido à ação da lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (REIS JUNIOR et al., 2008).

Uma das formas utilizadas para reduzir as perdas de N no solo é a utilização de produtos que inibem bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação. Inibidores de nitrificação têm sido empregados para retardar a nitrificação e minimizar os possíveis impactos negativos decorrentes do excesso de nitrato no solo e de  $N_2O$  na atmosfera. Os inibidores têm por objetivo retardar a formação de  $NO_3^-$  no solo mediante interferência na atividade das bactérias do gênero *Nitrosomonas*, responsáveis pela oxidação do  $NH_4^+$  a nitrito ( $NO_2^-$ ), que corresponde à primeira fase da nitrificação (TRENKEL, 1997). Existem numerosos compostos registrados como inibidores de nitrificação, sendo os principais a nitrapirina, dicianodiamida (DCD) e 3,4-dimetil pirazol fosfato (DMPP) (SUBBARAO et al., 2009), sendo os dois primeiros os mais utilizados e atuam quelando o cobre da citocromo oxidase, envolvida na oxidação da amônia (POWELL & PROSSER, 1986). A vantagem do uso do DCD é o menor custo, em relação a outros inibidores como a nitrapirina, e a alta solubilidade em água 23 g/L em 13°C (AMBERGER 1989), possibilitando que seja aplicado de forma líquida, além de ser menos volátil que a nitrapirina, se decompor em  $NH_4^+$  e  $CO_2$  no solo e ser classificado como substância não tóxica (DI & CAMERON 2002). MARCELINO (2009) observou redução de 76% na oxidação do amônio a nitrato, em ureia tratada com DCD, 15 dias após a incubação do fertilizante ao solo.

Entretanto, apesar dos resultados positivos obtidos com inibidores sintéticos, estes produtos ainda não foram amplamente adotados como ferramenta tecnológica, havendo dúvidas, em relação ao seu custo/benefício e efeitos na comunidade biológica do solo. Embora a DCD possa melhorar a eficiência do fertilizante N, é bem conhecido ter efeitos fitotóxicos, incluindo a redução da folha, clorose e necrose, e uma redução no rendimento da biomassa (SOMMER & ROSSIG, 1978; MAFTOUN & SHEIBANY, 1979; REEVES & TOUCHTON, 1986; MACADAM et al., 2003). No

entanto, a gravidade destes sintomas varia com as espécies de plantas e com a taxa de aplicação DCD (REEVES & TOUGHTON, 1986). Dicianodiamida aplicada a 67-72 mg kg<sup>-1</sup> é relatada para reduzir o crescimento de raízes e brotos de algodão (REEVES & TOUGHTON, 1986). Estas dúvidas surgem pela falta de consistência dos resultados, nos diversos ambientes agroclimáticos e diferentes tipos de solo (SUBBARAO et al., 2007).

Surgindo então vários questionamentos sobre o efeito do uso de inibidores sobre a microbiota do solo, sua interação com a planta e seu real poder mitigador dos gases do efeito estufa.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da aplicação de inibidor de nitrificação na microbiota do solo com diferentes coberturas vegetais.

### **2.1.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da cobertura do solo na presença de milho e eucalipto e aplicação do inibidor de nitrificação Dicianodiamida DCD:

Na diversidade de microrganismos.

Emissão de gases do efeito estufa.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 GASES DO EFEITO ESTUFA (GEE)**

O setor agrícola é responsável por 20% do incremento anual do forçamento radiativo do planeta, através da emissão dos principais gases causadores do efeito estufa: dióxido de carbono, metano e óxido nitroso (IPCC, 1996a, BURNEY et al., 2010).

O óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) é um gás residual de longa duração na atmosfera e sua concentração aumentou em 19% desde os tempos pré-industriais (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013). Existem principalmente duas razões pelas quais o chamado gás do riso atrai um interesse considerável dos cientistas pois tem potencial de aquecimento global de 298 vezes maior que o  $\text{CO}_2$ , sendo apontado como a principal molécula destruidora da camada de ozônio (RAVISHANKARA et al., 2009, BUTTERBACH-BAHL et al., 2013).

Uma das principais causas do aumento de  $\text{N}_2\text{O}$  na atmosfera é o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados na agricultura. Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) a quantidade de  $\text{N}_2\text{O}$  emitido pelo uso de fertilizantes nitrogenados é de 1% do N aplicado (IPCC, 2006). Por outro lado, autores como CRUTZEN et al. (2008) demonstram que esse número pode ser maior, indicando fator de emissão de 3 a 5% do N aplicado, onde a quantidade de  $\text{N}_2\text{O}$  emitida durante o cultivo de biomassas não apresentava efeito de redução de GEE quando se substituíam o uso de combustíveis fósseis por biocombustíveis no manejo da lavoura.

A contribuição da queima de fontes de energia não renováveis e o aumento de áreas com solos sem coberturas são de respectivamente, 57 e 17 % dos 8,8 bilhões de toneladas de carbono liberados anualmente para a atmosfera (IPCC, 2007). No que se refere às emissões de metano ( $\text{CH}_4$ ), as práticas agrícolas correspondem com cerca de 50% do total das emissões antropogênicas. Estima-se que um aumento de 45 % nos níveis atuais de  $\text{CO}_2$ , poderá elevar em 3 °C a temperatura global média (IPCC, 2007).

As emissões do gás  $\text{N}_2\text{O}$  ocasionadas pelo homem parte de uma estimativa de 3,7 a 7,7 Tg N/ano, com estimativa de média em 5,7 Tg N/ano (IPCC, 1995). Segundo a FAO de 1989 e o IPCC, a pecuária gera emissões diretas entorno de 1,6 Tg de N, os solos agrícolas e sistemas aquáticos possuem emissões estimadas em 2,5 Tg N e 1,9 Tg N- $\text{N}_2\text{O}$  respectivamente. (IPCC, 1996).

As emissões agrícolas devido ao uso e manejo de adubo de N ( $4,3\text{--}5,8 \text{ Tg N-N}_2\text{O ano}^{-1}$ ) e as emissões de solos naturais ( $6\text{--}7 \text{ Tg N-N}_2\text{O ano}^{-1}$ ) representam 56-70% das fontes globais de óxido nitroso (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013).

### 3.2 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGÊNIO

O ciclo do nitrogênio é o ponto central para a biogeoquímica da Terra, com os grandes fluxos naturais de nitrogênio da atmosfera para os ecossistemas terrestres e marinhos através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), na qual o nitrogênio molecular amplamente reativo é reduzido a compostos de amônio (FOWLER et. al 2013). O nitrogênio fixado é subsequentemente transformado em uma ampla gama de aminoácidos e compostos oxidados por micro-organismos e, finalmente, retornado à atmosfera como nitrogênio molecular através da desnitrificação microbiana em solos, águas e sedimentos frescos e marinhos, (Figura 1).

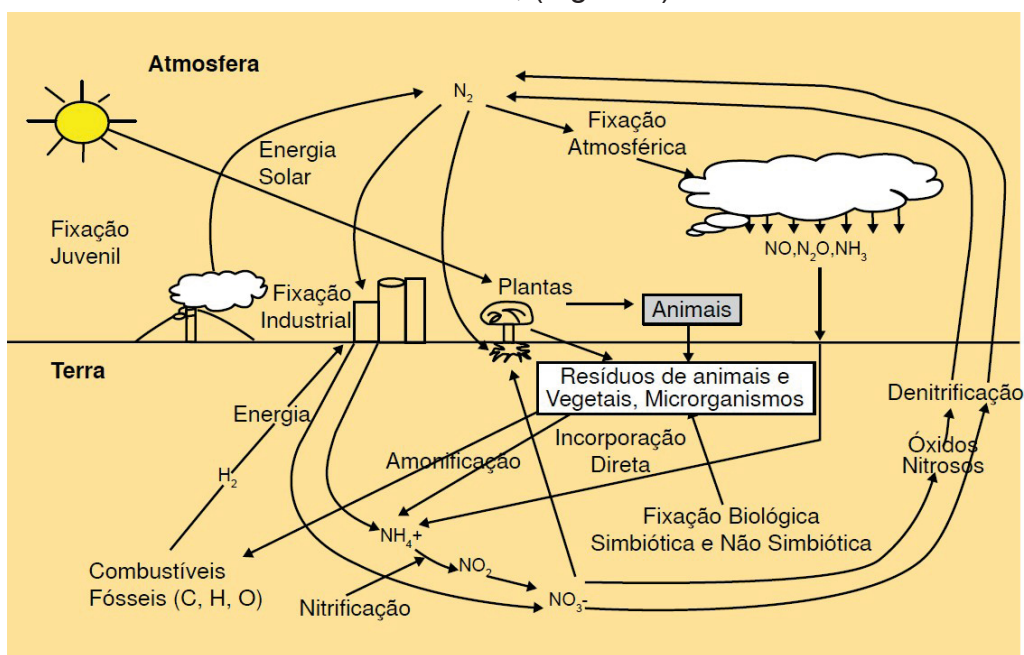


Figura 1 Ciclo do nitrogênio.  
Fonte: Gomes et al.(2000).

A nitrificação é definida como a oxidação do amônio sendo este proveniente da fixação biológica do nitrogênio, da mineralização da matéria orgânica do solo e proveniente de fertilizantes, onde é convertido a nitrato, via nitrito, por microorganismos presentes no solo (MYROLD 1998). A oxidação da amônia a nitrito, via hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) como um passo intermediário, é catalisado pela amônia monooxigenase (AMO), encontrada em *bactérias* e *arqueas*. É um processo aeróbico sendo um subproduto desta oxidação é o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Em condições limitantes

de oxigênio a quantidade de óxido nitroso formado pode aumentar consideravelmente, uma vez que o nitrito formado é então usado como um aceptor de elétrons alternativo.

O processo é composto por duas fases, onde a primeira fase é a formação do nitrito sendo responsável as bactérias do gênero *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrosolobus* e a formação do nitrato corresponde a segunda fase sendo responsáveis as bactérias do gênero *Nitrobacter*, em todos estes processos citados acima as bactérias são denominadas *Nitrobactérias* que tem a capacidade de fixar CO<sub>2</sub> através da energia obtida nas reações e são obrigatoriamente quimiautotróficas e aeróbias (TISDALE et al., 1985; CANFIELD, et al., 2011, FRACETTO, 2013).

O N<sub>2</sub>O contribui para o processo de mudança climática por meio de incrementos no efeito estufa e causa redução da camada de ozônio. A reação de nitrificação libera no solo íons de hidrogênio, que contribuem significativamente para a acidificação dos solos agrícolas, especialmente aqueles adubados com fertilizantes nitrogenados amoniacais (CANTARELLA, 2007; SIMEK, 2000).

O excesso de nitrato nos solos gera uma grande preocupação pois ele é um elemento de fácil lixiviação e susceptível ao processo de desnitrificação (FRYE, 2005). A lixiviação ocorre devido as cargas negativas serem predominantes na camada superficial do solo e ter uma interação química reduzida do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> com os demais minerais presentes no solo, que são responsáveis pela perda deste ânion, sendo translocado juntamente com o movimento descendente da água que facilmente percola no perfil do solo (CANTARELLA & MARCELINO 2007). Todavia a quantidade de N que é lixiviada depende especialmente do fator quantidade de N aplicado, das características do solo e da quantidade de água precipitada (NIELSEN et al., 1982). Após ser lixiviado, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> compromete a qualidade das águas superficiais e subterrâneas e também pode provocar a eutrofização das águas superficiais (PIERZYNSKI et al., 2000).

A desnitrificação ocorre quando o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é perdido para a atmosfera por meio de gases (NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) produzidos em reações desse elemento no solo. Ocorrendo principalmente em condições anaeróbias ou parcialmente anaeróbias, comum em solos inundados, onde praticamente todo o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presente no solo poderá ser convertido e rapidamente perdido na forma de gases. Em condições parcialmente anaeróbias, onde sítios anaeróbios devem ocorrer em solos predominantemente aeróbios, é possível que se perca entre 5 e 30% do N aplicado (CANTARELLA, 2007).

Embora esteja bem estabelecido que os solos são a fonte dominante de óxido nitroso atmosférico ( $\text{N}_2\text{O}$ ), o assunto tem sido amplamente debatido para elucidar completamente a complexidade dos processos de produção e consumo microbiano subjacente e os vínculos com os bióticos (por exemplo, competição inter e intraespécies, cadeias alimentares, plantas) e fatores abióticos (por exemplo, clima do solo, características físico-químicas), melhorando a compreensão das emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  no solo, integrando o entendimento do ciclo do nitrogênio no ecossistema para as escalas regionais e globais e melhorando o entendimento dos principais processos envolvidos na formação, consumo e emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  (BUTTERBACH-BAHL et al. 2013).

### **3.2.1 Genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio**

A Fixação Biológica de Nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase e requer grande concentração desta enzima (10 a 20% do total de proteína celular), os principais genes codificadores de proteínas relacionados a esses processos e sua correlação e ou ajuste em modelos com parâmetros químicos e ambientais padrão (por exemplo, formas C e N, pH, temperatura e conteúdo de água (HENDRIKS et al., 2000; LAMMEL et. al 2015).

A determinação da abundância de respectivos grupos microbianos nos solos tem sido possível através da utilização de genes como marcadores moleculares (exemplo 16S rRNA; PETERSEN et al., 2012).

LEVY-BOOTH et al., 2014 quantificaram os processos biogeoquímicos utilizando genes específicos relacionados a etapas enzimáticas indicativas no solo para o ciclo do N o gene *nifH* (que codifica a nitrogenase, responsável por reduzir o  $\text{N}_2$  da atmosfera em amônio) que é relacionado à fixação do N; *amoA* (amônia monooxigenase) está relacionada à nitrificação; e *nirK* (nitrito redutase de cobre), *nirS* (nitrito redutase de ferro), *norB* (óxido nítrico redutase) e *nosZ* (óxido nitroso redutase) estão relacionados à desnitrificação.

A proteína FeMo, ou dinitrogenase (codificada pelos genes *nifDK*) e a proteína Fe (codificada pelo gene *nifH*), ou dinitrogenase redutase formam o complexo enzimático da nitrogenase (HOWARD e REES, 1996). A atividade catalítica é realizada exclusivamente pela proteína FeMo, sendo dependente da redução de FeMo pela proteína Fe (BURRIS, 1991).

Os genes *nifHDK* são conservados, organismos filogeneticamente distantes como arqueias, proteobactérias e cianobactérias possuindo a capacidade de fixar nitrogênio (RAYMOND et al., 2004; ZEHR et al., 2003), onde o processo de fixação é regulado através de distintos mecanismos (DIXON e KAHN, 2004). É possível que essa grande distribuição filogenética dos genes *nif* seja resultado da transferência horizontal de genes para linhagens bacterianas e da perda de genes *nif* presentes em um ancestral metanogênico (RAYMOND et al., 2004; ZEHR et al., 2003).

### **3.3 ADUBAÇÃO NITROGENADA EM CULTURAS AGRÍCOLAS**

O nitrogênio (N) é um dos elementos requeridos em maior quantidade para funcionamento adequado das plantas; faz parte de aminoácidos que compõe a estrutura dos ácidos nucleicos e proteínas, além de compor também outras moléculas, como as clorofilas (DOBBELAERE & OKON, 2007; ANDRADE et al., 2003). A crescente demanda por alimentos tem despertado interesse em estudos sobre a dinâmica do nitrogênio em ecossistemas agrícolas. Devido a sua grande atividade no solo o elemento mineral N necessita de um manejo eficiente por causa da sua elevada atividade no solo, ocasionando grandes perdas principalmente na forma gasosa (YAMADA & ABDALLA, 2000).

Em grandes culturas anuais principalmente gramíneas o nitrogênio (N) é o elemento mineral exigido em grandes quantidades, onde sua essencialidade o coloca no grupo de nutrientes que possuem elevado grau de limitação na produtividade de grãos, sendo importante destacar que sua deficiência pode afetar diretamente o desenvolvimento da área foliar e a taxa fotossintética da planta (GODOY JÚNIOR & GRANER, 1964; LEMAIRE & GASTAL 1997).

A formação de povoamentos florestais com espécies de crescimento rápido, como as do gênero *Eucalyptus*, é estratégica para aumentar a oferta de madeira e outros produtos florestais, diminuindo a pressão sobre as florestas nativas. As espécies desse gênero crescem satisfatoriamente na diversidade de condições edafoclimáticas existentes em diferentes regiões do país e apresentam ampla plasticidade de uso da madeira (STURION & BELLOTE, 2000; MARTINEZ et al., 2012). Segundo a ABRAF (2013), esse gênero ocupa em torno de 71% das áreas das plantações florestais comerciais no Brasil.

O eucalipto pode responder à nutrição nitrogenada aumentando sua área foliar, com consequente aumento de volume de tronco. Entretanto, poucos estudos têm sido

conduzidos com as espécies florestais, especialmente em condições tropicais. Apesar dos trabalhos destacarem a importância do N, falta informação sobre maneiras de se obter um maior aproveitamento do nitrogênio via fertilizante, sabendo que este nutriente pode se perder tanto por volatilização ou por lixiviação, e os efeitos da adubação sobre a qualidade da madeira e crescimento da planta são difíceis de prever (BARBOSA et al., 2014).

O uso de fertilizantes que contém nitrogênio em suas bases poder gerar diversos danos ao meio ambiente se empregados de forma indiscriminada, auxiliando na elevação dos custos da produção agrícola, sabendo que uma parte do que é aplicado geralmente é perdido (REETZ Jr, 2017).

A quantidade do mineral N inorgânico distribuído principalmente na forma de  $\text{NO}_3^-$ , se mantém em sua maior parte no perfil do solo, sendo proveniente do uso de fertilizantes nitrogenados, resultante da aplicação de doses de N maiores do que as recomendadas objetivando alcançar produtividades elevadas (RODER et al., 1989; TEIXEIRA et al., 1994; TORBERT et al., 1996; BARRIOS et al., 1998).

A ureia está no grupo dos principais fertilizantes sólidos no mercado mundial, apresentando vantagens como preço reduzido por unidade de N, concentração elevada de N, alta solubilidade, baixa corrosividade, compatibilidade com inúmeros fertilizantes e defensivos e elevada taxa de absorção foliar (CANTARELLA, 2007). No Brasil esse produto representa cerca de 60% dos fertilizantes nitrogenados comercializados (CANTARELLA et al., 2008). A ureia possui uma das principais desvantagens a possibilidade de altas perdas de N por volatilização de  $\text{NH}_3$ , onde a reação de hidrólise consome prótons ( $\text{H}^+$ ) e provoca a elevação do pH ao redor das partículas, mesmo em solos ácidos, como os que predominam no Brasil. Uma das maneiras de reduzir tais perdas é a incorporação de ureia a 5 cm ou mais de profundidade no solo que já é suficiente para controlar essas perdas e fazer com que o N, proveniente de sua hidrólise, fique na forma mais estável  $\text{NH}_4^+$  (CANTARELLA & MARCELINO, 2007). Entretanto, se por um lado a incorporação da ureia diminui as perdas por volatilização de  $\text{NH}_3$ , por outro, não faz com que o N da ureia deixe de estar sujeita às perdas de  $\text{NO}_3^-$  por lixiviação (SANGOI et al., 2003), uma vez que a presença de  $\text{NH}_4^+$  é condição para que o processo de nitrificação se inicie no solo.

Após a aplicação de ureia a quantidade de N que é volatilizada superficialmente no solo depende de diversos fatores sendo muito variável, inclui condições climáticas

e atributos relacionados com o solo. Esse fenômeno totaliza cerca de 1 a 15 % (SANGOI et al., 2003; CANTARELLA et al., 2008; SANZCOBENA et al., 2008), e pode atingir valores superiores a 50 % do N aplicado (LARACABEZAS et al., 2007; SANGOI et al., 2003; ROCHETTE et al., 2009A).

Teores reduzidos de matéria orgânica, baixa capacidade de troca catiônica (SANGOI et al., 2003) umidade no solo em níveis baixíssimos (LIU et al., 2007), do mesmo modo que aplicação de elevadas doses de N (MA et al., 2010), altas temperaturas (CLAY et al., 1990), pH elevado (SENGIK et al., 2001) e o maior comparecimento da cobertura vegetal (ROCHETTE et al., 2009c), auxiliam na volatilização do  $\text{NH}_3$  a começar pela aplicação do fertilizante ureia sobre a camada superficial do solo. Sendo reduzida de forma drástica a perda quando o fertilizante é incorporado no solo (TRIVELIN et al., 2002; SANGOI et al., 2003; ROCHETTE et al., 2009A)

### **3.4 INIBIDORES DE NITRIFICAÇÃO**

Inibidores de nitrificação têm sido utilizados pra minimizar os impactos negativos resultantes dos elevados níveis de nitrato no solo, responsáveis pelas alterações do pH do solo, mudanças climáticas, aumento da atividade biológica marinha e a absorção de dióxido de carbono. O nitrogênio em níveis elevados contribui para à produção de mais óxido nitroso, que é um dos gases mais prejudiciais ao aquecimento global em comparação ao metano ou ao dióxido de carbono. (GALLOWAY et al., 2008).

Os inibidores trabalham no processo de retardamento da formação de  $\text{NO}_3^-$  no solo interferindo na atividade das bactérias do gênero *Nitrosomonas*, que são responsáveis pela oxidação do  $\text{NH}_4^+$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que é correspondente à primeira fase da nitrificação (TRENKEL, 1997).

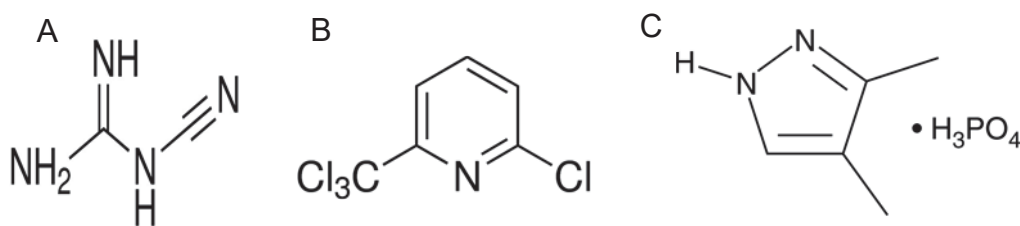


Figura 2 : Estrutura química dos principais inibidores de nitrificação.  
 A) Dicianodiamida, (B) Nitrapirina e (C) 3,4-dimetilpirazol fosfato.  
 Fonte: Adaptado de caymanchem.com

Há diversos compostos registrados como inibidores de nitrificação, os principais são: nitrapirina, o 3,4-dimetil pirazol fosfato (DMPP) e dicianodiamida (DCD) (Figura-2) (SUBBARAO et al., 2009). Os inibidores de nitrificação que estão em evidencia são nitrapirina e dicianodiamida, eles atuam na quelação dos componentes de cobre da citocromo oxidase, suprimindo a oxidação de amônia desativando a monooxigenase de amônio (POWELL & PROSSER, 1986; AMBERGER, 1989).

Atuando especificamente em uma enzima (amônia monooxigenase) contida em *Nitrosomonas*, bloqueando o local onde o amônio é convertido em nitrito. Também é biodegradável e solúvel em água (AMBERGER 1989, MCCARTY & BREMNER 1989) em dióxido de carbono, água e amônia.

Em geral, inibidores específicos são os compostos que retardam a oxidação de  $\text{NH}_4^+$  para  $\text{NO}_2^-$ , sem afetar a oxidação subsequente de  $\text{NO}_2^-$  para  $\text{NO}_3^-$ .

Por exemplo do inibidor específico como o a Dicianodiamida (DCD) que é um composto do grupo das amidas orgânicas e possui a fórmula química  $\text{C}_2\text{N}_4\text{H}_4$ , (nome químico: Cianoguanidina; N° CAS: 461-58-5), atuando através de seu efeito na citocromo oxidase, envolvida na oxidação da hidroxilamina para  $\text{NO}_2^-$  durante o processo de nitrificação (MATTEI et AL, 2015). A duração deste efeito é uma função da concentração de DCD no fertilizante e também da frequência que o mesmo é aplicado. Os inibidores não específicos afetam todas as enzimas da mesma maneira. Os métodos não específicos de inibição incluem quaisquer alterações físicas ou químicas que desnaturam a porção proteica da enzima e, portanto, são irreversíveis, por exemplo, benzotriazoles (Bz), usados como inibidor de corrosão por décadas, é um inibidor de nitrificação eficaz em solos sob clima quente.

O DCD, é a forma dimérica da cianamida com elevada solubilidade em água de  $40 \text{ g L}^{-1}$  ( $25^\circ\text{C}$ ) e uma baixa pressão de vapor de  $4,5 \times 10^{-3} \text{ pa}$  ( $100^\circ\text{C}$ ) e contém cerca de 65% de N e no solo é degradada em  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (DI; CAMERON, 2016; SARDÁ, 2016), portanto, atua como um fertilizante de liberação lenta de N. É um

produto químico bacteriostático, não tóxico, onde microrganismos podem recuperar-se e retomar a oxidação de amônia novamente (DI; CAMERON, 2016), com DL 50 de  $10\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal, que é cerca de 3 vezes maior que o NaCl (Amberger, 1989).

O DCD inibe o primeiro estágio da nitrificação, a oxidação de  $\text{NH}_4^+$  para  $\text{NO}_2^-$  (Figura 3) afetando especificamente *Nitrosomonas europaea* (ZACHERL E AMBERGER, 1990). Presumivelmente, esse efeito é devido à reação do grupo CN do DCD com grupos sulfidríla ou metais pesados da enzima respiratória da bactéria.

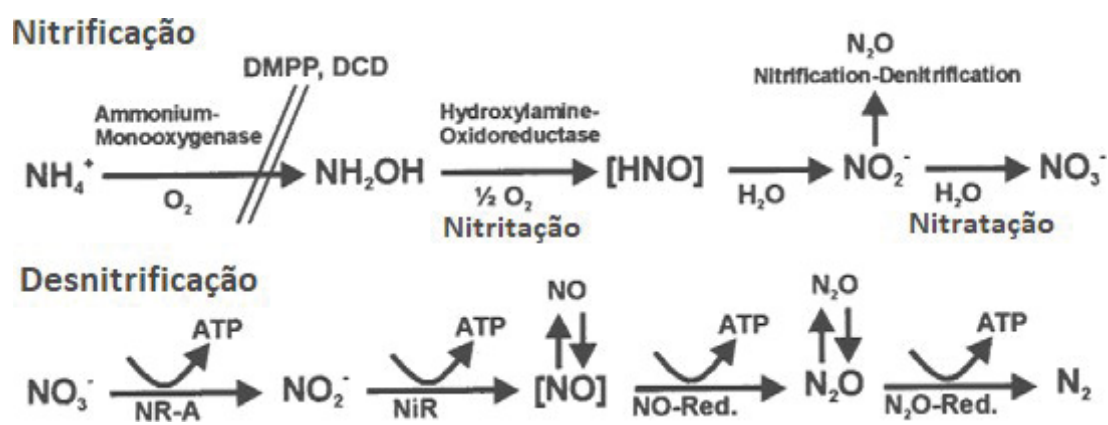


Figura 3 Representação esquemática ação inibitória dos inibidores de nitrificação nos processos de nitrificação e desnitrificação no solo

Como observado anteriormente, a taxa de degradação e, portanto, a eficácia do DCD diminui com o tempo após a aplicação nos solos: o aumento da temperatura do solo, do pH do solo, o teor de matéria orgânica do solo e a umidade do solo diminui sua eficácia (RODGER & COLS. 1985, PRASAD & POWER 1995, PUTTANNA e COLS. 1999, IRIGOYEN & COLS. 2003, DI & CAMERON 2004a).

Uma das vantagens de se usar o DCD é o custo reduzido, se comparado a outros inibidores como a nitrapirina, e também por apresentar uma alta solubilidade em água, permitindo sua aplicação na forma líquida, sendo menos volátil que a nitrapirina, decompondo-se em  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{CO}_2$  no solo e sendo classificado como uma substância atóxica (DI & CAMERON 2002). Observou-se a redução de 76% na oxidação do amônio a nitrato, no fertilizante ureia, tratada com DCD, após 15 dias transcorridos da incubação do fertilizante no solo (MARCELINO, 2009).

Apesar dos inibidores de nitrificação sintéticos apresentarem resultados positivos, estes produtos não estão sendo amplamente adotados como ferramenta

tecnológica, surgindo dúvidas, a respeito do seu custo x benefício e efeitos na comunidade biológica do solo.

Ainda que o DCD possa melhorar a eficiência do fertilizante N, é bem conhecido ter efeitos fitotóxicos, incluindo a redução da folha, a clorose, a necrose e uma redução no rendimento da biomassa (SOMMER & ROSSIG, 1978; MAFTOUN & SHEIBANY, 1979; REEVES & TOUCHTON, 1986; MACADAM et al., 2003). No entanto, a gravidade destes sintomas varia com as espécies de plantas e com a taxa de aplicação do DCD (REEVES & TOUCHTON, 1986). Por exemplo, a aplicação de DCD na dose de 67-72 mg kg<sup>-1</sup> reduz o crescimento de raízes e brotos de algodão (REEVES & TOUCHTON, 1986). Estas dúvidas surgem pela falta de consistência dos resultados, nos diversos ambientes agroclimáticos e diferentes tipos de solo (SUBBARAO et al. 2007).

Para que ocorra um efeito positivo após a adição de inibidores de nitrificação é necessário a ocorrência de condições que favoreçam as perdas de nitrogênio na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por lixiviação, como uso de fontes nitrogenadas ou adoção de métodos convencionais de aplicação de fertilizantes. Não sendo substitutos de um bom manejo do solo, mas oferecem flexibilidade para opções de manejo, antecipação de aplicação dos fertilizantes, redução no parcelamento dos fertilizantes podendo reduzir a aplicação do fertilizante apenas para o momento do plantio (CANTARELLA, 2008).

Vários experimentos revelaram que DCD e DMPP podem ser usados como aditivos, tanto para fertilizantes químicos quanto orgânicos e sua eficiência varia em função das diferentes formas de N. A aplicação de DCD aumenta 25% N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no solo e diminui 17% N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto a aplicação de DMPP aumenta 41% N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e diminui 21% N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo sugerido que a aplicação de 1/10 de DMPP, em relação ao DCD, é suficiente para obter inibição similar (YANG et.al 2016).

O efeito positivo da aplicação de inibidores de nitrificação na retenção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do solo poderia aumentar o risco de lixiviação de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mas isto não foi observado (YANG et.al 2016). Esta redução na lixiviação pode estar relacionada aos valores de pH mais altos e prolongados pela aplicação de DCD, o qual prolonga o tempo de retenção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e reduz as perdas por lixiviação e pela adsorção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por partículas de argila ou matéria orgânica do solo (YANG et.al 2016). Uma maior concentração de nitrogênio na forma de amônio no solo por um período de tempo mais longo, aumenta o aproveitamento das plantas (DING et al., 2015) e diminui as perdas de nitrogênio na forma de gás (GILSANZ et al., 2016).

O DCD e o DMPP costumam ser eficazes na regulação das transformações de N do solo e na influência da produtividade das plantas (YANG et al., 2016). A comparação da eficácia do DCD e do DMPP entre os ensaios de campo mostrou que o DCD e o DMPP foram igualmente eficazes na alteração do teor de N inorgânico no solo, na dissolução da lixiviação inorgânica de N (DIN) e nas emissões de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (YANG et.al 2016). O DCD teve eficácia superior ao DMPP no aumento da produtividade da planta (YANG et al., 2016). É possível observar um aumento no rendimento das culturas que utilizam o DMPP mas este fato é observado apenas em solos alcalinos (YANG et al., 2016).

A análise de custo e benefício (CBA) mostrou que a aplicação de fertilizante N com DCD produziu receita adicional de US \$ 109,49  $\text{ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$  para fazendas de milho, equivalente a 6,02% de aumento na receita de grãos (YANG et al., 2016). Em comparações, o inibidor DMPP produziu menos benefícios monetários de US \$ 15,67  $\text{ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$  (YANG et al, 2016). Os resultados mostraram que o DCD tinha a vantagem de trazer mais benefício monetário líquido sobre o DMPP (YANG et al., 2016). Mas isso pode ser enfraquecido pela maior toxicidade do DCD do que do DMPP, especialmente após a aplicação contínua do DCD (YANG et al., 2016).

Igualmente, mais estudos são necessários em relação ao impacto do DCD no microbioma do solo, especialmente em regiões tropicais, devido a grandes variações climáticas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO SOLO

O solo de mata nativa foi coletado na profundidade de 0-40 cm dentro da fazenda experimental da EMBRAPA FLORESTA em Colombo-PR, Estrada da Ribeira km 111 Colombo, PR – Brasil coordenadas 25°19'11.1"S 49°09'34.1"W, classificado como Cambissolo Húmico de textura media (SANTOS et al.,2018). A análise físico-química do solo (Tabela1) foi realizada antes da implementação do experimento pelo laboratório de química e física do solo da Embrapa Florestas e serviu de base para o cálculo da adubação.

| ANÁLISE DE SOLO - ROTINA + ANÁLISE GRANULOMÉTRICA |      |                        |                      |                  |                  |                |       |       |                     |      |      |    |   |                    |     |     |
|---------------------------------------------------|------|------------------------|----------------------|------------------|------------------|----------------|-------|-------|---------------------|------|------|----|---|--------------------|-----|-----|
| pH                                                |      | Al <sup>+3</sup>       | H + Al <sup>+3</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>+2</sup> | K <sup>+</sup> | SB    | T     | P                   | NT*  | CT*  | V  | m | Arg                | Are | Sil |
| CaCl <sub>2</sub>                                 | SMP  | cmolc.dm <sup>-3</sup> |                      |                  |                  |                |       |       | mg.dm <sup>-3</sup> | %    |      |    |   | g.kg <sup>-1</sup> |     |     |
| 6.44                                              | 6.62 | 0.00                   | 3.13                 | 8.0              | 4.2              | 0.23           | 12.42 | 15.55 | 3.0                 | 0.21 | 2.85 | 80 | 0 | 358                | 394 | 248 |

Tabela 1 Análise de Solo.

\* CT: carbono total; NT: nitrogênio total. Procedimento realizado em analisador CHNS.– Núcleo de Solos e Ciclos Biogeoquímicos. Estrada da Ribeira, km111, Colombo – PR, CEP 83.411-000 Laudo nº 159.

Fonte: Embrapa Florestas

### 4.2 PREPARO E CULTIVO DAS PLANTAS

Foram utilizados vasos de 200 L preenchidos com 20 cm de brita e 70 cm de solo homogeneizado, totalizando 30 vasos.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 5 repetições para cada tratamento. Os seguintes tratamentos foram testados: i) solo-nu ; ii) solo-nu com a adição do inibidor de nitrificação (DCD) no fertilizante nitrogenado; iii) solo plantado com milho; iv) solo plantado com milho com a adição do inibidor de nitrificação (DCD) no fertilizante nitrogenado; v) solo plantado com eucalipto; vi) solo plantado com eucalipto com a adição do inibidor de nitrificação (DCD) no fertilizante nitrogenado.

As mudas do híbrido *Eucalyptus urograndis* (I144) (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden x *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake) foram adquiridas em viveiro idôneo na região. Para o eucalipto, foi mantida uma planta por vaso e a adubação ocorreu 15 dias após o transplântio. Foram aplicados em dose única o equivalente a 46,87g de nitrogênio (N) na forma de ureia correspondendo a uma dose de 35,2kg de N ha<sup>-1</sup>, 65,45g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de super fosfato triplo correspondendo a 108 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, e 50g de K<sub>2</sub>O na forma de KCL correspondendo a 82,5kg de K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>, simulando

uma densidade de 1650 plantas por  $\text{ha}^{-1}$  doses aproximadas segundo recomendação, de BELLOTE & NEVES, 2001.

As sementes de milho da variedade DKB 290 (Dekalb) foram semeadas nos vasos, foi utilizado 5 sementes de milho por vaso, deixando três plantas no desbaste, efetuado aos 15 dias após a emergência (DAE) ou quando a planta apresentou três folhas totalmente desenvolvidas, a adubação ocorreu aos 15 dias após a semeadura simulando uma densidade de 65000 plantas  $\text{ha}^{-1}$ , onde foram aplicados 8,30g de nitrogênio (N) na forma de ureia por vaso correspondendo a uma dose de 180kg N  $\text{ha}^{-1}$ , 4,15g  $\text{P}_2\text{O}_5$  na forma de super fosfato triplo correspondendo a uma dose de 90kg  $\text{P}_2\text{O}_5$   $\text{ha}^{-1}$  e 3,23g de  $\text{K}_2\text{O}$  na forma de cloreto de potássio correspondendo a uma dose de 40kg de  $\text{K}_2\text{O}$   $\text{ha}^{-1}$  doses aproximadas segundo recomendações de PAULETTI & MOTTA, 2019.

O fertilizante foi aplicado no solo em duas covetas laterais a 10 cm de profundidade e a 10 cm distantes do centro do vaso onde estavam localizadas as mudas de *Eucalypto U.* e as sementes do Milho (Figura 4).

Para o tratamento Solo-nu foram utilizadas as mesmas doses de fertilizantes aplicadas no tratamento “Milho”.

A umidade do solo foi monitorada pelo equipamento TDR (Reflectometria no Domínio do Tempo, HydroSense, Campbell Scientific) onde estima a permissividade dielétrica do solo através da medição do tempo de propagação de um impulso eletromagnético que se propaga através das hastes metálicas da sonda até à extremidade, onde é refletido novamente até à sua fonte, analisando a resposta do solo às mesmas através de sensores introduzidos no solo no início do experimento, onde a mesma foi mantida entre 40 a 60% da capacidade de campo.

A dose de DCD utilizada correspondeu a 10% da dose de N(ureia) sendo aplicada juntamente com o adubo nitrogenado (VILSMEIER et.al 1987, TIAN et al., 2015), para o eucalipto e milho.

### 4.3 MEDIDAS DE GASES DO EFEITO ESTUFA

Após o plantio das mudas, quatro bases de PVC (20 cm de diâmetro x 20 cm de altura) foram instaladas no solo de cada vaso, sendo duas situadas sobre as covetas de adubação e duas no solo sem fertilizante (Figura\_4 e 5).

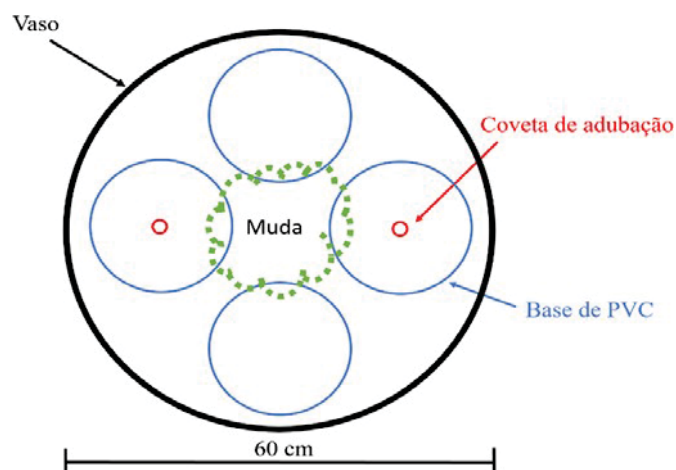


*Figura 4 Vista superior do espaço amostral.*

Disposição das bases de PVC e localização das covetas de adubação, no centro do vaso, área pontilhada em verde representa área radicular da planta.

A amostragem de ar para medida dos fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  foi realizada no terceiro dia antes da adubação de base. Após a aplicação do fertilizante, o monitoramento dos fluxos ocorreu aos 0, 2, 7, 11, 21, 32, 42, 44, 46, 49, 57, 60, 81, 87, 91, 126, 129, 133, 141, 147, 154, 171, 177, 185 dias.



*Figura 5. Disposição das mudas no centro do vaso.*  
"A" Milho, "B" Eucalipto.

A medida dos gases foi realizada a partir da amostragem de ar pelo método da câmara estática fechada ZANATTA et al., (2014) pelo espectrômetro automático de cavidade do tipo ring-down (Picarro G2508, Santa Clara, CA, EUA), (Figura 6), que realiza leitura da concentração dos gases. As câmaras foram acopladas nas bases, que estavam previamente preenchidas com água para vedar a passagem de gases externos no momento da leitura. Foram realizadas leituras simultâneas nos intervalos de tempo de 0, 30 e 60 minutos após o fechamento das câmaras em sua respectiva câmara foram acopladas nas canaletas localizadas na parte superior de cada base, sendo 2 minutos de leitura para cada média de amostra das 4 câmaras. Concomitante foram coletadas amostragens de temperatura do ambiente, do interior da câmara e temperatura do solo com termômetro digital do tipo pino.

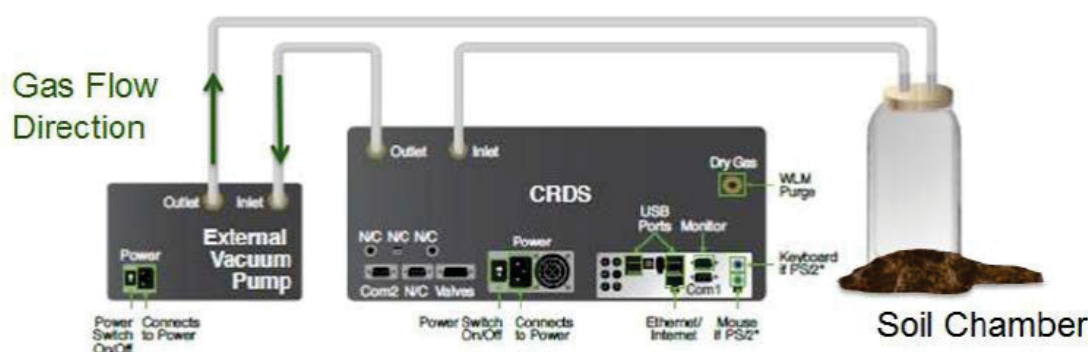


Figura 6. Aparelho Picarro G2508

Esquematização do fluxo de coleta dos gases, o aparato experimental opera como um sistema fechado. O gás emitido do solo é capturado pela câmara do solo. Em seguida, flui para o espectrômetro de anelamento de cavidade G2508 (CRDS), onde as concentrações dos gases são medidas.

Fonte: Adaptado de Picarro.com®

Após a coleta dos gases foi feita a padronização dos resultados obtidos pelo equipamento que entrega os dados no formato texto, sendo criada uma planilha onde foi retirado o primeiro minuto de cada amostra nos três tempos de coleta para eliminar qualquer interferência de gases oriundos do interior das mangueiras quando as câmaras estavam desacopladas, e então foi obtida a média das concentrações de cada replicata. Para o cálculo dos fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_4$  as unidades são  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  e  $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  respectivamente e para  $\text{CO}_2$  em  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , sendo

calculadas por 2 equações propostas por Parkin e Venterea (2010) e também utilizada por (IBARR, 2020).

Equações 1 e 2:

$$V_{gas} = \left[ \left( \frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) \times V \times \left( \frac{1}{A} \right) \right] \div 10^9 \quad (1)$$

$$f = \frac{P \times V_{gas}}{R \times T} \times E \times 10^6 \times 60 \quad (2)$$

Equação 1: Volume do gás emitido

Equação 2: Fluxo dos gases

Fonte: adaptado de COPETTI, 2014; PARKIN E VENTEREA, 2010; IBARR, 2020.

Onde o volume do gás é representado por: “Vgás” N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub> emitido (L m<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>), calculado a partir da equação da reta obtida através da regressão linear dos dados de concentração do gás no interior da câmara em relação aos tempos 0, 30 e 60 min, de amostragem, “V” o volume total das quatro câmaras avaliadas em cada vaso (14,4L), “A” a área total das quatro câmaras de coletas dispostas em cada vaso (0,071 m<sup>2</sup>), “P” a pressão atmosférica na câmara [0,9049 atm para a altitude da área de estudo (950 m)], “R” a constante dos gases ideais (0,0821 atm L mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), “T” a temperatura média (°K) no interior da câmara durante o período de amostragem de ar e “E” é a equivalente de ηg N ηmol<sup>-1</sup> do N<sub>2</sub>O igual a 28 e μg C ηmol<sup>-1</sup> do CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> igual a 12, (adaptado de COPETTI, 2014; IBARR, 2020).

As emissões acumuladas foram estimadas plotando-se os valores diários dos fluxos dos gases coletados e a escala de tempo em um gráfico e calculando-se a área resultante sob a curva, por integração (GOMES et al., 2009), utilizando-se o software Sigmaplot® Versão 10 (Systat Software Inc., Chicago, USA, 2007).

O potencial de aquecimento global parcial (PAGp) usado para avaliar o potencial que os sistemas agrícolas possuem na contribuição do efeito estufa, é expresso em equivalente de dióxido de carbono - CO<sub>2</sub>eq (Bayer et al., 2015) e foi calculado convertendo as emissões de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> para CO<sub>2</sub> equivalente (kg CO<sub>2</sub> equiv. ha<sup>-1</sup>) e somando ambos, segundo a (Equação 3, adaptado de Camargo, 2015):

$$PAG_p = (CH_4 \times 25) + (N_2O \times 298) \quad (3)$$

Equação 3. Cálculo do Potencial de Aquecimento global parcial PAGp.

Fonte: Adaptado Camargo, 2015.

Onde: N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> correspondem às emissões acumuladas de cada gás durante o período do experimento (kg ha<sup>-1</sup>), 298 e 25 e são valores do potencial de

aquecimento do N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub>, respectivamente, considerando-se um tempo de permanência na atmosfera de 100 anos (IPCC, 2013).

#### **4.4 MEDIDAS BIOMÉTRICAS**

A altura e diâmetro das mudas de eucalipto foram obtidas antes da fertilização e mensalmente, até o final do período de amostragem de ar. O incremento periódico (IP) foi calculado conforme a (Equação 4), sendo que para cada tratamento foi obtida a média dos dados de IP das 5 repetições.

$$IP = \frac{Y_f - Y_i}{T} \quad (4)$$

*Equação 4 Cálculo do incremento periódico*

Sendo:

IP – Incremento periódico da altura ou diâmetro (cm);

Y<sub>f</sub> – Dimensão considerada (altura ou diâmetro) ao final do período de interesse (cm);

Y<sub>i</sub> – Dimensão considerada (altura ou diâmetro) no início do período de interesse (cm);

T = Tempo transcorrido

#### **4.5 COLETA DE AMOSTRAS DE SOLO E EXTRAÇÃO DE DNA METAGENÔMICO**

Amostras de solo com 10g, entre 0-10cm de profundidade foram coletadas no interior das 2 bases de PVC para cada vaso (replicata experimental), sendo coletadas em intervalos de 2 leituras das concentrações de gases. Todas as ferramentas de trabalho foram desinfestadas com álcool 70% antes da coleta de cada amostra. As amostras foram transferidas para o laboratório e estocadas a -80°C até o seu processamento. De acordo com os resultados obtidos do monitoramento da emissão de gases do efeito estufa, foram retiradas cerca de 200-300mg de amostras de solo que estavam estocadas a -80°C sendo utilizadas para extração de DNA metagenômico utilizando o "Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep kit (Zymo Reserch)", para realização de análises microbiológicas.

#### **4.6 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA**

O DNA metagenômico foi usado para amplificação da região variável V4 do gene 16S rRNA (iniciadores 515F e 806R) gerando um amplificado com 254 pb (Figura complementar 3), com iniciadores desenhados para sequenciamento na plataforma Illumina (Caporaso et al., 2012). A amplificação por PCR foi realizada em reações de 10uL contendo: 20ng de DNA metagenômico, 1uM de cada iniciador, 0,5uL de dNTP (5mmol/L) tampão diluído para 1X e 5U de Taq DNA polimerase. Os ciclos de temperatura foram: 94°C/3min; 18 ciclos de 94°C/45s, 50°C/30s, 68°C/1min; 72°C/10min (Huergo et al., 2018). Três replicatas técnicas foram realizadas para cada amostra. Os amplicons foram quantificados por qPCR com o "Kapa NGS quantification kit" (Roche) e a qualidade avaliada através de determinação em 2100 Bioanalyzer (Agilent). Quantidades equimolares de amplicons das replicatas técnicas foram misturadas para o sequenciamento. Todos os experimentos de amplificação por PCR incluíram um controle negativo, sem DNA molde no tubo de reação. O sequenciamento foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR em plataforma Illumina, modelo MiSeq, utilizando "MiSeq 500v2 Reagent kit" (Illumina), com a estratégia de sequenciamento *pair-end*, onde são sequenciadas ambas as fitas do DNA em direções opostas (denominadas R1 e R2). Esta estratégia permite obter um par de sequências com sobreposição para cada amplicon.

#### **4.7 ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA**

O fluxo de análises (Figura 7) foi realizado através do programa QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology), versão 2019.7 (Kuczynski et al., 2012), onde as sequências foram desmultiplexadas, passando, em seguida, pelo controle de qualidade usando o plugin DADA2, que remove sequências de baixa qualidade, corrige erros do sequenciamento Illumina, realiza a montagem do par de sequências complementares, desreplicação e identifica e remove possíveis sequências quimeras (Callahan et al., 2016). Nesta etapa, as sequências são também desreplicadas, sendo agrupadas com 100% de identidade. Desta forma, uma única sequência passa a representar um conjunto de sequências idênticas, sendo denominadas variantes de sequências amplicons (ASV, do inglês, amplicon sequence variants; Callahan et al., 2017). As ASV foram utilizadas em todas as análises subsequentes, mantendo o número de sequências representadas ou suas abundâncias relativas.

O alinhamento das sequências e construção da árvore filogenética foram feitos pelo método mafft-fasttree (KATO et al., 2013, PRICE et al., 2010).

As métricas de alfa e beta diversidade foram calculadas com o plugin q2-diversity. A anotação taxonômica foi atribuída utilizando o classificador baseado no método classify-sklearn (Bokulich et al., 2018 e 2018a), contra as sequências de referência do banco de dados SILVA, versão 132, treinado para a região amplicon delimitada pelos iniciadores 515F e 806R (Quast et al., 2013), disponível em [https://data.qiime2.org/2019.10/common/silva-132-99-515-806-nb\\_classifier.qza](https://data.qiime2.org/2019.10/common/silva-132-99-515-806-nb_classifier.qza).

#### **4.8 ANÁLISE DE DIVERSIDADE**

Métricas de diversidade alfa para características observadas, e diversidade filogenética de Faith (Faith 1992) e Shannon (KEYLOCK, 2005); métricas de diversidade beta para UniFrac ponderado (Lozupone et al. 2007), UniFrac não ponderado (Lozupone et al. 2005), distância de Jaccard e dissimilaridade de Bray-Curtis); e Análise de Coordenadas principais (PCoA) foram estimadas usando o plugin q2-diversity do pacote qiime2 a partir das amostras rarefeitas (subamostradas sem substituição), conforme indicado nos resultados para cada análise.

(subamostradas sem substituição) para 5900 sequências por amostra.

A análise da diversidade alfa foi calculada através do índice shannon avaliando a rarefação e o cálculo de abundância relativa e a significância de Alpha diversidade foi realizada pelo método estatístico Kruskal-Wallis. A Beta diversidade foi calculada através dos índices Jaccard (não depende de filogenia) e UNIFRAC não ponderada (dependente de filogenia) para construção do gráfico de coordenadas principais (PCoA), a significância pelo método estatístico (Permanova). Foi realizado o teste de abundância diferencial com ANCOM (Mandal et al., 2015).

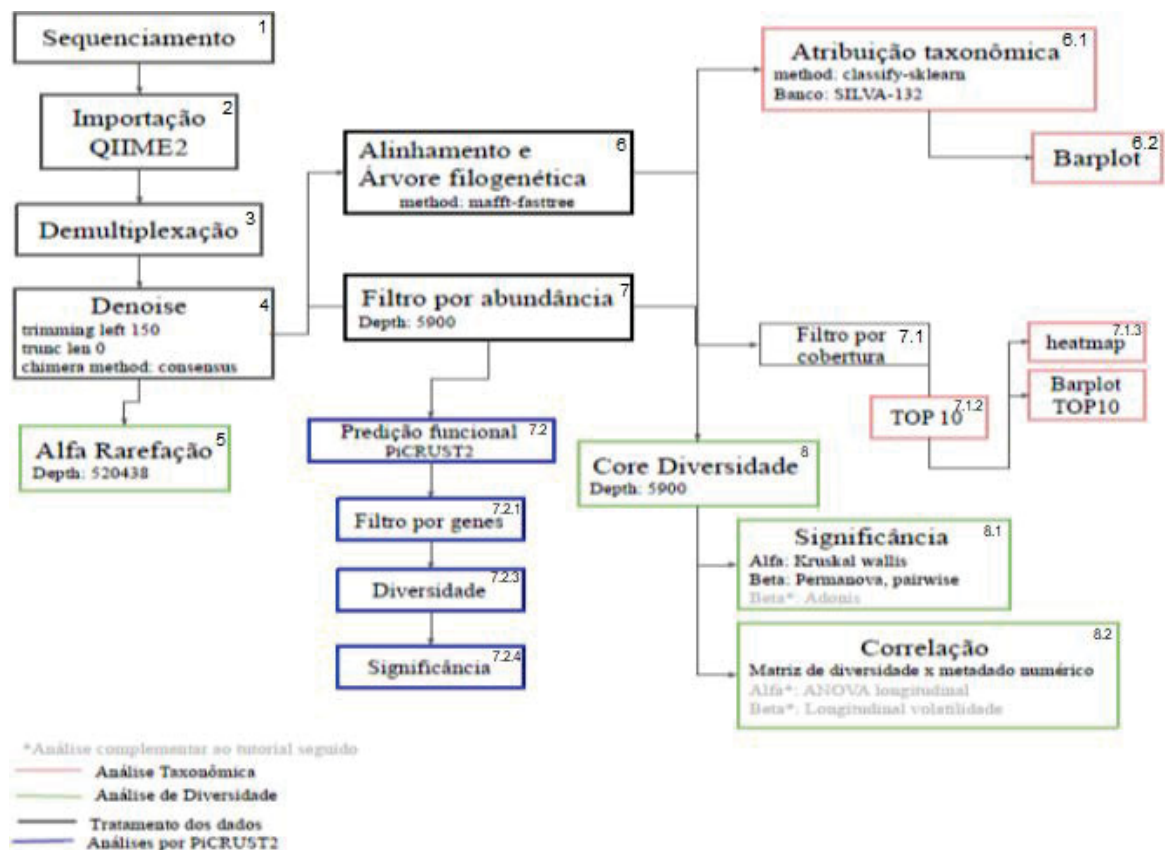


Figura 7 Organograma de análises realizadas pelo programa qiime 2. Etapas que foram seguidas para obtenção dos resultados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 FLUXO DOS GASES DO EFEITO ESTUFA

O fluxo dos gases de efeito estufa (GEE)  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  a partir do solo foram medidos em experimento conduzido em casa de vegetação. Vasos contendo o mesmo tipo de solo foram deixados sem cobertura, semeados com milho ou plantados com mudas de eucalipto (uma planta por vaso). Os vasos foram adubados 15 dias após o plantio, de acordo com recomendação para cada cultura, sendo que a adubação nitrogenada com ureia recebeu tratamentos livre ou com adição do inibidor de nitrificação/desnitrificação DCD. No terceiro dia antes da adubação de base, a emissão dos gases passou a ser medida (tempo 0) durante um período de 185 dias. A adubação e aplicação do DCD foram localizadas, a 10cm do colo das plantas nas 2 covetas dentro das bases fixadas para receber as câmaras de coleta dos gases.

Os fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$  variaram de 5,14 a 51,74  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 13,55  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para o tratamento “Eucalipto + DCD”, no tratamento “Eucalipto – DCD” foi notado variações entre 5,47 a 1365,51  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 315,43  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , já o tratamento “Milho + DCD” foi possível observar variações entre 3,91 a 238,23  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 49,53  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , para o tratamento “Milho – DCD” foi observado valores entre 4,06 e 1089,94  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com valores médios entre 334,00, o tratamento “Solo-nu + DCD” variando entre 3,60 a 147,00  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 23,86  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tratamento “Solo-nu – DCD” apresentou valores que variaram de 5,31 a 1612,80  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 484,77  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ao longo dos 185 dias de avaliação.(Figura 8).

Efeitos consideráveis no fluxo de  $\text{N}_2\text{O}$  foram observados a partir do 39º dia com médias de 17,16  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para os tratamentos que receberam DCD e 404,14  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para os tratamentos que não receberam DCD, contrastando com os dos dados encontrados por IBARR (2020), que ao trabalhar com fertilizantes de eficiência aumentada em LATASSOLO VERMELHO distrófico observou efeitos significativos após os 50 DAP, com valores médios de 5,0  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para o tratamento com plantas de eucalipto que foi utilizado o fertilizante ureia com a presença do DCD e 31,3  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  sem a presença do DCD. A emissão reduzida de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo nos dias seguintes a adubação pode estar diretamente relacionada a forma localizada de aplicação do fertilizante (IBARR, 2020). Segundo KHALIL et al., 2009 é necessário um maior período de tempo para que o fertilizante nitrogenado aplicado em profundidade seja liberado e difundido no solo na forma de

N, onde a microbiota do solo leva maior tempo para se adaptar a alta concentração, provocando um atraso nos processos de transformação do N. Foi possível observar que o aumento na emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  também está ligado ao aumento na temperatura, até cerca dos 92 dias após a adubação. Os menores fluxos de emissão foram encontrados nos tratamentos com a presença do inibidor (DCD), com médias de 15,0 a 61,0  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ . Já os maiores fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$  ocorreram nos tratamentos sem a presença do inibidor (DCD), estando concentrados entre os dias 42 a 86, sendo o maior pico (1612,80  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) observado aos 65 DAP. Diferentemente, entre o 92 dias e 185 DAP a emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  não esteve, necessariamente, ligada a variações na temperatura. Entre 92 e 117 DAP, houve aumento de temperatura (cerca de 9 °C) com redução observada no fluxo de  $\text{N}_2\text{O}$ , enquanto entre o 117 ao 155 DAP ocorreu um pico, seguido de redução na emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  que, aparentemente, atingiu níveis basais no 185º dia, apesar do aumento progressivo da temperatura neste mesmo intervalo (subindo de cerca de 18°C no 127 ASP dia e atingindo valores acima de 30°C até o 185º dia,(Figura 8).

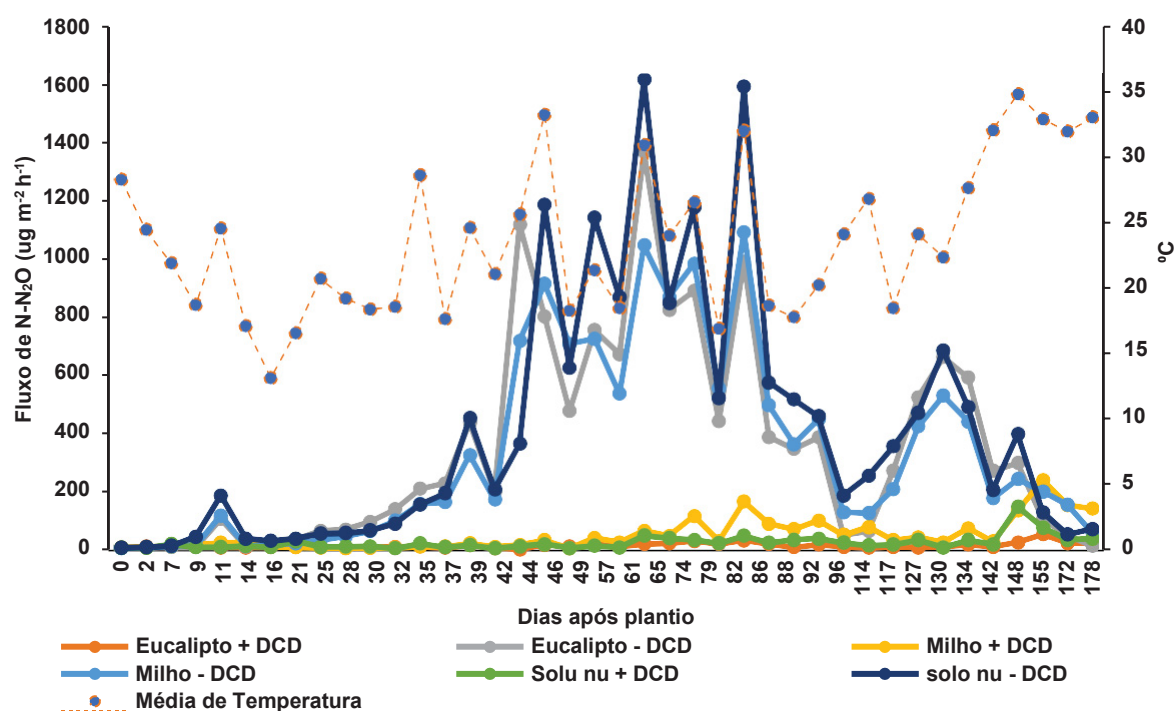


Figura 8 Fluxo de  $\text{N-N}_2\text{O}$  medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.

Dados gerados a partir do fluxo do gás  $\text{N}_2\text{O}$  e variações de temperatura dentro da câmara de coleta ao longo de 185 dias, em um Cambissolo húmico após transplante de mudas do híbrido *Eucalyptus Urograndis* (I144) e semeadura de um híbrido de Milho DKB 290 conforme legenda, em vasos de 200L em casa de vegetação, adubadas com ureia na presença ou ausência de dicianodiamida, super fosfato triplo e cloreto de potássio. Embrapa florestas, Colombo-Pr, 2018-2019.

Fonte: O autor

Os fluxos de  $\text{CO}_2$  variaram de 30,95 a 267,91  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 96,41  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para o tratamento “Eucalipto + DCD”. No tratamento “Eucalipto – DCD” foi notado variações entre 30,13 a 304,64  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 108,90  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Já o tratamento “Milho + DCD” foi possível observar variações entre 35,88 a 170,67  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 85,43  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

Para o tratamento “Milho – DCD” foi observado valores entre 47,89 a 163,68  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com valores médios entre 93,76. O tratamento “Solo-nu + DCD” variou entre 21,80 a 152,92  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 67,43  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tratamento “Solo-nu – DCD” apresentou valores que variaram de 33,33 a 179,77  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de 81,04  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ao longo dos 185 dias de avaliação (Figura 9).

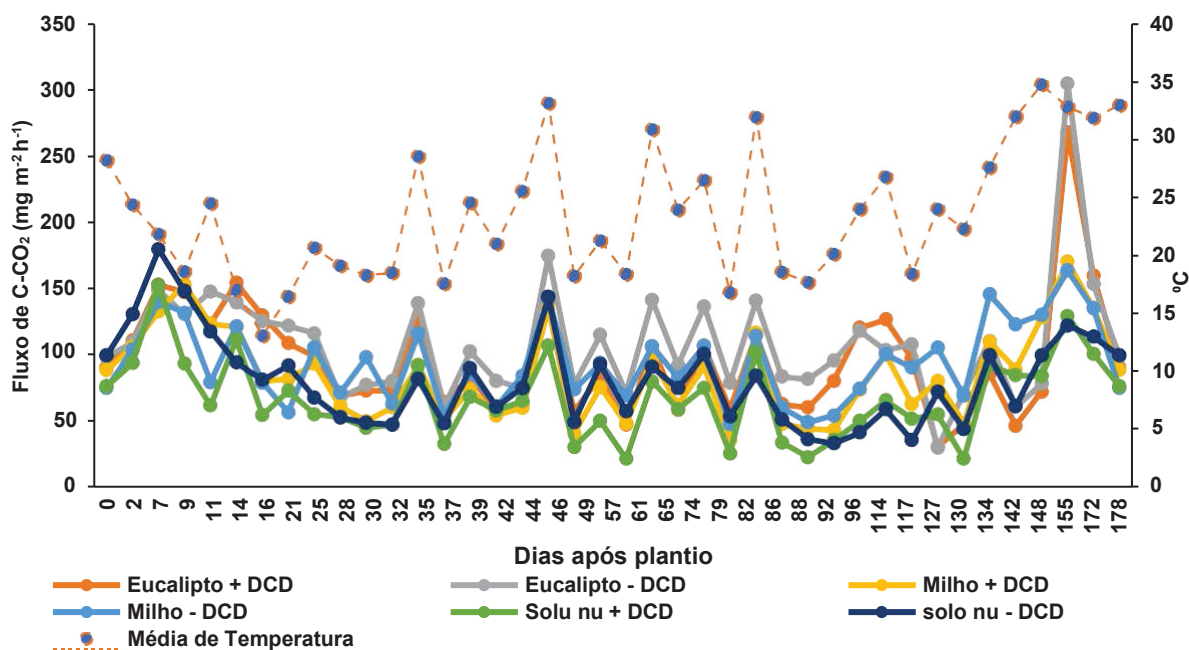


Figura 9 Fluxos de  $\text{C-CO}_2$  medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.

Dados gerados a partir dos fluxos do gás  $\text{CO}_2$  e variações de temperatura dentro da câmara de coleta ao longo de 185 dias, em um Cambissolo húmico após transplantio de mudas do híbrido *Eucalyptus Urograndis* (I144) e semeadura de um híbrido de Milho DKB 290 conforme legenda, em vasos de 200L em casa de vegetação, adubadas com ureia na presença ou ausência de dicianodiamida, super fosfato triplo e cloreto de potássio. Embrapa florestas, Colombo-Pr, 2018-2019.

Fonte: O autor

Nos fluxos de  $\text{CH}_4$  foram encontrados valores de -1,42 a -21,75  $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de -8,51  $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para o tratamento “Eucalipto + DCD”. No tratamento “Eucalipto - DCD” foi notado variações entre -1,79 a -32,66  $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

$\text{h}^{-1}$  com médias de  $-9,34 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Já o tratamento “Milho + DCD” foi possível observar variações entre  $-4,94$  a  $-17,50 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de  $-10,27 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Para o tratamento “Milho – DCD” foi observado valores entre  $-5,47$  a  $-15,11 \text{ mg C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com valores médios entre  $-10,20$ . O tratamento “Solo-nu + DCD” variando entre  $-6,03$  a  $-19,40 \text{ mg C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de  $10,34 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tratamento “Solo-nu -DCD” apresentou valores que variaram de  $-4,47$  a  $-19,34 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  com médias de  $-9,51 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ao longo de 185 dias, os valores de fluxos finais obtidos para  $\text{CH}_4$ , sofreram redução ao longo dos tempos amostrados (correlação inversa e valor de coeficiente angular negativo). Estes valores negativos sugerem uma captação (consumo) de  $\text{CH}_4$  no solo. (Figura10).

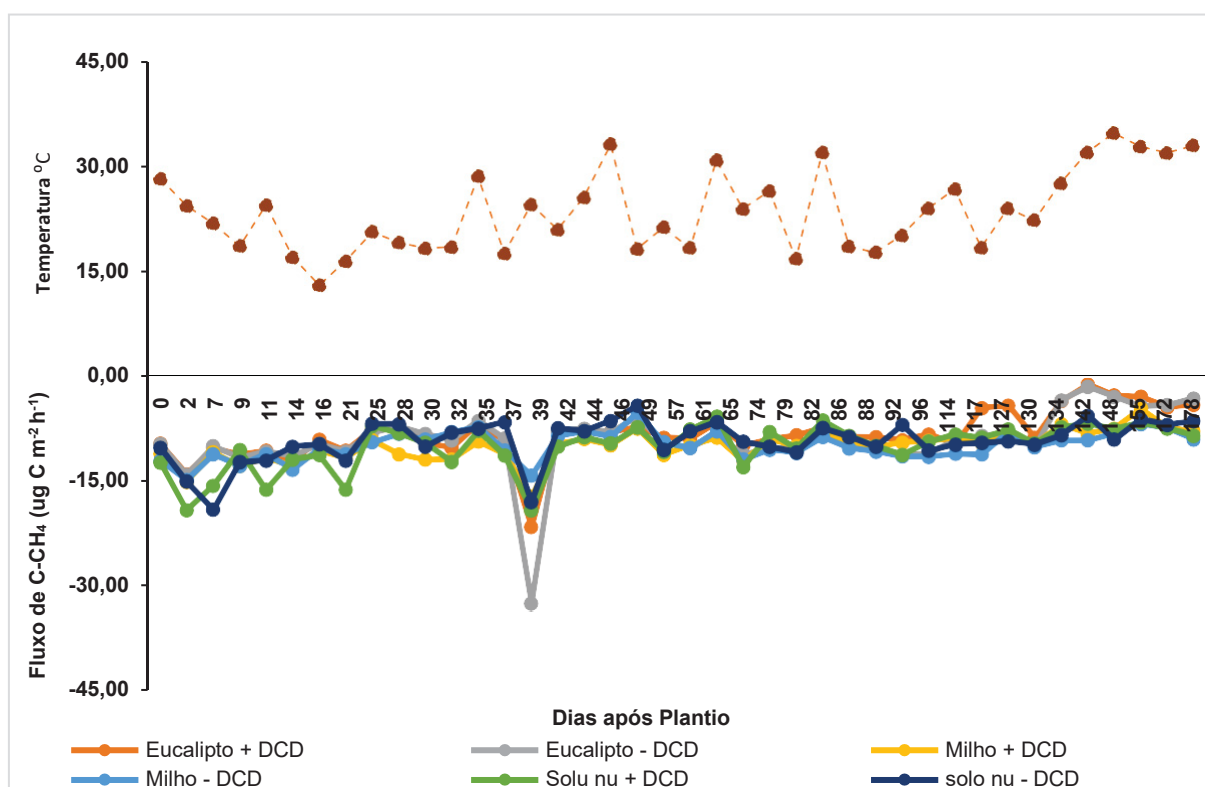


Figura 10 Fluxos de  $\text{CH}_4$  medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.

Dados gerados a partir dos fluxos do gás  $\text{CH}_4$  e variações de temperatura dentro da câmara de coleta ao longo de 185 dias, em um Cambissolo húmico após transplante de mudas do híbrido *Eucalyptus Urograndis* (I144) e semeadura de um híbrido de Milho DKB 290 conforme legenda, em vasos de 200L em casa de vegetação, adubadas com ureia na presença ou ausência de dicianodiamida, super fosfato triplo e cloreto de potássio. Embrapa florestas, Colombo-Pr, 2018-2019.

Fonte: O autor

Os fluxos de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  não se diferenciaram entre os tratamentos para aplicação de DCD, apresentando comportamentos de oscilações de médias entre “66 a 108  $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ” para  $\text{CO}_2$  e “-16 a -20  $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ” para  $\text{CH}_4$ , acompa-

nhando as oscilações de temperaturas no período dos 185 dias amostrados. (Figuras\_9 e 10). Corroborando com as observações de IQBAL et al. 2008, 2009 e COSTA et al. 2008, a relação formada entre altas temperaturas maiores que 5°C e menores que 40°C do solo (LEWIS, 1986) e as variações nas emissões de N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> explicam a influência sazonal nas diferenças de fluxos (Zang & Han, 2008), onde é estimulada a respiração do solo e também aumentando os sítios de anaerobiose podendo ocorrer a desnitrificação (SIGNOR & CERRI, 2013). Segundo ZANATTA, 2010; MOCHIZUKI et al., 2012, o consumo reduzido de CH<sub>4</sub> do solo causado pela da adubação nitrogenada é decorrente do efeito inibitório do amônio, onde em nosso estudo não observamos este fator, devido os tratamentos com e sem inibidor de nitrificação não apresentaram diferenças significativas em seus fluxos de CH<sub>4</sub>.

## 5.2 EMISSÃO ACUMULADA DOS GASES COLETADOS

A emissão acumulada de gases foi também analisada, através da integração dos fluxos observados, utilizando-se a metodologia de interpolação linear entre os pontos de coleta consecutivos, considerando a área abaixo dos gráficos para os intervalos de amostragem (Figura 11A, B, C).

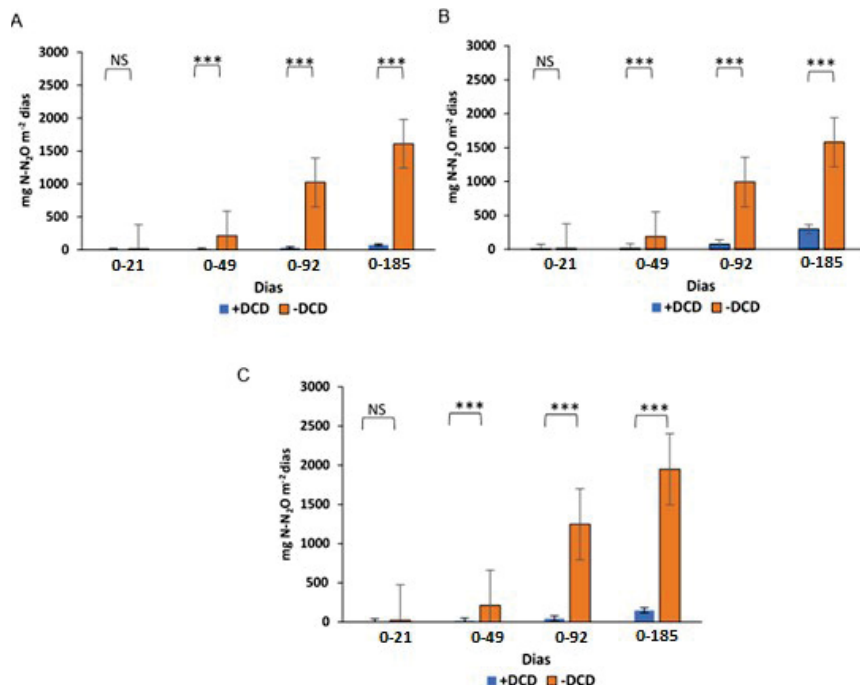


Figura 11 Emissão Acumulada do Gás N<sub>2</sub>O. medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.

Emissão acumulada do gás N<sub>2</sub>O ao longo dos dias amostrados, em um Cambissolo húmico após transplante de mudas do híbrido *Eucalyptus urograndis* (I144) e semeadura de um híbrido de Milho DKB 290 em vasos de 200L onde o fertilizante ureia foi incorporado ao solo na presença ou na ausência do inibidor de nitrificação. Dicianodiamida (DCD), sendo realizada análise estatística “Anova” pelo software R. “A” Eucalypto, “B” Milho e “C” Solo nú, referente a 4 períodos 0-21, 0-49, 0-92, 0-185 dias na presença do inibidor de nitrificação em cor azul e na ausência do inibidor nitrificação na cor vermelha. Signif. codes: ‘\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*’ 0.01 ‘\*’ 0.05

Considerando o perfil para o gráfico de emissão do gás  $N_2O$ , para os tratamentos onde não houve aplicação de DCD, as comparações foram realizadas considerando-se quatro intervalos de amostragem: i) 0 ao 21º dias, onde as emissões de  $N_2O$  se mantiveram em níveis basais; ii) 0 ao 49º dias, intervalo que demonstra a elevação de temperatura e aumento progressivo na emissão de  $N_2O$  nos tratamentos sem aplicação de  $N_2O$ ; iii) 0 ao 92 dias, intervalo onde as emissões de  $N_2O$  alcançaram os níveis mais elevados variando em função da temperatura, nos tratamentos sem aplicação de DCD e; iv) 0 ao 185º dias, intervalo que demonstra todo o comportamento dos gases até o declínio na emissão de  $N_2O$  para o seu nível basal, observado nos tratamentos com aplicação de DCD (Figura\_11 A, B e C).

A emissão acumulada no final dos 185 dias foi de 28802,93 mg N- $N_2O$  m<sup>-2</sup> para o tratamento Solo nu -DCD onde se destacou dos demais tratamentos, seguido do tratamento Eucalipto -DCD com valores de 23843,07 mg N- $N_2O$  m<sup>-2</sup> e o Milho -DCD apresentou valores de emissão acumulada próximo de 22999,76 mg N- $N_2O$  m<sup>-2</sup> confirmando o poder de mitigação dos gases do efeito estufa na inibição da desnitrificação sendo observado valores de 1444,4 mg N- $N_2O$  m<sup>-2</sup> no tratamento Solo nu +DCD 2570,6 mg N- $N_2O$  m<sup>-2</sup>, no tratamento Milho +DCD e de 868,56 mg N- $N_2O$  m<sup>-2</sup>. Estes mesmos intervalos foram também utilizados para análises das emissões dos demais gases ( $CO_2$  e  $CH_4$ ).

Considerando a cobertura do solo, não foi observado diferença estatística para emissão de  $CO_2$  em Eucalipto ou plantado com milho, quando comparados os tratamentos com e sem aplicação de DCD. Somente para Solo nu foi observado diferença estatística (mas com valores de  $p=0,01$  nos intervalos de 0-49, 0-92 e nos intervalos de 0-185  $p=0,05$ ), para os intervalos analisados de 0-21, 0-49, 0-92 e 06-185, havendo maior emissão de  $CO_2$  nos tratamentos sem aplicação de DCD (Figura\_12A, B e C).

Os dados gerados pelo cálculo da emissão acumulada de  $N_2O$  ao longo dos 185 dias foram extrapolados para kg/ha no período e ano do experimento dando uma ideia do potencial de mitigação do inibidor de desnitrificação Dicianodiamida (DCD) dados apresentados na Tabela 2, onde foi observado uma redução de 95,62 % no tratamento Eucalipto +DCD em relação ao tratamento sem a adição do DCD corroborando com IBARR, 2020 que encontrou a mesma porcentagem de redução em

seu experimento com Eucalipto e fertilizantes de eficiência aumentada.

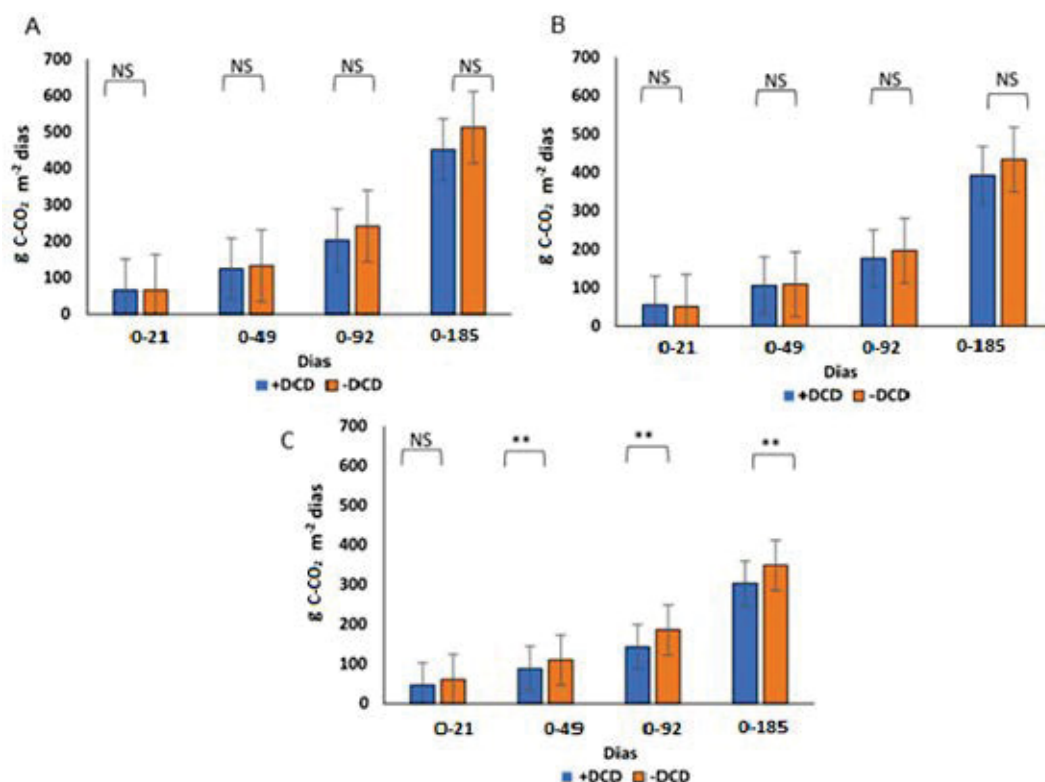


Figura 12 Emissão Acumulada do Gás CO<sub>2</sub> medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.

Emissão acumulada do gás CO<sub>2</sub> ao longo dos dias amostrados, em um Cambissolo húmico após transplantio de mudas do híbrido *Eucalyptus urograndis* (1144) e semeadura de um híbrido de Milho DKB 290 em vasos de 200L onde o fertilizante ureia foi incorporado ao solo na presença ou na ausência do inibidor de nitrificação. Dicianodiamida (DCD), sendo realizada análise estatística “Anova” pelo software R. “A” Eucalipto, “B” Milho e “C” Solo nú, referente a 4 períodos 0-21, 0-49, 0-92, 0-185 dias na presença do inibidor de nitrificação em cor azul e na ausência do inibidor nitrificação na cor vermelha. Signif. codes: ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05

Fonte: O autor

Para emissão de CH<sub>4</sub> acumulada, não foi observado nenhuma diferença significativa, quando comparados os tratamentos com e sem aplicação de DCD e considerando a cobertura do solo nos intervalos analisados (Figura\_13A, B e C). Apenas no período inicial 0 a 21 dias dos seguintes tratamentos: Eucalipto, Milho, Solo-nu, não houve diferença significativa para as condições “Com-DCD” e “Sem-DCD”, podendo ser notado diferença significativa para os demais períodos.

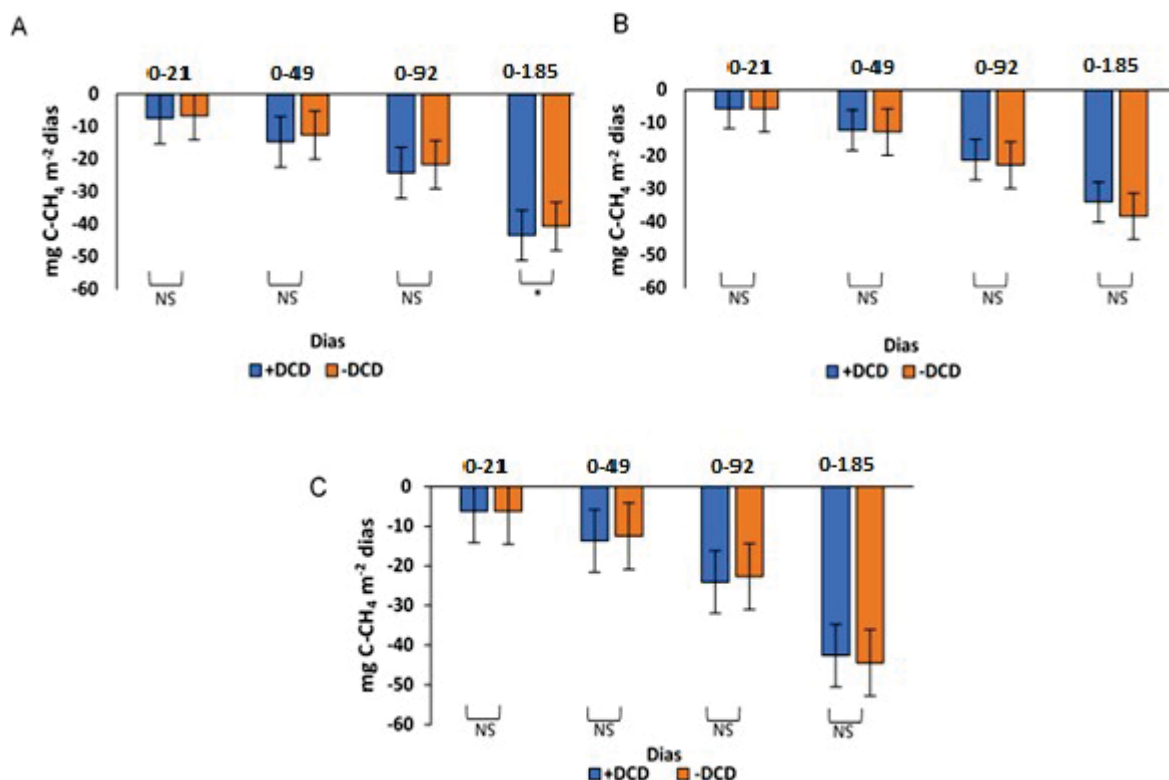


Figura 13 Acumulado do Gás CH<sub>4</sub> medido em solo submetido a diferentes tipos de cobertura e aplicação de DCD em condições de casa de vegetação.

Emissão acumulada do gás CH<sub>4</sub> ao longo dos dias amostrados, em um Cambissolo húmico após transplante de mudas do híbrido *Eucalyptus urograndis* (I144) e semeadura de um híbrido de Milho DKB 290 em vasos de 200L onde o fertilizante ureia foi incorporado ao solo na presença ou na ausência do inibidor de nitrificação, Dicianodiamida (DCD), sendo realizada análise estatística “Anova” pelo software R. “A” Eucalipto, “B” Milho e “C” Solo nú, referente a 4 períodos 0-21, 0-49, 0-92, 0-185 dias na presença do inibidor de nitrificação em cor azul e na ausência do inibidor nitrificação na cor vermelha. Signif. codes: ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05

Fonte: O autor

Já o acumulado do gás CO<sub>2</sub> não apresentou diferença significativa para os tratamentos Eucalipto e Milho ambos “Com-DCD e Sem-DCD” já o tratamento Solo-nu apresentou resultado similar aos tratamentos anteriores somente no período 0-21 e nos demais 25 a 49, 57 a 92 e 96 a 185 houve diferença significativa.

Ao observar o acumulado dos períodos analisados na Tabela 13 tanto o Milho “Tabela 13B” e o Solo-nu “Tabela 13C” não apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos “Com-DCD” e “Sem-DCD” diferentemente do Eucalipto “Tabela 13A” que apresentou diferença significativa no período 96 a 185 dias provavelmente possa ter ocorrido alguma perturbação do meio neste período.

Estudos indicam que aplicação de inibidores de nitrificação DCD e outros inibidores como o DMPP podem reduzir a emissão de gases NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, NO, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> a partir do solo (Yang et.al, 2016), e que as práticas de cultivo e de manejo causam perturbações no solo afetando as suas propriedades químicas, físicas e

biológicas, e, portanto, exercem influência na liberação de GEE (BAGGS E BLUM, 2004; OORTS ET AL., 2007), assim como as precipitações, e a temperatura do solo. O fator DCD influenciou significativamente a emissão anual de N<sub>2</sub>O dos tratamentos avaliados. Verifica-se que os tratamentos com a adição de DCD diferiram dos tratamentos sem a adição de DCD. O possível aumento nas concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (dado não analisado) nos 30 dias após a adubação proporcionou maiores emissões e, por conseguintes maiores valores de emissão acumulada (12 A, B e C e Figura suplementar 4) e não apresentando significativa diferenciação entre tratamentos para os acumulados de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (Figura Suplementar 5 e 6). A emissão acumulada nos primeiros 60 dias correspondeu em média a 23% das emissões acumuladas anuais para os tratamentos sem a presença do DCD e 11% nos tratamentos com DCD, contrastando com Arenhardt, 2016 avaliando lavouras de trigo e milho.

**Tabela 2 Dados da emissão acumulada extrapolados para kg/ha no período de 1 ano.**

A) N<sub>2</sub>O

| Cobertura  | µg N-N <sub>2</sub> O m <sup>2</sup> /185 dias | kg N/ha/185 dias | Kg N/ha/dia | kg N/ha/ano* | % REDUÇÃO <sup>1</sup> |
|------------|------------------------------------------------|------------------|-------------|--------------|------------------------|
| Euca +DCD  | 70983,61                                       | 0,709836         | 0,0038      | 1,40         | 95,62                  |
| Euca -DCD  | 1627372,12                                     | 16,27372         | 0,0879      | 32,02        |                        |
| Milho +DCD | 285758,40                                      | 2,857584         | 0,0154      | 5,62         | 81,71                  |
| Milho -DCD | 1562021,55                                     | 15,62022         | 0,0844      | 30,73        |                        |
| Solo +DCD  | 150634,85                                      | 1,506349         | 0,0081      | 2,96         | 91,83                  |
| Solo -DCD  | 1841692,58                                     | 18,41693         | 0,0995      | 36,24        |                        |

B) CO<sub>2</sub>

| Cobertura  | mg C/m <sup>2</sup> /185dias | kg C/ha/185 dias | kg C /ha/dia | kg C/ha/ano* | % REDUÇÃO <sup>1</sup> |
|------------|------------------------------|------------------|--------------|--------------|------------------------|
| Euca +DCD  | 449777,30                    | 2,43122          | 24,3122      | 8873,98      | 12,43                  |
| Euca -DCD  | 513638,07                    | 2,776422         | 27,7642      | 10133,94     |                        |
| Milho +DCD | 403910,72                    | 2,183301         | 21,8330      | 7969,05      | 7,53                   |
| Milho -DCD | 434339,41                    | 2,347780         | 23,4778      | 8569,40      |                        |
| Solo +DCD  | 280956,92                    | 1,518686         | 15,1868      | 5543,20      | 15,24                  |
| Solo -DCD  | 331465,10                    | 1,791703         | 17,9170      | 6539,72      |                        |

C) CH<sub>4</sub>

| Cobertura  | mg C/ m <sup>2</sup> /185dias | kg C/ha/185 dias | kg C/ha/dia | kg C/ha/ano * | % REDUÇÃO <sup>1</sup> |
|------------|-------------------------------|------------------|-------------|---------------|------------------------|
| Euca +DCD  | -33,78                        | -0,33783         | -0,00182    | -0,67         | 10,67                  |
| Euca -DCD  | -38,15                        | -0,38151         | -0,00206    | -0,75         |                        |
| Milho +DCD | -42,28                        | -0,42289         | -0,00228    | -0,83         | 5,68                   |
| Milho -DCD | -44,63                        | -0,44635         | -0,00241    | -0,88         |                        |
| Solo +DCD  | -40,88                        | -0,40882         | -0,00220    | -0,80         | 7,32                   |
| Solo -DCD  | -41,87                        | -0,41875         | -0,00226    | -0,82         |                        |

\*ano referência 365 dias

<sup>1</sup> = porcentagem de redução foi calculada da seguinte forma o tratamento - DCD subtraído do tratamento +DCD o resultado foi dividido pelo tratamento +DCD e por final multiplicado por 100 % redução acumulada utilizando DCD.

O Potencial de aquecimento global parcial (PAGp) calculado em kg CO<sub>2</sub>eq ha<sup>-1</sup> para o acumulado de N-N<sub>2</sub>O e C-CH<sub>4</sub> em kg ha<sup>-1</sup> ano esta demonstrado na (Tabela 3).

| Tabela 3 Cálculo de PAGp do Acumulado de N-N <sub>2</sub> O e C-CH <sub>4</sub> |                                             |                                            |                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Cobertura                                                                       | kg N-N <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> ano* | kg C-CH <sub>4</sub> ha <sup>-1</sup> ano* | PAGp kg CO <sub>2</sub> eq ha <sup>-1</sup> |
| Euca +DCD                                                                       | 0,71                                        | -0,34                                      | 400,45                                      |
| Euca -DCD                                                                       | 16,27                                       | -0,38                                      | 7666,96                                     |
| Milho +DCD                                                                      | 2,86                                        | -0,42                                      | 1654,01                                     |
| Milho -DCD                                                                      | 15,62                                       | -0,44                                      | 9135,54                                     |
| Solo +DCD                                                                       | 1,51                                        | -0,41                                      | 862,08                                      |
| Solo -DCD                                                                       | 18,41                                       | -0,42                                      | 10779,02                                    |

Foram identificadas diferenças no PAGp dos tratamentos que receberam no fertilizante nitrogenado à adição do inibidor de nitrificação em relação aos tratamentos sem o DCD. Alcançando os valores próximos ao de Camargo (2015) que avaliou o PAGp em lavouras de arroz irrigado, e nos dá uma perspectiva do quanto o DCD é capaz de reduzir o PAGp de maneira direta, reduzindo a emissão do N-N<sub>2</sub>O.

### 5.3 MEDIDAS BIOMÉTRICAS

As medidas de altura e diâmetro das mudas de eucalipto foram obtidas antes da fertilização e em períodos mensais, até o termino do experimento. (Figura-14).

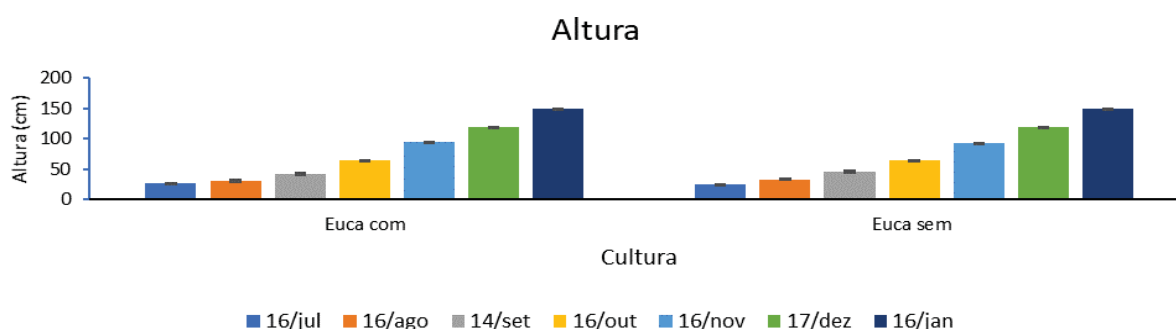


Figura 14 Altura das Plantas de Eucalipto ao longo dos 185 dias amostrados em casa de vegetação e submetido a tratamentos com DCD.

"Euca com"=Eucalipto com DCD e "EUCA sem"= Eucalipto sem DCD.

O milho nos primeiros 15 dias sofreu com a queda de temperatura e o mesmo apresentou deficiência de fósforo apresentando folhas avermelhadas, provocando o atraso e mal o desenvolvimento da planta, não desenvolvendo espigas, fato que impossibilitou mensurar sua produção. A deficiência de fósforo ocorreu em toda

parcela contendo milho como cobertura, não apresentando diferença entre tratamentos com a presença do inibidor de nitrificação e sem a presença do inibidor de nitrificação.

Não foi observado diferenças significativas no incremento periódico (IP) mensal (Figura 15), nem alterações visuais na coloração das folhas do Eucalipto em solo com e sem a presença do inibidor DCD, este comportamento também foi relatado (FERREIRA & STAPE, 2009; PULITO et al., 2015; BASSACO et al., 2018). Em florestas plantadas de eucalipto no Brasil onde o solo tem a capacidade de suprir a demanda de nitrogênio da cultura dispensando a utilização do N-fertilizante (GONÇALVES et al., 2004), solos com elevado teor de matéria orgânica apresentam elevado potencial de mineralização de nitrogênio (PARRON, 2003; PULITO et al., 2015).

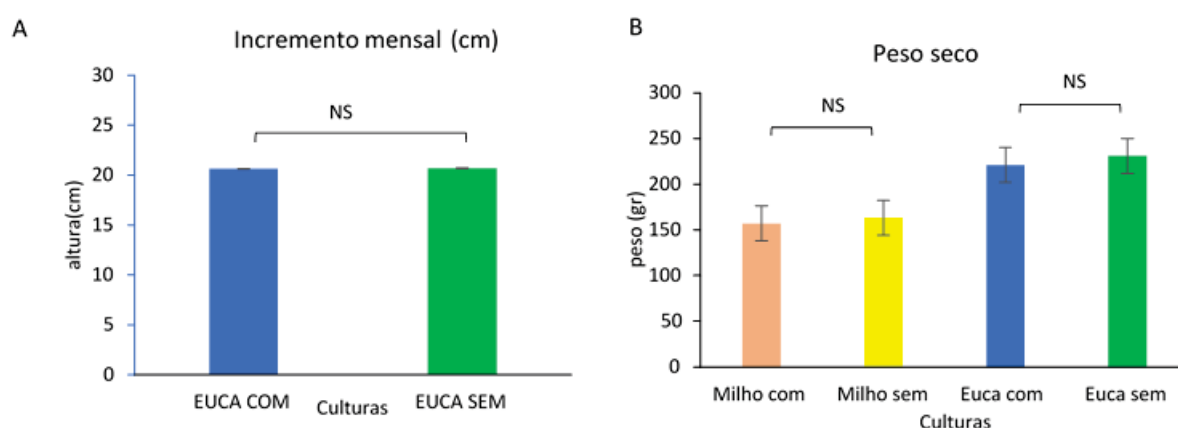


Figura-15: Incremento médio mensal do Eucalipto e Peso seco do Eucalipto e Milho ao longo de 185 dias de cultivo em casa de vegetação e submetido a tratamentos com DCD.

A= Incremento mensal em "cm" das plantas de Eucalipto sendo "EUCA COM" Eucalipto + DCD e "EUCA SEM" Eucalipto -DCD ao longo dos 185 dias amostrados e B= Peso seco das amostras de "EUCA COM" Eucalipto + DCD e "EUCA SEM" Eucalipto -DCD e "Milho com" Milho +DCD e M após o término do experimento.

Alguns autores relatam efeitos fitotóxicos, incluindo a redução da folha, a clorose, a necrose e uma redução no rendimento da biomassa dependendo da dose de DCD utilizada (SOMMER & ROSSIG, 1978; MAFTOUN & SHEIBANY, 1979; REEVES & TOUCHTON, 1986; MACADAM et al., 2003). No entanto, a gravidade destes sintomas varia com as espécies de plantas e com a taxa de aplicação do DCD (REEVES & TOUGHTON, 1986). Não foi encontrado na literatura, trabalhos relacionando efeitos fitotóxicos em eucalipto quando se utiliza o inibidor DCD.

#### 5.4 ANÁLISE DO MICROBIOMA DO SOLO

O microbioma do solo foi analisado em três diferentes pontos de amostragem, considerando o padrão de emissão de N<sub>2</sub>O sendo escolhido os pontos mais discrepantes, principalmente, para os tratamentos sem a adição de DCD (Figura 8).

Amostras submetidas ao sequenciamento do amplicon do gene 16S rRNA foram coletadas nos dias 0, 46 e 185, para os tratamentos de cobertura Solo-nu, eucalipto e milho e para os tratamentos com e sem adição de DCD. Cinco replicatas foram coletadas para cada tratamento, totalizando 90 amostras. As amostras de solo coletadas nos dias 0, 46 e 185 foram submetidas a extração de DNA metagenômico, seguido da amplificação (Figura Suplementar1\_GelPcr A e B) e sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA.

A região variável V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada a partir do DNA metagenômico usando a estratégia de sequenciamento *pair-end*, onde são sequenciadas ambas as fitas do DNA em direções opostas (denominadas R1 e R2).

Esta estratégia permite obter um par de sequências com sobreposição para cada amplicon. A qualidade das sequências R1 e R2 para cada posição de base é mostrada na (Figura 16). É possível observar grande variação na qualidade das bases, sendo que as regiões aproximadas de 1 a 115 bases apresentaram valores de qualidade inferiores destacados com a reta vermelha (Figura 16). Desta forma, foi necessário reduzir o comprimento das sequências, somente as pontas 5' das sequências R1 e R2 (as pontas 3' não foram removidas). Foram realizados um total de 12 testes, variando o comprimento das extremidades removidas. Em seguida, as sequências foram submetidas a filtros de qualidade, correção para erros de sequenciamento na plataforma Illumina, sobreposição do par de sequências amplicon (montagem) e presença de sequências quiméricas.

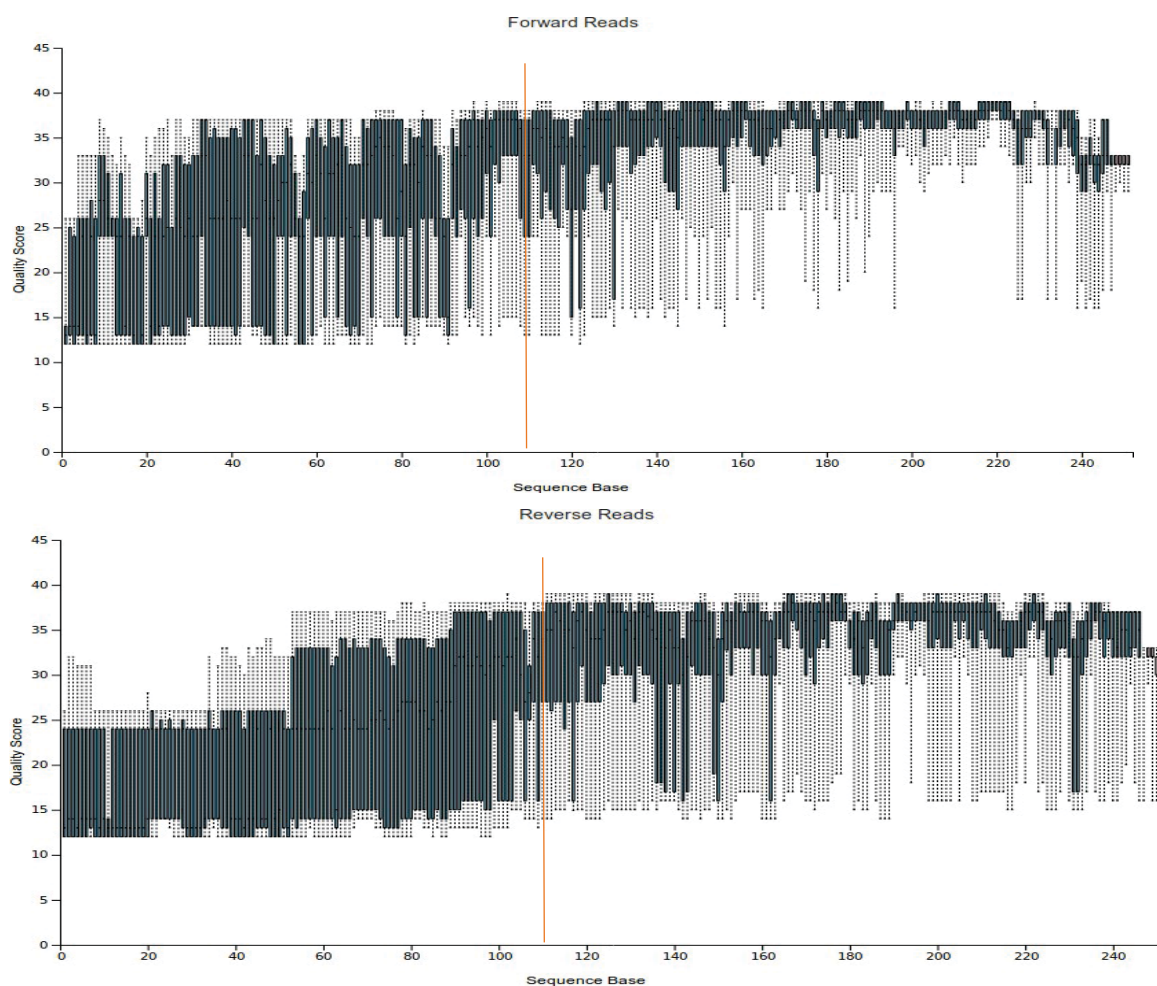


Figura-16 . Distribuição das qualidades de bases por posição nas leituras de seqüências amplicons do gene 16S RNA.

Os gráficos mostram as distribuições de qualidade para as leituras de seqüências diretas (R1, acima) e reversas (R2, abaixo); foram analisadas um total de 8.282.429 leituras de seqüências obtidas por sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq; a análise foi realizada com o programa dada2 no pacote qiime2. Fonte: O autor

O melhor resultado foi obtido para poda nas primeiras 115 bases das extremidades 5' das seqüências R1 e R2 "Teste 10"(Tabela-suplementar1), que recuperou, em média, 74% dos pares de seqüências não-quiméricas nas amostras, sendo então usado para as análises subsequentes (Tabelas suplementar 2 e 3).

As seqüências foram geradas para um total de 90 amostras e a distribuição de frequência por amostra é mostrado na Figura 17, A, B, C e D.

Uma única amostra apresentou mais de 500.000 seqüências, comparada com as demais apresentando menos de 170.000 seqüências, com médias em torno de 66.900 seqüências por amostra totalizando 6.247.354 seqüências (Figura 20A).

Devido a esta variação observada no número de sequências por amostra, foi necessário normalizar os dados, padronizando o número de sequências por amostra em 5.900, sendo descartadas 6 amostras (20, 39, 42, 47, 87 e 73) que apresentaram um número muito reduzido, abaixo de 150 sequências. As amostras descartadas estão distribuídas entre os diferentes tratamentos, não causando tendências nas análises subsequentes (Figura 17B, C e D).

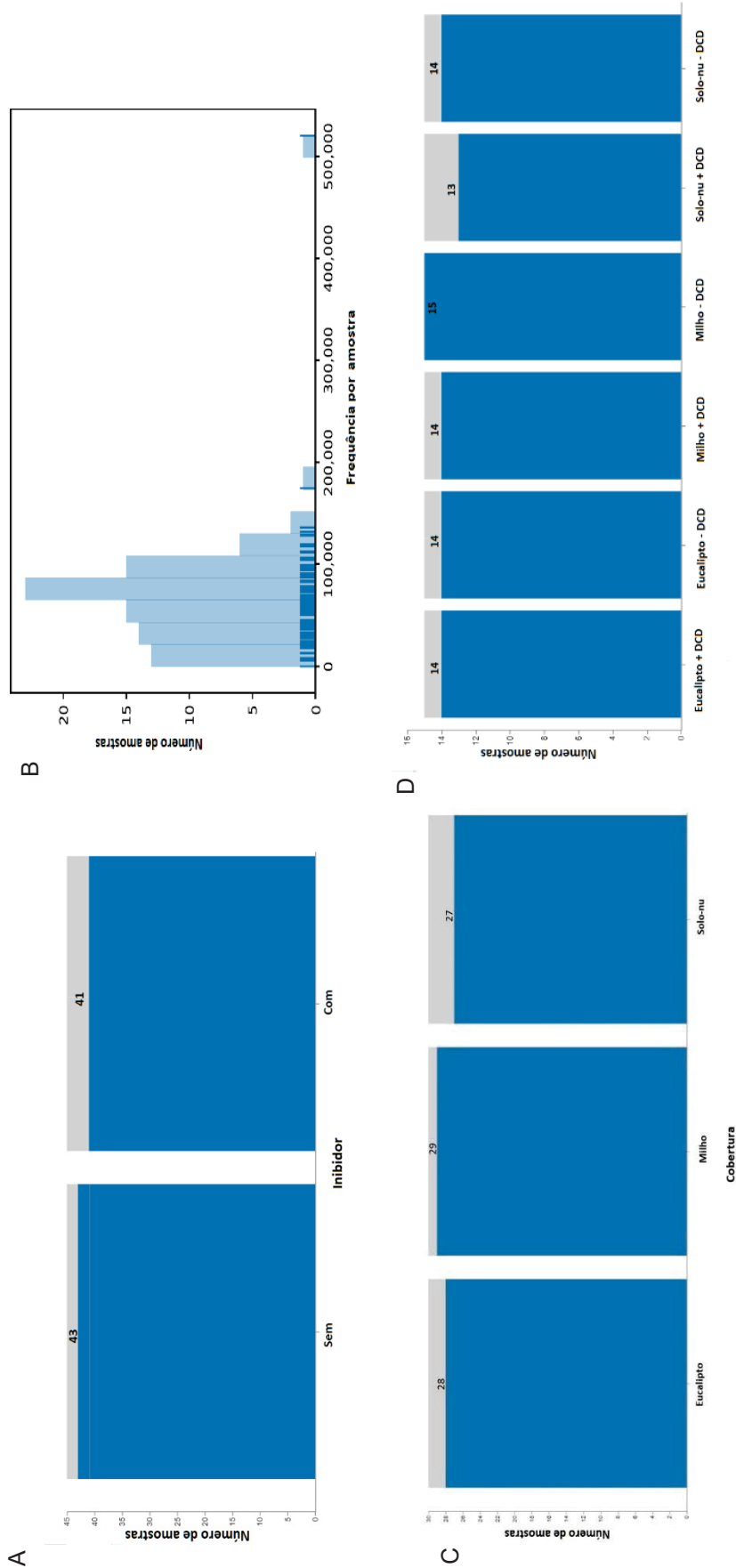


Figura 17 Distribuição de amostras para as sequências amplicons do gene 16S rRNA.

Distribuição de sequências amplicons do gene 16S rRNA e retenção de amostras para análise do microbioma do solo gerado pelo programa Qiime2. **(A)** Distribuição do número de sequências em relação às amostras; linhas verticais em azul na abscissa representam as frequências de sequências obtidas para cada amostra; **(B)** distribuição das amostras em relação a cobertura do solo; **(C)** distribuição das amostras em relação a aplicação de DCD no solo; **(D)** distribuição das amostras em relação aos tratamentos de cobertura do solo e aplicação de DCD; nos gráficos das figuras **B**, **C** e **D**, a porção em azul das barras representam o número de amostras, em cada classe, retidas para análise a porção em cinza o número de amostras descartadas em função do baixo número de sequências obtidas; um total de 90 amostras foram submetidas ao sequenciamento dos amplicons da região V4 do gene 16S rRNA.

Fonte: O autor

A curva de rarefação das amostras, sugere que a riqueza de OTU não foi atingida, mas que há uma tendência a estabilização, sendo que o ponto com 5.900 sequências por amostra já indica representatividade das amostradas em relação a riqueza de OTU. Isto foi observado para as amostras agrupadas em relação aos tratamentos (Figura18) e também em relação a cada uma das 90 amostras individualmente (dado não amostrado).

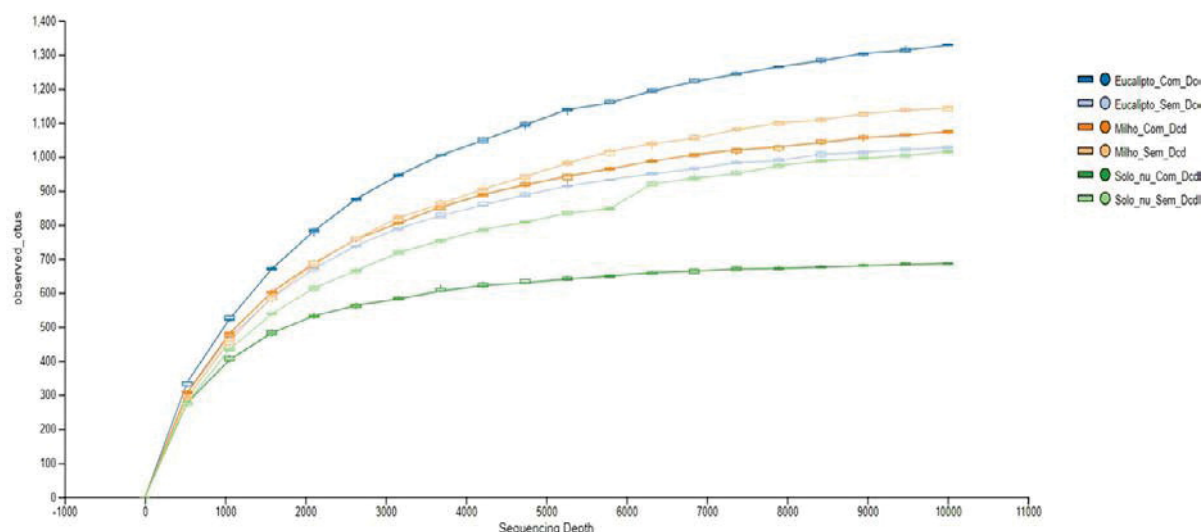


Figura 18 Curva de Rarefação das amostras de solo a partir das sequências de amplicons 16S rRNA em função da riqueza de OTU.

Amostras de solo submetidas a diferentes tratamentos para cobertura vegetal e aplicação de DCD. As OTU são representadas por sequências com 100% de identidade (ASV); a rarefação foi obtida para um máximo de 10.000 sequências, com 20 sub-amostragens (adição de 500 sequências por sub-amostragem).

Fonte: O autor

Esta pré-análise gerou um total de 19.316 sequências únicas distribuídas entre as amostras. A sequência única mais representada possui uma frequência de 130.602, distribuída entre 67 das 90 amostras. Em contrapartida, a sequência única com maior cobertura entre as amostras, ocorrendo em 85 das 90 amostras, possui uma frequência de 25.033. A identificação taxonômica destas sequências únicas com alta frequência entre as amostras, através de busca por similaridade com o programa BLASTn, contra o banco de dados NCBI nr (dezembro de 2019), mostrou 100% de identidade na região comparada com *Brevundimonas faecalis* e uma bactéria não cultivável de “paddy soil”, respectivamente. Outras sequências únicas com frequência acima de 40.000 identificadas foram: *Sporosarcina* sp. strain ASB-223 (MK515045), ocorre em 68 amostras; Uncultured bacterium clone GS 7646G06 (KU883899), ocorre em 77 amostras; *Sporosarcina koreensis* strain 9-CIP-1 (MH894239), ocorre em 60

amostras; *Bacillus* sp. Strain 206456 (MN726732), ocorre em 81 amostras; *Pseudarthrobacter oxydans* strain SC6 (MN727115), ocorre em 80 amostras; *Sporosarcina* sp. strain SNH-K66 (MN493916), ocorre em 69 amostras; e Uncultured bacterium clone OTU360\_sMFC\_WM1\_BS.33794 (MH989948), ocorre em 83 amostras. Por outro lado, algumas sequências únicas com alta frequência, apareceram em poucas amostras. De forma geral, as 267 sequências únicas mais representadas somam 3.123.820, 50% do total de sequências obtidas, indicando que somente 1,4% é altamente predominante entre as amostras. Por outro lado, 67% das sequências únicas ocorrem somente uma ou duas vezes.

#### **5.4.1 Alfa e beta diversidade**

O gráfico de rarefação (Figura 18) mostra a abrangência do sequenciamento em relação a riqueza de espécies (OTUs), a distância entre as curvas representando cada tratamento foram próximas, não ressaltando a diferença entre o número de OTUs dos tratamentos para cobertura do solo (Eucalipto, Milho e Solo-nu), quando comparados em relação a aplicação de DCD (Com e Sem DCD). Tal resultado reforça a hipótese que há variabilidade da diversidade do solo devido a cobertura nele presente, e a mesma não foi alterada devido à presença do Inibidor de desnitrificação podendo observar um comportamento que não justifica a variação da diversidade em relação a presença ou não do DCD com p-valor maior que 0,1 e sim pela cobertura do solo.

Para testar a existência de associações entre dados categóricos e a alfa diversidade nas amostras, o teste de Kruskal-Wallis foi realizado usando as métricas de alfa diversidade para riqueza de OTU, Shannon e Faith PD. A variação nas amostras é mostrada na (Figura 19) através de gráficos boxplot para os tratamentos, através das diferentes métricas de diversidade alfa. Não foi observado associação estatisticamente significativa entre a equitabilidade nas amostras em relação às variáveis categóricas de tempo de amostragem, cobertura do solo e aplicação de DCD. Por outro lado, foi observado associação estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre o número de OTU e a variável categórica tempo de amostragem ( $p = 0,002$ ), não sendo significativo para cobertura do solo nem aplicação de DCD. Esta associação não se repetiu para a métrica de Shannon, uma medida quantitativa da riqueza da comunidade, onde não foi observado associação estatisticamente significativa para as variáveis categóricas de tempo de amostragem e aplicação de DCD. Entretanto, para cobertura do solo, um valor de p no limite de 0,01 foi observado. Também não

foram observadas associações significativas para as métricas de Faith PD e equitabilidade, que medem a riqueza da comunidade, incorporando relações filogenéticas, e medida da uniformidade de distribuição das OTU na comunidade, respectivamente (dados não amostrados). Também não foi observado associações entre as medidas de diversidade alfa para riqueza e equitabilidade com as variáveis contínuas para medidas dos gases N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. As análises sugerem diferenças estatísticas entre amostras quando é considerado o tempo de amostragem.

Em resumo, estes resultados mostram que há uma forte associação entre a riqueza de OTU no solo e o tempo de amostragem, sendo que o número de OTU aumentou com o tempo. Os resultados também sugerem que a riqueza (medida pelo índice de Shannon) varia associada ao tipo de cobertura do solo.

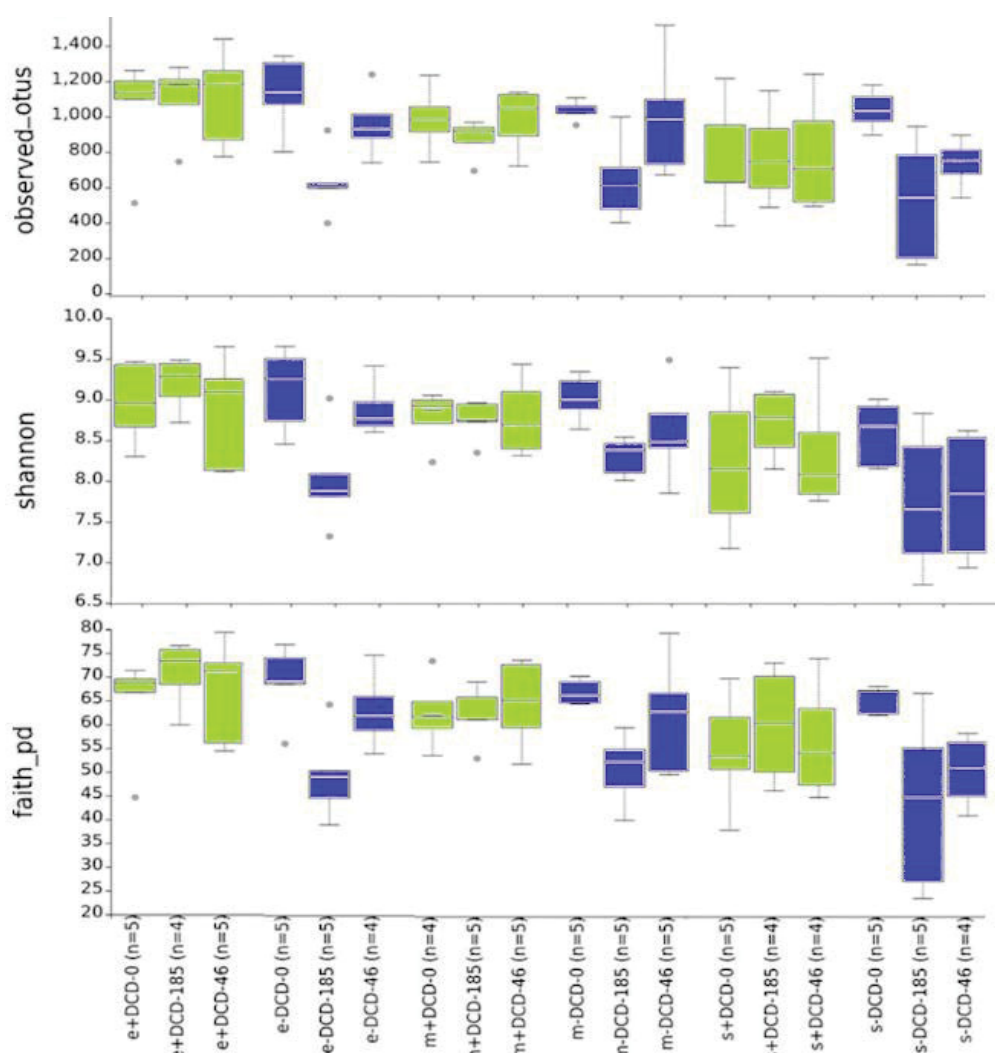


Figura 19 Figura 19 Significância Alfa, distribuição da diversidade alfa nas amostras.

Teste de A significância de Kruskal-Wallis utilizando a riqueza de OTUs, índice de Shannon e índice faith pd. análise foi realizada no programa Qiime2, cores verdes representam os tratamentos com a presença do DCD e cores azuis tratamentos sem a presença do DCD.

Fonte: O autor

#### **5.4.2 Beta diversidade**

Foi realizada a análise de beta diversidade utilizando as métricas de proporção de similaridade ou dissimilaridade (distância) na abundância das espécies (Bray-curtis) e a proporção de espécies compartilhadas entre duas amostras em relação ao total de espécies (Jaccard) gerando gráficos de PCoA onde é possível observar separação dos grupos somente nos dias amostrados 0, 46, 185 (Figura 20A e D), não sendo possível notar separação entre os grupos Com-DCD e Sem-DCD e cobertura do solo (Figura 20C, E e F).

A análise de PCoA utilizando métricas de diversidade beta mostrou a separação dos dados em três grupos, de acordo com os tempos de amostragem (dias 0, 46 e 185). A Fig\_20A-C mostra o gráfico para os três primeiros eixos da PCoA, que explicam conjuntamente 35% da variação observada, enquanto o eixo 1 sozinho, explica 20% da variação. Os gráficos para a PCoA com outras métricas de diversidade foram semelhantes (dados não mostrados).

Para analisar a composição das amostras no contexto dos metadados categóricos, a análise de PERMANOVA foi aplicada, para testar se as variações na composição do microbioma observadas entre amostras (ex., replicatas) dentro dos grupos estabelecidos, eram maiores que as variações observadas entre os diferentes grupos. Uma vez que a análise de PCoA anterior revelou um claro agrupamento dos dados em função dos tempos de amostragem, a PERMANOVA foi aplicada às amostras, usando os tempos de amostragem como referência. Como esperado, valores de p significativos 0,001 foram observados (o teste foi também aplicado em outras métricas de diversidade beta e foram obtidos resultados semelhantes; dados não mostrados).

### 5.4.3 Taxonomia

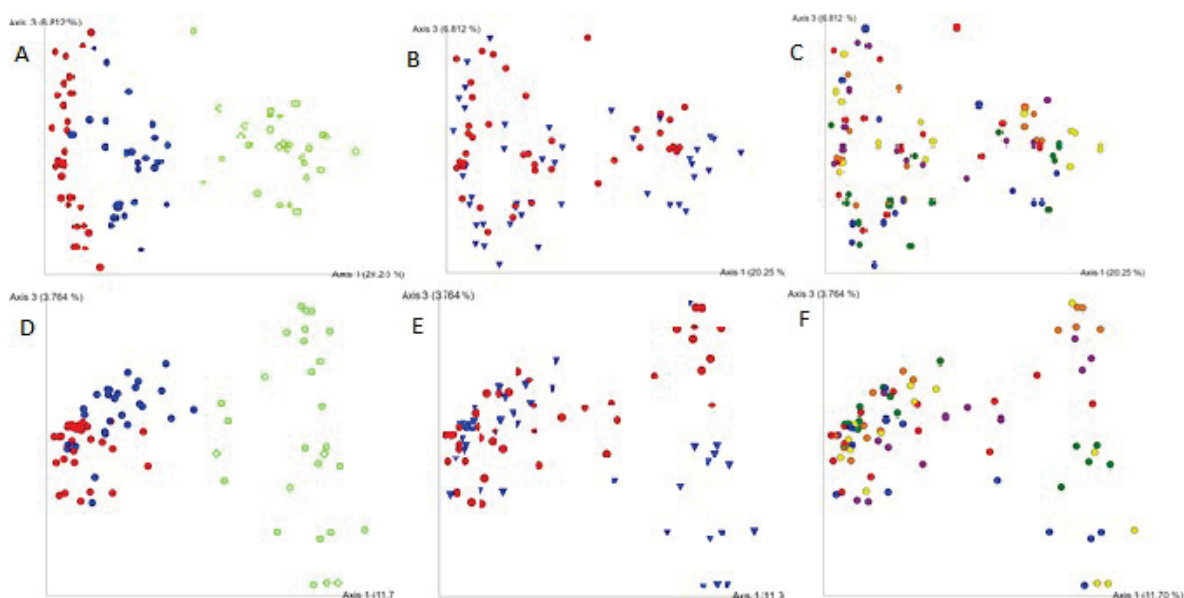


*Figura 20 Agrupamento de amostras de microbioma de solo submetido a tratamento com diferentes coberturas vegetais e aplicação de DCD a partir de distâncias de beta diversidade .*

Determinando se os grupos de amostras são significativamente diferentes de um outro usando um teste estatístico baseado em permutação por análise de coordenadas principais (PCoA), separando-as pelos dias das coletas (A, D) por tratamento COM e SEM DCD (B, E) e todos os tratamentos e suas coberturas (C, F) pelos métodos de Bray-Curtis (A, B, C) e Jaccard (D, E, F). Legenda de cores: A, D= "Dia 0" Vermelho, "Dia 46 azul", "Dia 185" laranja. B, E= "com DCD" Vermelho, "sem DCD" Azul. C, F= "Eucalipto com DCD" vermelho, "Eucalipto sem DCD" azul, "Milho com DCD" laranja, "Milho sem DCD" verde, "Solo-nu com DCD" Roxo, "Solo-nu sem DCD" amarelo, gerado pelo programa qiime2

Fonte: O autor

As sequências de amplicons do gene 16S rRNA foram submetidas a comparação contra bancos de dados de sequências do gene 16S rRNA, na mesma região, de organismos referência para a identificação taxonômica de bactérias e arqueias presentes nas amostras de solo. A análise foi aplicada em um total de 84 amostras (6 amostras removidas por conterem menos de 5.900 sequências). O resultado indicou a presença dos filos Proteobactéria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Chloroflexi e Bacteroidetes como os mais abundantes em todas as amostras (Figura 21), além da presença de vários outros filos em menor abundância.

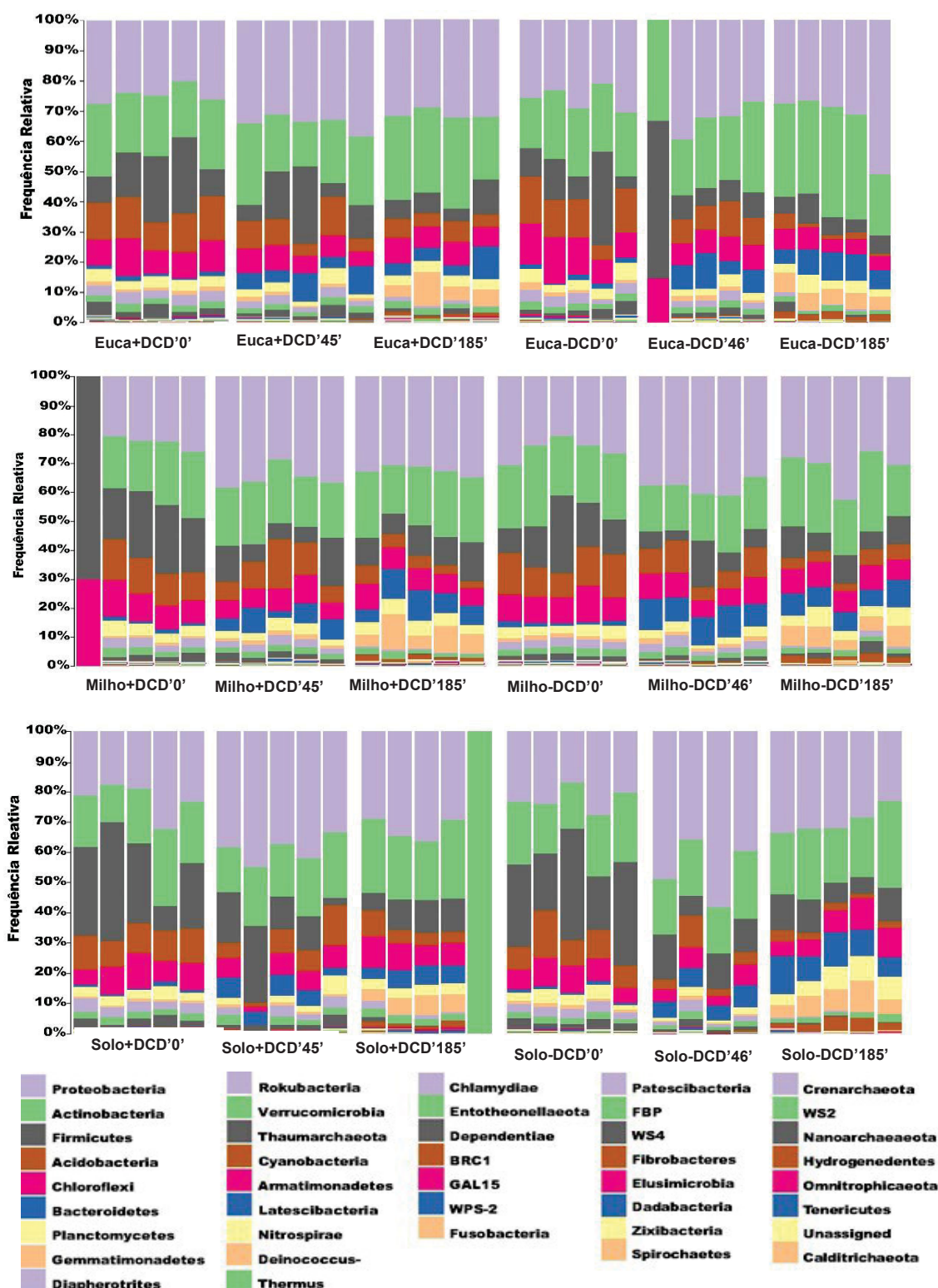


Figura 21 Identificação do filios bacterianos das bibliotecas metagenômicas baseado na taxonomia do gene 16S rRNA".

Os 41 filios mais abundantes são mostrados nos gráficos de barra para cada amostra. A classificação foi feita com base no banco de dados Silva. Euca+DCD= Eucalypto com adição de DCD, Euca-DCD= Eucalypto sem adição de DCD, Milho+DCD= Milho com adição de DCD, Milho-DCD= Milho sem adição de DCD, Solo+DCD= tratamento sem cobertura do solo com adição de DCD, Solo-DCD= tratamento sem cobertura do solo sem adição de DCD; "0", "46", "185"= Tempos de coleta de dados após a semeadura.

Fonte: O autor

É possível identificar uma grande variação na abundância relativa do filo gemmatimonadetes para os três tempos de coleta, com aumento em 185 dias

Em seguida, o resultado foi observado em detalhe para as 10 sequências mais abundantes em cada tipo de tratamento em relação à cobertura do solo. Para o solo-nu, a abundância relativa, indicou os filos *Firmicutes*, *Proteobactéria* e *Actinobacteria*, como os mais abundantes, em ambos os tratamentos para aplicação de DCD e nos 3 tempos de coletas (0, 46, 185 dias). Para os tempos de coleta, o filo Firmicutes foi mais abundante no tempo 0 e o filo *Proteobacteria* nos tempos 46 e 185, enquanto o filo *Actinobacteria* se manteve distribuído de forma mais regular nos 3 tempos amostrados (Figura 22).

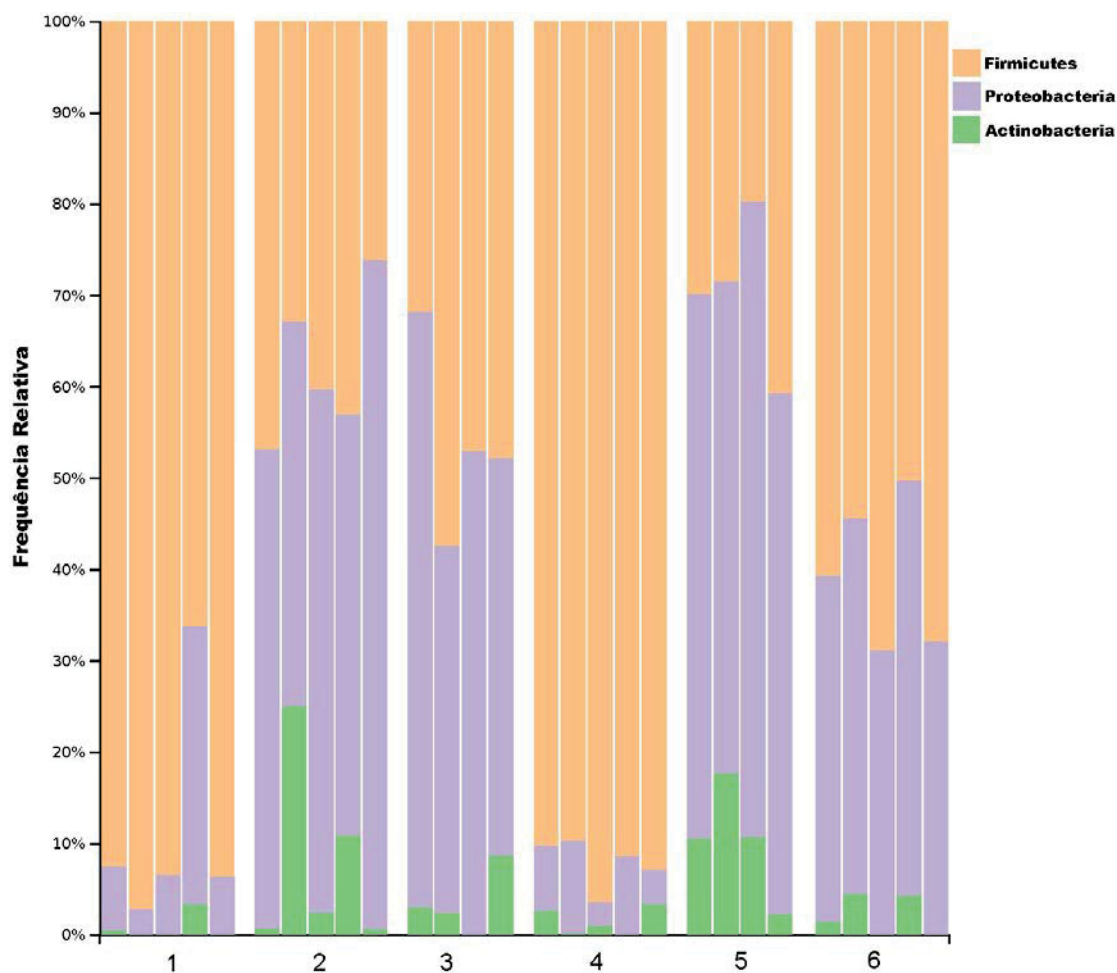


Figura 22 Abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância no tratamento Solo nú.

Solo nú com DCD e Solo nú sem DCD, submetidas a diferentes tratamentos e três épocas amostradas. .1= Solo+DCD dia 0, 2= Solo +DCD dia 46; 3= Solo +DCD dia 185; 4= Solo -DCD dia 0; 5= Solo -DCD dia 46; 6= Solo -DCD dia 185.

Fonte: O autor

Para a cobertura com eucalipto, os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Thaumarchaeota*, *Chloroflexi*, *Rokubacteria* foram os mais abundantes, com predomínio do filo *Proteobacteria* nos 3 tempos amostrados, seguido dos demais na ordem citada acima. (Figura 23).

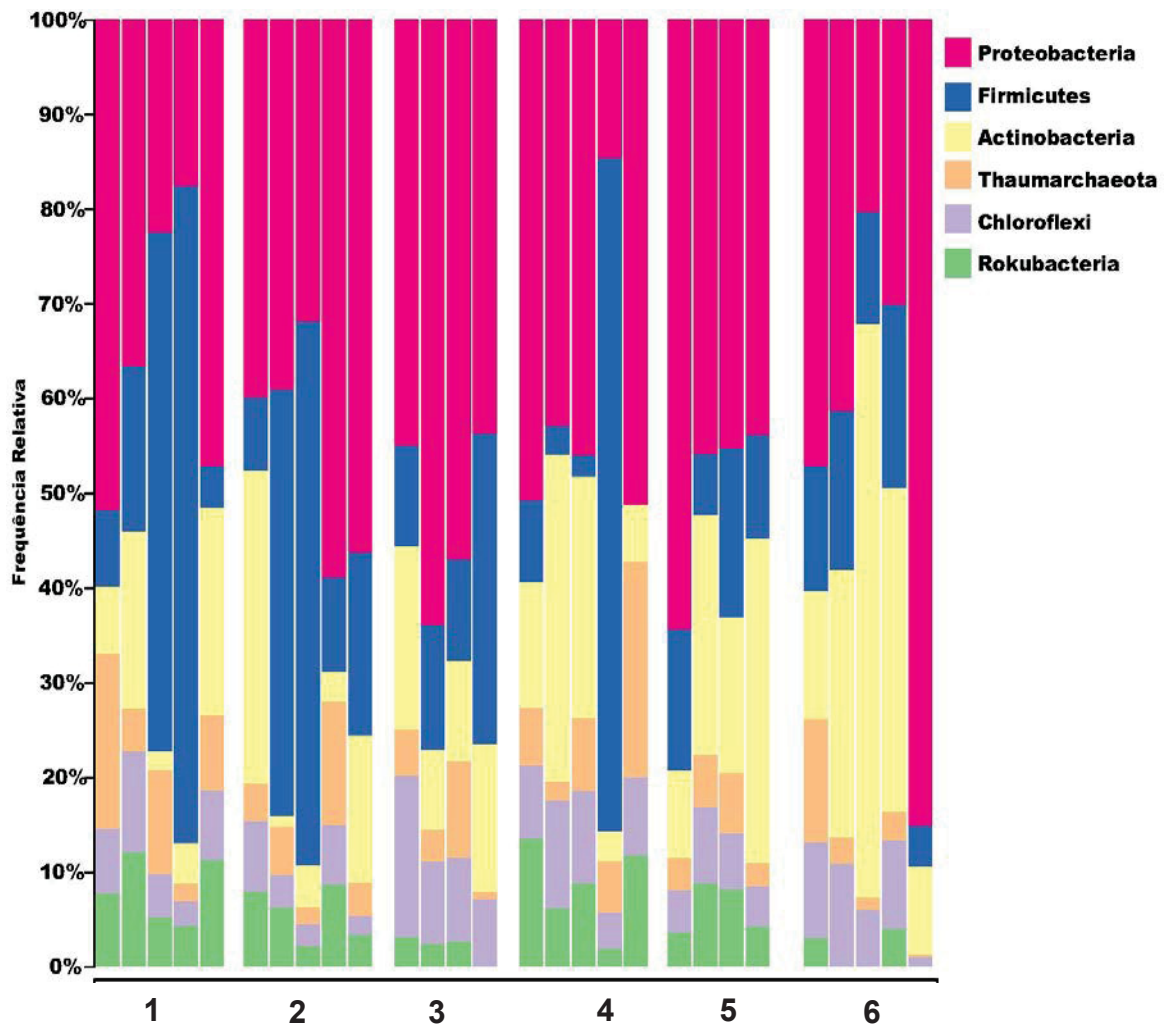


Figura 23 Abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância no tratamento Eucalipto. Eucalipto com DCD e Eucalipto sem DCD, abundância relativa de filos nas 10 sequencias com maior abundancia nas amostras separadas pelo tipo de cobertura, submetidas a diferentes tratamentose três épocas amostradas. 1=Eucalipto +DCD dia 0, 2= Eucalipto +DCD dia 46; 3= Eucalipto +DCD dia 185; 4= Eucalipto -DCD dia 0; 5= Eucalipto -DCD dia 46; 6= Eucalipto -DCD dia 185.

Fonte: O autor

Para a cobertura com milho, a abundância relativa indicou os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* como sendo os 5 filos mais abundantes nos 3 tempos amostrados, seguindo a ordem como foram descritos. (Figura 24).

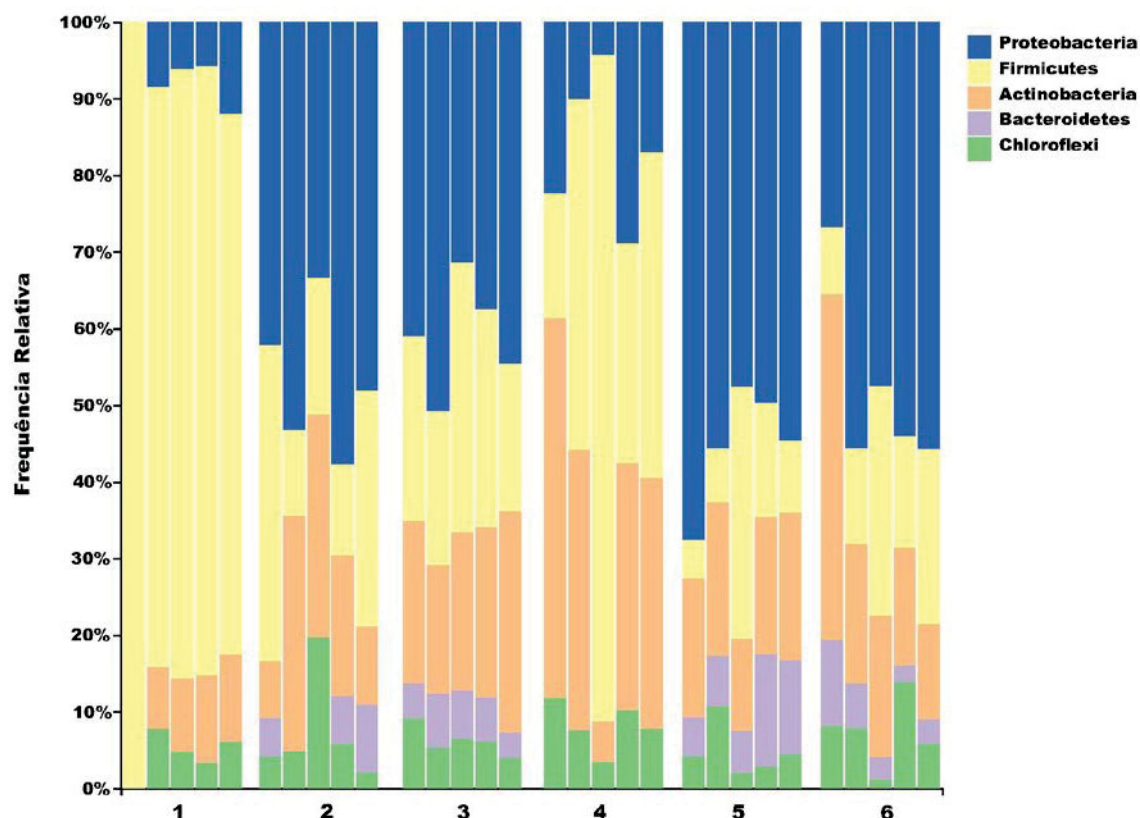


Figura 24 Abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância no tratamento Milho. Milho com DCD e Milho sem DCD, abundância relativa de filos nas 10 sequências com maior abundância nas amostras separadas pelo tipo de cobertura, submetidas a diferentes tratamentos e três épocas amostradas. Fonte: Oautor

Após a análise por cobertura e aplicação do filtro sobre as 10 sequências mais abundantes é possível observar que o solo contendo a cobertura “Eucalipto” apresentou maior abundância de filos, podendo ser notado também que os filos em comum presentes nos três diferentes tipos de cobertura são *Proteobacterias*, *Actinobacterias*, *Firmicutes* corroborando com Silveira (2006) que caracterizou populações dominantes de *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* em estudo de solo sob cultivo de eucalipto e sob mata nativa no estado de São Paulo e DEL AGUILA (2009) sob as mesmas condições em Minas Gerais. Souza (2011) observou a formação de diferentes grupos microbianos do solo quando trabalhou com culturas exclusivas de soja e milho. O mesmo relata que diferentes sistemas de manejo e variados tipos de vegetação foram os principais fatores que influenciaram na formação de grupos de comunidades microbianas no solo.

Guo et al., (2013), em um estudo de 7 anos, em três regiões da Nova Zelândia, utilizando DCD como inibidor de nitrificação em pastagem perene (azevém e trevo-branco), concluíram que, a longo prazo, o uso desta tecnologia não afetou o pH e a atividade microbiana e enzimática do solo, corroborando (AMBERGER 1989) que o

DCD não é um biocida e DI E CAMERON, (2004a), não tem efeito na biomassa microbiana do solo.

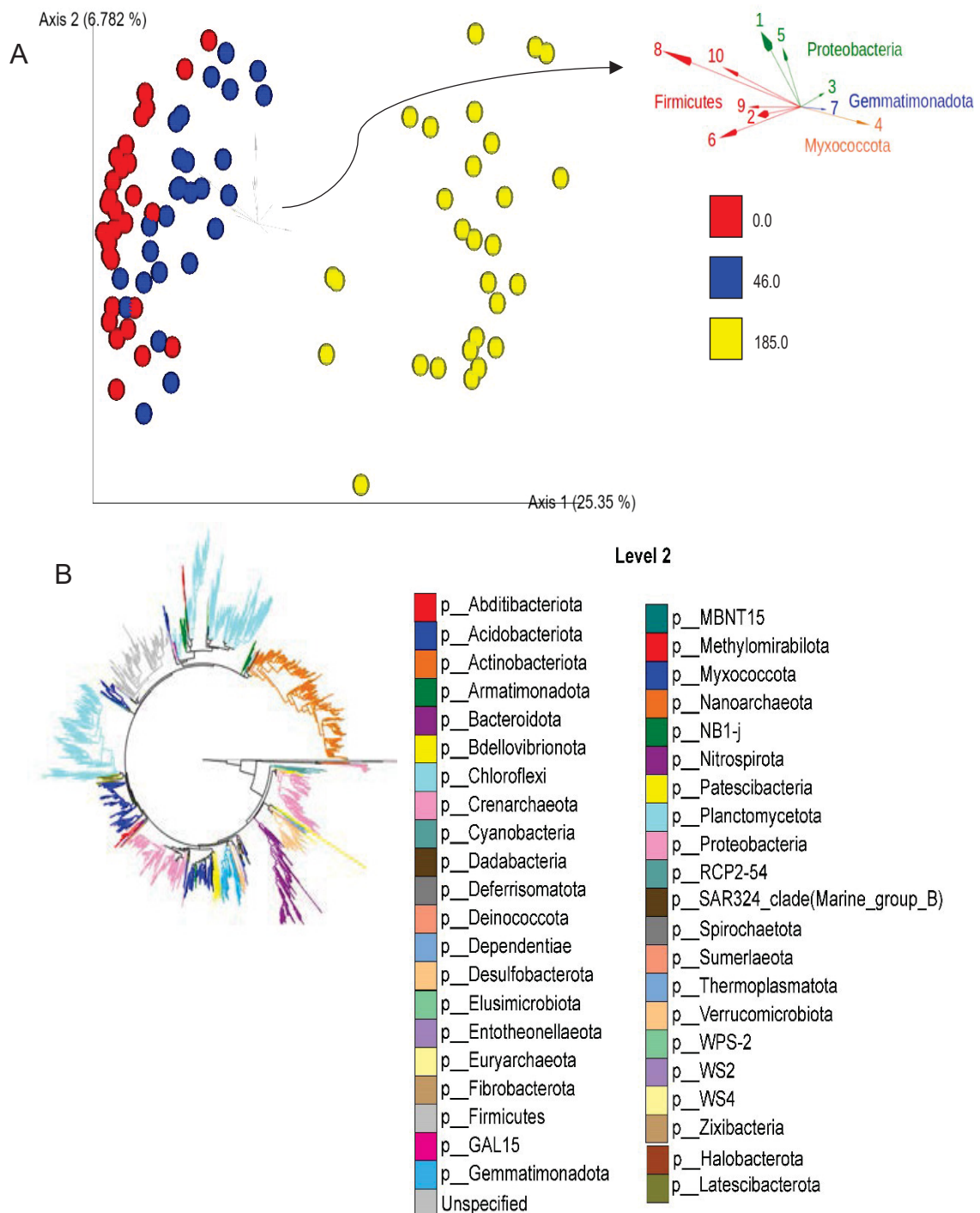


Figura 25 Agrupamento das amostras de solo com diferentes tipos de coberturas e tratamento com DCD em relação a beta diversidade, a partir das sequências amplicons do gene 16S rRNA. Análise de PCoA aplicada na matriz de distâncias entre amostras, calculada com a métrica de Bray-Curtis.

A- Diversidade de indivíduos filtrados por fase do experimento Início em vermelho, Meio em azul e Final em amarelo sendo as 10 sequências que mais se diferenciam das amostras representadas por setas. B: Arvore filogenética das ASVs separados pelo filo que representam.

Fonte: O autor

Foi gerado um gráfico de PCoA biplot onde os *taxa* que estão contribuindo mais fortemente para a variância são mostradas como vetores sobrepostos, usando distancias unifrac não ponderada (Figura 25).

Tabela 3 Sequências que mais se diferenciam no agrupamento das amostras por fase do experimento.

| Seta | ID referencia                    | Reino       | Filo               | Gênero            |
|------|----------------------------------|-------------|--------------------|-------------------|
| 1    | 30566b997171cecbfaac6ec23c88a0c6 | d__Bactéria | p__Proteobactérias | D_5_Brevundimonas |
| 2    | d4c857681639a044ac090ca4dd9a5172 | d__Bacteria | p__Firmicutes      | D_5_Sporosarcina  |
| 3    | e8f7f69232065625c87369eecd696518 | d__Bacteria | p__Proteobacteria  | D_5_Pantoea       |
| 4    | ca5711b2d5877f6d6fda31a3becc1e23 | d__Bacteria | p__Myxococcota     | -                 |
| 5    | fe7ad21e28d858e01d726c6b17e6a657 | d__Bacteria | p__Proteobacteria  | D_5_Pseudomonas   |
| 6    | 55df1c88e54fd879497fbaa0bce361fe | d__Bacteria | p__Firmicutes      | D_5_Sporosarcina  |
| 7    | 0ea251e7b5b31459106634e65206b40c | d__Bacteria | p__Gemmatimonadota | -                 |
| 8    | 7344730fa072aa86d044532eebaea246 | d__Bacteria | p__Firmicutes      | -                 |
| 9    | f6adada6cafa4ae2ea1f7d61083a105e | d__Bacteria | p__Firmicutes      | -                 |
| 10   | 74b370ab6f896211513997af33d1cb62 | d__Bacteria | p__Firmicutes      | D_5_Sporosarcina  |

Sequências identificadas em números na coluna “seta” indicam os vetores coloridos no gráfico biplot Figura 25.

Fonte: O autor

#### 5.4.4 Predição genica

O DCD atua inibindo a nitrificação, podendo afetar especificamente a comunidade de bactérias responsáveis pela nitrificação e desnitrificação. Para verificar o comportamento desses grupos nas amostras coletadas a partir da identificação taxonômica usando o 16S rRNA foi feita uma predição de genes funcionais com o banco de dados KEGG.

Foram identificados 4 genes responsáveis pelo processo da nitrificação sendo *hao* encontrado em 3 amostras com média de 9 genes por amostra, *PmoA-amoa*, *PmoB-amob* e *Pmoc-amoc* em 22 amostras com medias de 23,18 genes por amostra para *PmoA-amoa* e *PmoB-amob* e para *Pmoc-amoc* a média de genes por amostra foi de 24,41. Foram identificados 10 genes responsáveis pela desnitrificação sendo eles *Nirk* 83 amostras com média de 722,15 genes por amostra, *narG/narZ*, *narH/narY*, *narL/narV*, *napA* e *napB* foram encontrados em 87 amostras onde o grupo *narG/narZ*, *narH/narY*, *narL/narV* apresentou media aproximada de 13200 genes por amostra, *napA* e *napB* apresentou média aproximada de 5000 genes, *nosZ* 69 amostras com média 32,53 genes por amostras, *norC* 83 amostras com média de 101,61 genes por amostra, *norB* 85 amostras com médias de 1406,37 genes por amostra e *nirS* em 24 amostras com médias de 4,08 genes por amostras, observado na análise de predição gênica que não houve diferenciação de genes quando comparadas as fases do experimento: Inicial referente ao dia “0”, Meio referente ao dia “46” e Final referente

ao dia “185” e também em comparação as coberturas do solo e presença ou ausência do DCD.

Os genes responsáveis pelo processo da desnitrificação foram mais abundantes nas amostras mais não houve separação quando comparados com as fases do experimento, cobertura e presença ou ausência do DCD.

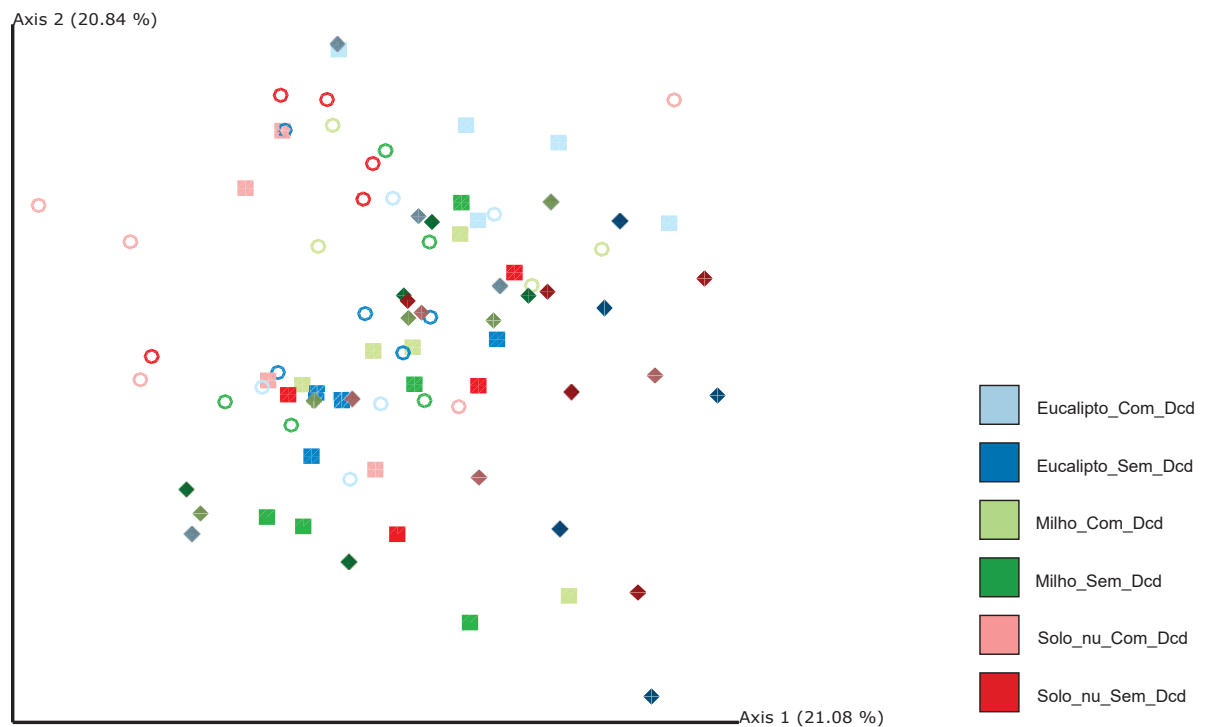


Figura 26 Diversidade dos genes responsáveis pelo processo de nitrificação-desnitrificação.

Análise de coordenadas principais utilizando a métrica Bray curtis demonstrando a diversidade dos genes nas fases do experimento sendo círculo aberto representando a fase inicial, diamante representando a fase mediana e o quadrado representando a fase final e as cores conforme legenda representando os tratamentos.

Fonte: O autor

Estes resultados sugerem que a dicianodiamida (DCD) atua somente inibindo a(s) atividade(s) do(s) processo(s) (ex., inibindo atividade enzimática, como já reportado), reduzindo, em consequência, a emissão de  $N_2O$ . A análise microbiológica não mostrou alteração da comunidade microbiana por influência do DCD, sugerindo ainda que, mesmo o(s) processo(s) de nitrificação/desnitrificação sendo alterado, esta alteração não influencia na estrutura da comunidade microbiana do solo (Figura 26).

Mesmo os organismos diretamente envolvidos no processo de nitrificação/desnitrificação não mostraram alteração provocada pela aplicação de DCD,

sugerindo que este grupo de organismos se mantiveram ativos metabolicamente, exercendo outros papéis funcionais na comunidade. Por outro lado, os resultados mostram que o principal fator para alteração da comunidade do solo foi o tempo de amostragem, independente da cobertura do solo ou aplicação de DCD. Em conjunto estes resultados indicam que a aplicação do DCD exerce forte redução nas emissões de  $N_2O$ , como esperado, sem afetar o microbioma do solo, o que pode ter grande valor na sua aplicação agrícola.

A análise revelou que, para os tratamentos de cobertura vegetal do solo e aplicação de DCD, alguns dos grupos taxonômicos identificados através das sequências amplicons de 16S rRNA variam em abundância significativamente através das fases amostradas sendo o dia 0 como fase inicial, dia 46 como fase mediana “meio” e dia 185 como fase final. De forma geral, uma única ASV apresentou abundância diferencial para cada tratamento, totalizando seis ASV (outras ainda podem ser consideradas; identificadas através dos pontos mais acima e à direita nos gráficos (Figuras\_suplementares 7 a 12). Estas 6 ASV se distribuem em 3 filos: *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* e *Proteobacteria*, são observadas entre 13% a 44% das amostras (do total de 84 analisado) e todas apresentaram aumento na abundância relativa nas amostras da fase final de cada tratamento, com exceção do tratamento solo-nu com aplicação de DCD, onde a ASV apresentou maior abundância relativa na fase inicial. Nenhuma destas ASV com variação significativa na abundância relativa estão entre as mais representativas nas amostras, com o número total de sequências em cada uma destas ASVs variando de cerca de 850 no tratamento solo-nu com DCD, 5.250 no tratamento Eucalipto sem DCD e entre cerca de 14.500 a 15.200 nos demais tratamentos. Este resultado sugere que grupos taxonômicos menos representativos também poderiam ter um papel importante tanto na estrutura, quanto na função da comunidade microbiana e suas mudanças ao longo do tempo. É interessante notar que, para os tratamentos milho com DCD e solo-nu sem DCD a mesma ASV (*Proteobacteria*) foi identificada com abundância diferencial aumentada na fase final."

A análise pelo método de ANCOM mostrou alguns grupos taxonômicos com abundância diferencial significativa entre os tempos de amostragem (fases) “Tabela\_suplementar 3”, para os tratamentos de cobertura do solo e aplicação de DCD (Figura suplementar 7 a 12).

## 6 .CONCLUSÃO

Como conclusão, os resultados mostraram que a aplicação de DCD no solo reduz consideravelmente a emissão de N-N<sub>2</sub>O com medias de 16,7 kg ha<sup>-1</sup> ano para 1,68 kg ha<sup>-1</sup> ano e um Potencial de Aquecimento Global Parcial com medias de 9833 kg CO<sub>2</sub> eq ha<sup>-1</sup> para 991,34 kg CO<sub>2</sub> eq ha<sup>-1</sup>, mesmo em temperaturas ambiente elevadas, sem alterar a estrutura da comunidade de bactérias e arqueias, incluindo grupos taxonômicos diretamente responsáveis pelos processos de nitrificação/desnitrificação.

Foi comprovada a eficiência do inibidor Dicianodiamida (DCD) na redução da emissão e no acumulado do oxido nitroso (N<sub>2</sub>O), não afetando de forma significativa o fluxo e acumulado dos gases metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), também foi observado que a estabilidade do inibidor se manteve não sendo afetada pelo fator temperatura que em nosso campo experimental sofreu grande variação.

. O DCD não interferiu na microbiota do solo, sendo possível observar uma variação temporal na diversidade de bactérias do solo em função do tempo assim como a cobertura nele presente.

Os genes mais abundantes encontrados nas amostras através da predição gênica foram os responsáveis pelo processo da desnitrificação sendo eles *Nirk*, *narG*, *narH/narY*, *narL/narV*, *nosZ*, *norC*, *norB*, *nirS*, *napB*, *napA*, acompanhados dos Nitrificantes *hoa*, *pmoA\_amoA*, *pmoB\_amoB*, *PmoC\_AmoC*.

Estes resultados sugerem que a prática de aplicação de DCD em culturas agrícolas e florestais pode ser vantajosa do ponto de vista econômico, por reduzir consideravelmente perda de nitrogênio, em relação do ponto de vista ambiental, reduzindo consideravelmente a emissão de gás com grande potencial para efeito estufa, sem alterar a saúde do solo mantendo a estrutura da comunidade microbiana inalterada e uma ferramenta eficiente para redução do potencial de aquecimento global parcial (PAGp).

## 7 .REFERÊNCIAS

- AMBERGER, A. Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, n. 19–20, p. 1933–1955, 1989.
- ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1643-1651, 2003.
- Arenhardt, M.H. **Emissões de gases de efeito estufa em resposta ao modo de aplicação de dejetos de suínos e ao uso de inibidor de nitrificação na sucessão trigo/milho em latossolo**. 77p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.
- Barbosa, B.M.; Colodette, J. L.; Cabral, C. P. T.; Gomes, F. J. B.; Silva, V. L. Efeito da fertilização na qualidade da madeira de *Eucalyptus* spp. **Scentia Forestalis** ; 42(101): 29-39, 2014.
- BARRIOS, E.; KWESIGA, F.; BURESH, R.J.; SPRENT, J.I.; COE, R. Relating preseason soil nitrogen to maize yield in tree legume-maize rotations. **Soil Science Society of America Journal**, v.62, p.1604-1609, 1998.
- BASSACO, M. V. M.; MOTTA, A. C. V.; PAULETTI, V.; PRIOR, S. A.; NISGOSKI, S.; FERREIRA, C. F. Nitrogen, phosphorus, and potassium requirements for *Eucalyptus urograndis* plantations in southern Brazil. **New Forests**, v. 49, p. 681-697, 2018.
- BELLOTE, A. F. J.; NEVES, E. J. M. **Calagem e adubação em espécies florestais plantadas na propriedade rural**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 6 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 54).
- BOKULICH, N. A.; KAEHLER, B. D.; RIDEOUT, J. R.; et al., Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2018.

BUNDY, L.G.; ANDRASKI, T.W.; WOLKOWSKI, R.P. Nitrogen credits in soybean-corn crop sequences on three soils. **Agronomy Journal**, v.85, p.1061-1067, 1993.

BURNEY, J. A.; DAVIS, S. S.; LOBELL, D. B. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.107, n. 26, p. 1252-1257, 2010.

BUTTERBACH, B. K.; BAGGS, LIZ; DANNENMANN, M.; KIESE, R.; ZECHMEISTER, B. S. Nitrous oxide emissions from soils: How well do we understand the processes and their controls? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 368p, 2013.

CALLAHAN, B. J; MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., JOHNSON, A. J. A., & HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, 13(7), 581–583, 2016.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**. 11 (12), 2639–2643, 2017.

CAMARGO, E. S. **Potencial de práticas agrícolas em mitigar as emissões de gases de efeito estufa na cultura do arroz irrigado**. 138p. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.

CANTARELLA, H. & MARCELINO, R. O uso de inibidor de urease para aumentar a eficiência da ureia. In: **SIMPOSIO SOBRE INFORMAÇÕES RECENTES PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA**, 2007, Piracicaba. Anais. Piracicaba, v 1, p.2-19, 2007.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. p. 375-470. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1017p, 2007.

Cantarella, H.; Marcelino, R. Fontes alternativas de nitrogênio para a cultura do milho. In: Fancelli, A. L. (ed). **Milho - Nutrição e adubação**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.36-55.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; CONTIN, T.L.M.; DIAS, F.L.F.; ROSSETTO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R.B.; QUAGGIO, J.A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 397- 401, 2008.

CAPORASO, J.G., LAUBER, C.L., WALTERS, W.A. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624, 2012.

CLAY, D.E.; MALZER, G.L. & ANDERSON, J.L. Ammonia volatilization from urea as influenced by soil temperature, soil water content, and nitrification and hydrolysis inhibitors. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54:263-266, 1990.

COPETTI, A. C. CRUZ. **EMIÇÃO DE ÓXIDO NITROSO E METANO EM UM PLANOSSOLO ALAGADO EM CASA DE VEGETAÇÃO**. 97p. Tese (doutorado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

COSTA, F.S ; BAYER, C; ZANATTA, J. A; MIELNICZUK, J. Estoque de carbono e emissões de dióxido de carbono afetadas pelos sistemas de manejo do solo no sul do Brasil, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, pp. 323 – 332, 2008.

CROOKSTON, R.K.; KURLE, J.E.; COPELAND, P.J.; FORD, J.H.; LUESCHEN, W.E. Rotational cropping sequence affects yield of corn and soybean. **Agronomy Journal**, v.83, p.108-113, 1991.

Crutzen, P. J; Mosier, A. R; Smith, K. A; Winiwarter, W. N<sub>2</sub>O Release from Agro-biofuel Production Negates Global Warming Reduction by Replacing Fossil Fuels. In: Crutzen P., Brauch H. (eds) Paul J. Crutzen: A Pioneer on Atmospheric Chemistry and Climate Change in the Anthropocene. **Springer Briefs on Pioneers in Science and Practice**, vol 50. Springer, Cham, 2016.

Del Aguila, R. D. S. **Diversidade bacteriana em solos sob plantio de eucalipto e mata nativa em Ipaba**. 64p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Belo Oriente, Minas Gerais, 2009.

DI, H. J.; CAMERON, K. C. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 237-256, 2002.

DING, W. X.; CHEN, Z. M.; YU, H. Y.; LUO, J. F.; YOO, G. Y.; XIANG, J.; ZHANG, H. J.; YUAN, J. J. Nitrous oxide emission and nitrogen use efficiency in response to nitrophosphate, N-(n-butyl) thiophosphoric triamide and dicyandiamide of wheat cultivated soil under sub-humid monsoon conditions. **Biogeosciences**, v. 12, p. 803-815, 2015.

DOBBELAERE, S & OKON, Y. The plant growth promoting effects and plant responses. Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations (Elmerich C & Newton WE, eds). Springer Verlag, Heidelberg, p 145–170, 2007.

DOUGLAS, GM, MAFFEI, VJ, ZANEVELD, J., YURGEL, SN, BROWN, JR, TAYLOR, CM, et al., PICRUST2: uma abordagem aprimorada e extensível para inferência de metagenoma, 2019.

ESCOSTEGUY, P.A.V.; RIZZARDI, M.A.; ARGENTA, G. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em duas épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.71-77, 1997.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, 360p, 2004.

FRACETTO, J, C, F. **Emissão de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e abundância da comunidade de bactérias desnitrificantes no agrossistema cana-de-açúcar**. 88p. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2013.

FERREIRA, J. M. A.; STAPE, J. L. Productivity gains by fertilization in Eucalyptus urophylla clonal plantations across gradients in site and stand conditions. **Southern Forests**, v. 71, p. 253-258, 2009.

Fowler. D.; Coyle, M.; Skiba, U.; Sutton, M. A.; Cape, J. N.; Reis, S.; Sheppard, L. J.; Jenkins, A.; Grizzetti, B.; Galloway, J. N.; Vitousek, P.; Leach, A.; Bouwman, AF.; Butterbach-Bahl, K.; Dentener, F.; Stevenson, D.; Amann, M.; Voss, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc B*, 368p, 2013.

FRYE, W.W. Nitrification inhibition for nitrogen efficiency and environment protection. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS, Frankfurt, 2005. Proceedings: Paris, International Fertilizer Industry Association, 2005. 8p. CR-ROM.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C. & SANTOS, G.A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v29, p393-901, 2005.

GATTO, A.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; LEITE, H.G. & VILLANI, E.M.A. Estoque de carbono na biomassa de plantações de eucalipto na região centro-leste do Estado de Minas Gerais. **Revista Árvore**, 35:895-905, 2011.

GATTO, A.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; LEITE, H.G.; LEITE, F.P. & VILLANI, E.M.A. Estoques de carbono no solo e na biomassa em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v34, p1069-1079, 2010.

GAZOLA, R. N.; BUZETTI, S.; TEIXEIRA FILHO, M. C .M.; DINALLI, R. P.; MORAES, M .L .T.; CELESTRINO, T. S.; SILVA, P. H. M.; DUPAS, E. Doses of N, P and K in the cultivation of eucalyptus in soil originally under Cerrado vegetation. Semina: **Ciências Agrárias**, n. 35, p. 1895-1912, 2015.

GILSANZ, C.; BÁEZ, D.; MISSELBROOK, T. H.; DHANOA, M. S.; CÁRDENAS, L. M. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 216, p. 1-8, 2016.

GODOY JÚNIOR, C.; GRANER, E.A. Milho: adubação mineral nitrogenada. IV – Parcelamento do calnitro. **Revista de Agricultura**, v.39, p.185-189, 1964.

GOMES, M. A. F.; SOUZA, M. D. de; BOEIRA, R. C.; TOLEDO, L. G. de. **Nutrientes vegetais no meio ambiente**: ciclos biogeoquímicos, fertilizantes e corretivos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 50p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 18).

GONÇALVES, J. L. M.; STAPE, J. L.; LACLAU, J.; SMETHURST, P.; GAVA, J. L. Silvicultural effects on the productivity and wood quality of eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 45-61, 2004.

GUO, Y. J.; DI, H. J.; CAMERON, K. C.; LI, B.; PODOLYAN, A.; MIOR, J. L.; MONAGHAN, R. M.; SMITH, L. C.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; WAUGH, M.; HE, JI-ZHENG. Effect of 7-year application of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on soil microbial biomass, protease and deaminase activities, and the abundance of bacteria and archaea in pasture soils. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 13, n. 4, p. 753-759, 2013.

HENDRIKS, J.; OUBRIE, A.; CASTRESANA, J.; URBANI, A.; GEMEINHARDT, S.; SARASTE, M. Nitric oxide reductases in bacteria. **Bioenergetics**, New York, v. 1459, p. 266–273, 2000.

HUERGO, L.F.; RISSI, D.V.; ELIAS, A.S.; GONÇALVES, M.V.; GERNET, M.V.; BARRETO, F.; DAHMER, G.W.; REIS, R.A.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A.; BALSANELLI, E.; CRUZ, L.M. Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome. *Science of the Total Environment*, 2018.

Ibarr, M. A. **Emissão de óxido nitroso do solo e eficiência de uso do nitrogênio após aplicação de fertilizante nitrogenado de eficiência aumentada em cultivo de eucalipto**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná. 123p, Curitiba, PR 2020.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, I. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, 2006.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Working Group I Report "The Physical Science Basis", Fourth Assessment Report: Climate Change 2007.

IPCC. Climate change 1995. Impacts, adaptations and mitigation of climate change: Scientific-technical analysis. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 878 p.

IPCC. Revised 1996 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Reference Manual. 1996.

IQBAL, J. et al. Differences in soil CO<sub>2</sub> flux between different land use types in mid-subtropical China. *Soil Biology and Biochemistry*, v40, 2324-2333, 2008.

IQBAL, J. et al. Temporal variability of soil-atmospheric CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes from different land uses in midsubtropical China. *Atmospheric Environment*, v43, 5865-5875, 2009.

JANDL, ROBERT & LINDNER, MARCUS & VESTERDAL, LARS & BAUWENS, BRAM & BARITZ, RAINER & HAGEDORN, FRANK & W. JOHNSON, DALE & MINKKINEN, KARI & BYRNE, KENNETH. How strongly can forest management influence soil C sequestration. *Geoderma*. v137, p253-268, 2007.

JESUS, G. L.; BARROS, N. F.; SILVA, I. R.; NEVES, J. C. L.; HENRIQUES, E. P., LIMA, V. C.; FERNANDES, L. V.; SOARES, E. M. B. Doses e fontes de nitrogênio na produtividade do eucalipto e nas frações da matéria orgânica em solo da região do cerrado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa**, v. 36, n. 1, p. 201-214, 2012.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; HIRAKAWA, M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl\_1, p. D355–D360, 2009.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KEYLOCK, C. J. Simpson Diversity and the Shannon-Wiener index as special cases of a generalized entropy. *Oikos* v109, p 203–207. 2005

KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., WALTERS, W.A., GONZALEZ, A., CAPORASO, J.G., KNIGHT, R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. Curr. Protoc. Microbiol.(Chapter 1: Unit). 2012.

LARA-CABEZAS, W.A.R.; KORNDORFER, G. & MOTTA, S.A. Volatilização de N-NH<sub>3</sub> na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da ureia por sulfato de amônio. **R. Bras. Ci. Solo**, 21:481-487, 1997.

LEMAIRE, G.; GASTAL, F.N. N uptake and distribution in plant canopies. In: LEMAIRES, G. (Ed.). Diagnosis of the nitrogen status in crops. Berlin: Springer, 1997. p.3-43.

LEWIS, O. A. M. Plants and Nitrogen. London, Cambridge Press, 1986. 100p

LIU, G.; LI, Y. & ALVA, A.K. High water regime can reduce ammonia volatilization from soils under potato production. Comm. Soil Sci. Plant Anal., 38:1203-1220, 2007.

Lützow, Von, M, Kögel-knabner, I, Ekschmitt, K, Matzner, E, Guggenberger, G, Marschner, B, & Flessa, H. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions- a review. European Journal of Soil Science , 57, 426-445, 2006.

MA, B.L.; WU, T.Y.; TREMBLAY, N.; DEEN, W.; MCLAUGHLIN, N.B.; MORRISON M. J. & STEWART, G. On-farm assessment of the amount and timing of nitrogen fertilizer on ammonia volatilization. Agron. J., 102:134-144, 2010.

MACADAM, X. M. B., A. PRADO, P. MERINO, J.M. ESTAVILLO, M. PINTO AND C. GONZALEZ-MURUA. Dicyandiamide and 3,4-dimethyl pyrazole phosphate decrease N<sub>2</sub>O emissions from grassland but dicyandiamide produces deleterious effects in clover. J. Pl. Physiol., 160: 1517–1523,2003.

MAFTOUN, M. & B. SHEIBANY. Comparative phytotoxicity of several nitrification inhibitors to soybean Glycine max plants. J. Agric. Food Chem., 27: 1365–1368, 1979.

MANDAL, S., VAN TREUREN, W., WHITE, R. A., EGGESBO, M., KNIGHT, R., & PEDDADA, S. D. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial ecology in health and disease**, vol. 26 27663. 29 May. 2015 . doi:10.3402/mehd.v26.27663

MARCELINO, I. R. Inibidor de nitrificação em fertilizantes nitrogenados e rendimento de milho. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2009.

Martinez, D. T.; Higa, A. R.; Lingnau, C.; Silva, I.C. Escolha de espécies, planejamento e sistemas de produção para reflorestamento em pequenas propriedades no estado do Paraná. Curitiba: FUPEF; 2012.

MOREIRA, F. M. S; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1(2): p 74-99, 2010.

MOCHIZUKI, Y.; KOBAYASHI, K.; YOH, M. Strong inhibitory effect of nitrate on atmospheric methane oxidation in forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 50, p. 164-166, 2012.

NIELSEN, D. R. et al., Nitrogen transport process in soil. In: STEVENSON, P. J. (Ed.). Nitrogen in agriculture soils. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.423-448.

OMAY, A.B.; RICE, C.W.; MADDUX, L.D.; GORDON, W.B. Corn yield and nitrogen uptake in monoculture and in rotation with soybean. **Soil Science Society of America Journal**, v.62, p.1596-1603, 1998.

PARKIN, T. B.; VENTER, R. T. Chamber-based trace gas flux measurements. In: FOLLETT, R. F. (Ed.). Sampling protocols. Washington, DC: USDA, 2010. p. 3-1, 3-39.

Parron, L. Maria. Mineralização de nitrogênio e biomassa microbiana em solos de Mata de Galeria: efeito do gradiente topográfico / Lucília Maria Parron, Mercedes Maria da Cunha Bustamante, Cesar Luis Coelho Prado. – Planaltina, DF : **Embrapa Cerrados**, 2003.

PAULETTI, V.; MOTTA, A. C. V. Manual de adubação e calagem para o estado do Paraná. 2. Curitiba: NEPAR-SBCS, 2019.

PETERSON, T.A.; VARVEL, G.E. Crop yield as affected by rotation and nitrogen rate. Corn. **Agronomy Journal**, v.81, p.735-738, 1989.

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. Soil phosphorus and environmental quality. In: PIERZYNSKY, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. Soil and Environmental Quality. 2.ed. Boca Raton, 2000. p.155-208.

POWELL, S. J. & PROSSER, J. I. Inhibition of ammonium oxidation by nitrapyrin in soil and liquid culture. *Applied and Environmental Microbiology* 52, p.782-787, 1986.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FASTTREE 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLOS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010. Public Library of Science. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>>.

PULITO, A. P.; GONÇALVES, J. L. M.; SMETHURST, P. J.; JUNIOR, J. C. A.; ALVARES, C. A.; ROCHA, J. H. T.; HUBNER, A.; MORAES, L. F.; MIRANDA, A. C.; KAMOGAWA, M. Y.; GAVA, J. L.; CHAVES, R.; SILVA, C. R. Available nitrogen and responses to nitrogen fertilizer in Brazilian eucalypt plantations on soils contrasting texture. **Forests**, v. 6, p. 973-991, 2015.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RAIMBAULT, B.A.; VYN, T.J. Crop rotation and tillage effects on corn growth and soil structural stability. **Agronomy Journal**, v.83, p.979-985, 1991.

RANDALL, G.W.; IRAGAVARAPU, T.K. Impact of long-term tillage systems for continuous corn on nitrate leaching to tile drainage. **Journal of Environmental Quality**, v.24, p.360-366, 1995.

RAVISHANKARA, A.R.; DANIEL, J.S.; PORTMAN, R.W. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st Century. **Science**, v. 326, p. 123-125, 2009.

REEVES, D.W. & J.T. TOUCHTON. Relative phytotoxicity of dicyandiamide and availability of its nitrogen to cotton, corn, and grain sorghum. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50: 1353–1357, 1986.

REETZ JR, F, H. Fertilizantes e o seu uso eficiente, 178p, ANDA, São Paulo, 2017.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Brasília, v. 32, p. 1139–1146, 2008.

Reis Junior, F. B. dos.; Simon, M. F.; Gross, E.; Boddey, R.M.; Elliott, G.N., et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytol.** V.186, p.934-946, 2010.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.; CHANTINI, M.H.; MacDONALD, J.D.; BISSONNETTE, N. & BERTRAND, N. Ammonia volatilization following surface application of urea to tilled and no-till soils: A laboratory comparison. **Soil Tillage Res.**, 103:310-315, 2009c.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.; CHANTINI, M.H.; MacDONALD, J.D.; GASSER, M. & BERTRAND, N. Reducing ammonia volatilization in a no-till soil by incorporating urea and pig slurry in shallow bands. **Nutr. Cycling Agroecosyst.**, 84:71-80, 2009a

RODER, W.; MASON, S.C.; CLEGG, M.D.; KNIEP, K.R. Yield-soil water relationships in sorghum-soybean cropping systems with different fertilizer regimes. **Agronomy Journal**, v.81, p.470-475, 1989.

SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; LECH, V.A. & RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH<sub>3</sub> em decorrência da forma de aplicação de ureia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. **Ci. Rural**, 33:87-692, 2003.

SANZ-COBENA, A.; MISSELBROOK, T.H.; ARCE, A.; MINGOT, J.I.; DIEZ, J.A. & VALLEJO, A. An inhibitor of urease activity effectively reduces ammonia emissions from soil treated with urea under Mediterranean conditions. **Agric. Ecosyst. Environ.**, 126:243-249, 2008.

SANTOS, H. G. dos.; JACOMINE, P.K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAUJO FILHO, J. C. de;

OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

Santos, I. L. dos. **Emissão de óxido nitroso e matéria orgânica do solo em agroecossistemas de longa duração no Cerrado**. Tese(Doutorado) Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 2016.

SENGIK, E.; KIEHL, J. C.; SILVA, M. A. G. Perdas de amônia em solo e de resíduos orgânicos autoclavados e tratados com ureia. *Acta Sci.*, 23:1099-1105, 2001.

SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P.; CONANT, R. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. *Environment Research Letters*, n. 8, 2013.

SILVEIRA, E.; PEREIRA, R.; SCAQUITTO, D.; PEDRINHO, E.; MORAES, S.; WICKERT, E. et al. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

SIMEK, M. Nitrification in soil – terminology and methodology. **Rostlinná Výroba**, v. 46, p. 385-395, 2000.

Six, J.; Conant, R. T.; Paul, E. A.; Paustian, K. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* , v.241, p.155-176, 2002.

SOMMER, K. & K. Rossig. Einfluss der Art Nitrifikation-shemmung auf der Ertrag bei verschiedenartiger N-Düngung und Vorschlag fur eine Klassifizierung. *Landwirtsch. Forsch.*, v.831, p.291–299, 1978.

SOUZA, L. M. Atributos químicos, físicos e biológicos, estrutura de comunidades bacterianas e qualidade de 1030 solos de cerrado sob plantio direto e preparo convencional. 183 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) - 1031 Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicia Veterinária, Brasília, 2011.

SUBBARAO, G. V. et al. Biological nitrification inhibition (BNI): is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 294, n. 1-2, p. 5-18, 2007.

SUBBARAO, G. V. et al. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 106, n. 41, p. 17302-17307, 2009.

STURION, J. A.; BELLOTE, A. F. J. Implantação de povoamentos florestais com espécies de rápido crescimento. In: Galvão APM. Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais. Colombo: **Embrapa Florestas**; p. 209-219, 2000.

TEIXEIRA, L. A. J.; TESTA, V. M.; MIELNICZUK, J. Nitrogênio do solo, nutrição e rendimento do milho afetados por sistemas de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.207-214, 1994.

TIAN, Z.; WANG, J. J.; LIU, S.; ZHANG, Z.; DODLA, S. K.; MYERS, G. Application effects of coated urea and urease and nitrification inhibitors on ammonia and greenhouse gas emissions from a subtropical cotton field of the Mississippi delta region. **Science of the Total Environment**, v. 533, p. 329-338, 2015.

TISDALE, S. L.; BEATON, J. D.; NELSON, W. L. Soil **fertility and fertilizers**. 4.ed. New York: Mac Millan, 754p, 1985.

TORBERT, H. A.; REEVES, D. W.; MULVANEY, R. L. Winter legume cover crop benefits to corn: rotation vs. fixed-nitrogen effects. **Agronomy Journal**, v.88, p.527-535, 1996.

TRENKEL, M. E. Improving fertilizer use efficiency: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. International Fertilizer Industry Association, Paris, 151p. 1997.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; CESAR, V. A.; GAVA, G. J. C. & BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da ureia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v37, p193-201, 2002.

UHART, S. A.; ANDRADE, F. H. Nitrogen deficiency in maize. I. Effects on crop growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. **Crop Science**, v.35, p.1376-1383, 1995.

VAKIRLIS, N.; HEBERT, A. S.; OPULENTE, D. A.; et al. A Molecular Portrait of De Novo Genes in Yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 3, p. 631–645, 2017.

Vilsmeier, K.; Bornemisza, E.; Amberger, A. Urea, ammonium sulfate and dicyandiamide transformations in Costa Rica in soils. *Fertil. Res.*; 12: 255–261, 1987.

YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho? *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n.91, p.1-5, set.2000.

Yang, M.; Fang, Y.; Sun, D. et al. Efficiency of two nitrification inhibitors (dicyandiamide and 3, 4-dimethylpyrazole phosphate) on soil nitrogen transformations and plant productivity: a meta-analysis. *Sci Rep* 6, 2016.

ZHANG, J. F.; X. G. HAN. N<sub>2</sub>O emission from the semi-arid ecosystem under mineral fertilizer (urea and superphosphate) and increased precipitation in northern China, *Atmospheric Environment*, n. 42, p. 291-302, 2008.

ZANATTA, J. A.; BAYER, C.; VIEIRA, F. C. B.; GOMES, J.; TOMAZI, M. Nitrous oxide and methane fluxes in South Brazilian Gleysol as affected by nitrogen fertilizers. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1653-1665, 2010.

ZANATTA, J. A.; ALVES, B. J. R.; BAYER, C.; TOMAZI, M.; FERNANDES, A. H. B. M.; COSTA, F. S.; CARVALHO, A. M. Protocolo para medição de fluxos de gases de efeito estufa do solo. Ed 1a. Colombo: **Embrapa Florestas**; 2014 (Documentos, 265).

## ANEXO 1 – TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES

*Tabela suplementar 1. Aferição da qualidade das bases após remoção de partes das sequências.*

|          |                                                 |           |                     |          |             |
|----------|-------------------------------------------------|-----------|---------------------|----------|-------------|
| Teste 1  | Parâmetros <sup>1</sup> : trim-F 120; trim-R 52 |           |                     |          |             |
|          |                                                 |           | Filtro <sup>2</sup> |          |             |
|          |                                                 | qualidade | denoising           | montagem | não-quimera |
|          | Média                                           | 67,53%    | 64,12%              | 42,68%   | 42,50%      |
|          | Mediana                                         | 71,35%    | 68,72%              | 45,13%   | 44,78%      |
|          | Máximo                                          | 77,01%    | 74,49%              | 58,07%   | 57,70%      |
|          | Mínimo                                          | 7,84%     | 1,96%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 2  | Parâmetros: trim-F 120; trim-R 100              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 88,23%    | 83,71%              | 63,87%   | 63,13%      |
|          | Mediana                                         | 91,98%    | 88,44%              | 66,79%   | 66,11%      |
|          | Máximo                                          | 93,77%    | 91,35%              | 81,98%   | 79,95%      |
|          | Mínimo                                          | 13,73%    | 2,16%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 3  | Parâmetros: trim-F 120; trim-R 110              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 90,01%    | 85,35%              | 66,84%   | 65,58%      |
|          | Mediana                                         | 93,59%    | 90,03%              | 70,11%   | 68,54%      |
|          | Máximo                                          | 95,01%    | 90,05%              | 70,16%   | 68,56%      |
|          | Mínimo                                          | 13,73%    | 2,16%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 4  | Parâmetros: trim-F 110; trim-R 110              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 89,35%    | 84,48%              | 65,19%   | 64,35%      |
|          | Mediana                                         | 92,94%    | 89,21%              | 68,51%   | 67,44%      |
|          | Máximo                                          | 94,44%    | 89,23%              | 68,54%   | 67,46%      |
|          | Mínimo                                          | 11,76%    | 89,21%              | 68,51%   | 67,44%      |
| Teste 5  | Parâmetros: trim-F 120; trim-R 100              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 87,65%    | 82,93%              | 62,69%   | 62,17%      |
|          | Mediana                                         | 91,35%    | 87,72%              | 65,57%   | 65,08%      |
|          | Máximo                                          | 93,27%    | 87,74%              | 65,68%   | 65,26%      |
|          | Mínimo                                          | 11,76%    | 87,72%              | 65,57%   | 65,08%      |
| Teste 6  | Parâmetros: trim-F 120; trim-R 120              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 91,33%    | 86,52%              | 0,02%    | 0,02%       |
|          | Mediana                                         | 94,75%    | 91,12%              | 0,01%    | 0,01%       |
|          | Máximo                                          | 95,90%    | 91,15%              | 0,01%    | 0,01%       |
|          | Mínimo                                          | 13,73%    | 91,12%              | 0,01%    | 0,01%       |
| Teste 7  | Parâmetros: trim-F 100; trim-R 100              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 86,96%    | 82,05%              | 61,88%   | 61,41%      |
|          | Mediana                                         | 90,64%    | 86,94%              | 64,86%   | 64,46%      |
|          | Máximo                                          | 92,54%    | 89,77%              | 80,01%   | 78,40%      |
|          | Mínimo                                          | 11,76%    | 1,44%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 8  | Parâmetros: trim-F 120; trim-R 115              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 90,72%    | 85,97%              | 60,79%   | 58,85%      |
|          | Mediana                                         | 94,20%    | 90,66%              | 63,24%   | 61,48%      |
|          | Máximo                                          | 95,51%    | 90,67%              | 63,37%   | 61,48%      |
|          | Mínimo                                          | 13,73%    | 2,16%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 9  | Parâmetros: trim-F 115; trim-R 110              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 93,28%    | 89,67%              | 69,44%   | 68,05%      |
|          | Mediana                                         | 94,77%    | 89,68%              | 69,47%   | 68,21%      |
|          | Máximo                                          | 13,73%    | 89,67%              | 69,44%   | 68,05%      |
|          | Mínimo                                          | 13,73%    | 3,92%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 10 | Parâmetros: trim-F 115; trim-R 115              |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 93,88%    | 90,26%              | 75,57%   | 73,77%      |
|          | Mediana                                         | 93,88%    | 90,26%              | 75,57%   | 73,77%      |
|          | Máximo                                          | 95,25%    | 90,26%              | 75,58%   | 73,80%      |
|          | Mínimo                                          | 13,73%    | 3,92%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 11 | Parâmetros: trim-F 85; trim-R 117               |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 87,10%    | 81,70%              | 65,16%   | 64,07%      |
|          | Mediana                                         | 90,54%    | 86,71%              | 69,05%   | 67,87%      |
|          | Máximo                                          | 92,22%    | 89,48%              | 78,55%   | 77,07%      |
|          | Mínimo                                          | 9,80%     | 1,44%               | 0,00%    | 0,00%       |
| Teste 12 | Parâmetros: trim-F 93; trim-R 107               |           |                     |          |             |
|          | Média                                           | 87,35%    | 82,21%              | 62,66%   | 62,08%      |
|          | Mediana                                         | 90,92%    | 87,14%              | 66,06%   | 65,44%      |
|          | Máximo                                          | 92,63%    | 87,18%              | 66,17%   | 65,47%      |
|          | Mínimo                                          | 11,76%    | 1,44%               | 0,00%    | 0,00%       |

A análise foi realizada no *plugin dada2* do programa *qiime2*.

<sup>1</sup>Os parâmetros trim-F e trim-R foram ajustados para podar as pontas as extremidades 5' das sequências R1 e R2; os valores para estes parâmetros indicam o número de bases removidos da extremidade das sequências; os parâmetros trunc-F e trunc-R, que podam as extremidades 3' das sequências foram mantidos com valor zero.

<sup>2</sup>Porcentagem de pares de sequências remanescentes, após aplicação de cada filtro indicado.

Fonte: O autor

Tabela suplementar 2. Filtro de seqüências usando a poda em 115pb R1 e 115pb R2.

| ID | Cobertura | DCD | tempo | total   | qualidade |        | denoising |        | Montagem |        | não-quime-<br>ras |        |
|----|-----------|-----|-------|---------|-----------|--------|-----------|--------|----------|--------|-------------------|--------|
| 1  | Solo      | Com | 0     | 25.100  | 23.821    | 94,90% | 22.427    | 89,35% | 18.505   | 73,73% | 17.928            | 71,43% |
| 2  | Solo      | Sem | 0     | 127.983 | 11.995    | 93,73% | 116.383   | 90,94% | 99.255   | 77,55% | 97.160            | 75,92% |
| 3  | Milho     | Com | 0     | 5.376   | 50.649    | 94,21% | 48.135    | 89,53  | 39.290   | 73,08% | 3.836             | 71,36% |
| 4  | Milho     | Sem | 0     | 86.637  | 81.820    | 94,44% | 78.314    | 90,39% | 64.249   | 74,16  | 6.199             | 71,56% |
| 5  | Milho     | Com | 0     | 138.459 | 130.737   | 94,42% | 126.447   | 91,32% | 107.791  | 77,85% | 104.561           | 75,52% |
| 6  | Milho     | Sem | 0     | 103.390 | 95.151    | 92,03% | 91.275    | 88,28% | 75.135   | 72,67% | 72.700            | 70,32% |
| 7  | Milho     | Com | 0     | 93.923  | 88.714    | 94,45% | 85.392    | 90,92% | 71.136   | 75,74% | 69.552            | 74,05% |
| 8  | Eucalipto | Com | 0     | 92.868  | 86.689    | 93,35% | 82.477    | 88,81% | 66.740   | 71,87% | 64.729            | 69,70% |
| 9  | Eucalipto | Sem | 0     | 127.853 | 119.451   | 93,43% | 114.809   | 89,80% | 9.214    | 72,07% | 88.549            | 69,26% |
| 10 | Eucalipto | Com | 0     | 116.151 | 109.567   | 94,33% | 105.366   | 90,71% | 86.811   | 74,74% | 84.302            | 72,58% |
| 11 | Solo      | Sem | 0     | 139.423 | 130.876   | 93,87% | 126.854   | 90,98% | 106.992  | 76,74% | 104.099           | 74,66% |
| 12 | Solo      | Sem | 0     | 178.271 | 167.808   | 94,13% | 163.107   | 91,49% | 134.165  | 75,26% | 128.045           | 71,83% |
| 13 | Eucalipto | Com | 0     | 27.355  | 25.758    | 94,16% | 23.909    | 87,40% | 18.360   | 67,12% | 17.817            | 65,13% |
| 14 | Eucalipto | Sem | 0     | 157.355 | 147.998   | 94,05% | 142.931   | 90,83% | 115.833  | 73,61% | 111.597           | 70,92% |
| 15 | Eucalipto | Sem | 0     | 68.306  | 63.523    | 93,00% | 61.167    | 89,55% | 51.541   | 75,46% | 50.334            | 73,69% |
| 16 | Solo      | Sem | 0     | 90.425  | 84.679    | 93,65% | 81.334    | 89,95% | 67.879   | 75,07% | 66.071            | 73,07% |
| 17 | Solo      | Com | 0     | 43.915  | 41.575    | 94,67% | 39.515    | 89,98% | 32.656   | 74,36% | 31.844            | 72,51% |
| 18 | Solo      | Sem | 0     | 91.722  | 86.024    | 93,79% | 82.847    | 90,32% | 68.909   | 75,13% | 67.278            | 73,35% |
| 19 | Milho     | Sem | 0     | 91.761  | 85.149    | 92,79% | 81.303    | 88,60% | 65.875   | 71,79% | 63.743            | 69,47% |
| 20 | Milho     | Com | 0     | 108     | 67        | 62,04% | 31        | 28,70% | 14       | 12,96% | 10                | 9,26%  |
| 21 | Milho     | Com | 0     | 74.896  | 70.589    | 94,25% | 67.445    | 90,05% | 55.286   | 73,82% | 53.509            | 71,44% |
| 22 | Milho     | Sem | 0     | 81.115  | 76.520    | 94,34% | 72.947    | 89,93% | 60.186   | 74,20% | 58.425            | 72,03% |
| 23 | Eucalipto | Sem | 0     | 103.266 | 93.261    | 90,31% | 89.293    | 86,47% | 70.945   | 68,70% | 68.950            | 66,77% |
| 24 | Eucalipto | Com | 0     | 130.702 | 123.451   | 94,45% | 119.394   | 91,35% | 101.706  | 77,82% | 99.036            | 75,77% |
| 25 | Solo      | Com | 0     | 42.582  | 39.620    | 93,04% | 37.305    | 87,61% | 29.981   | 70,41% | 29.346            | 68,92% |
| 26 | Solo      | Com | 0     | 117.070 | 111.109   | 94,91% | 106.993   | 91,39% | 89.276   | 76,26% | 87.126            | 74,42% |
| 27 | Solo      | Com | 0     | 85.748  | 80.505    | 93,89% | 77.393    | 90,26% | 65.424   | 76,30% | 63.614            | 74,19% |
| 28 | Eucalipto | Sem | 0     | 144.435 | 136.516   | 94,52% | 132.651   | 91,84% | 114.645  | 79,37% | 112.563           | 77,93% |
| 29 | Eucalipto | Com | 0     | 106.173 | 99.441    | 93,66% | 95.857    | 90,28% | 80.968   | 76,26% | 78.471            | 73,91% |
| 30 | Milho     | Sem | 0     | 100.192 | 94.417    | 94,24% | 90.819    | 90,64% | 75.711   | 75,57% | 73.860            | 73,72% |
| 31 | Solo      | Com | 46    | 36.789  | 34.740    | 94,43% | 33.139    | 90,08% | 28.172   | 76,58% | 27.635            | 75,12% |
| 32 | Solo      | Sem | 46    | 74.128  | 68.897    | 92,94% | 66.777    | 90,08% | 59.031   | 79,63% | 58.043            | 78,30% |
| 33 | Milho     | Com | 46    | 119.785 | 112.488   | 93,91% | 108.654   | 90,71% | 93.448   | 78,01% | 91.354            | 76,26% |
| 34 | Milho     | Sem | 46    | 129.892 | 122.357   | 94,20% | 118.391   | 91,15% | 102.007  | 78,53% | 99.415            | 76,54% |
| 35 | Milho     | Com | 46    | 56.500  | 53.566    | 94,81% | 51.224    | 90,66% | 42.716   | 75,60% | 41.732            | 73,86% |
| 36 | Milho     | Sem | 46    | 66.175  | 57.065    | 86,23% | 54.545    | 82,43% | 42.998   | 64,98% | 41.919            | 63,35% |
| 37 | Milho     | Com | 46    | 87.738  | 83.303    | 94,95% | 79.361    | 90,45% | 63.160   | 71,99% | 60.527            | 68,99% |
| 38 | Eucalipto | Com | 46    | 155.275 | 146.065   | 94,07% | 141.833   | 91,34% | 122.992  | 79,21% | 119.707           | 77,09  |
| 39 | Eucalipto | Sem | 46    | 236     | 118       | 50,00% | 78        | 33,05% | 48       | 20,34% | 48                | 20,34% |
| 40 | Eucalipto | Com | 46    | 130.882 | 123.099   | 94,05% | 118.559   | 90,58% | 98.627   | 75,36% | 95.952            | 73,31% |
| 41 | Solo      | Sem | 46    | 62.821  | 58.997    | 93,91% | 56.323    | 89,66% | 46.199   | 73,54% | 44.957            | 71,56% |
| 42 | Solo      | Sem | 46    | 51      | 7         | 13,73% | 2         | 3,92%  | 0        | 0,00%  | 0                 | 0,00%  |
| 43 | Eucalipto | Com | 46    | 121.378 | 114.496   | 94,33% | 111.291   | 91,69% | 97.956   | 80,70% | 95.860            | 78,98% |

|       |           |     |     |           |           |        |           |        |           |        |           |        |
|-------|-----------|-----|-----|-----------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| 44    | Eucalipto | Sem | 46  | 103.180   | 94.756    | 91,84% | 91.661    | 88,84  | 76.677    | 74,31% | 75.164    | 72,85% |
| 45    | Eucalipto | Sem | 46  | 90.946    | 84.000    | 92,36% | 80.830    | 88,88% | 67.455    | 74,17% | 65.629    | 72,16% |
| 46    | Solo      | Sem | 46  | 167.199   | 157.137   | 93,98% | 153.492   | 91,80% | 139.642   | 83,52% | 136.145   | 81,43% |
| 47    | Solo      | Com | 46  | 340       | 247       | 72,65% | 186       | 54,71% | 138       | 40,59% | 138       | 40,59% |
| 48    | Solo      | Sem | 46  | 88.800    | 83.554    | 94,09% | 80.418    | 90,56% | 68.879    | 77,57% | 67.379    | 75,88% |
| 49    | Milho     | Sem | 46  | 101.716   | 96.752    | 95,12% | 94.008    | 92,42% | 83.889    | 82,47  | 82.530    | 81,14% |
| 50    | Milho     | Com | 46  | 92.096    | 87.719    | 95,25% | 8.373     | 90,92% | 68.743    | 74,64% | 66.860    | 72,60% |
| 51    | Milho     | Com | 46  | 95.504    | 89.952    | 94,19% | 87.066    | 91,16% | 75.531    | 79,09% | 74.093    | 77,58% |
| 52    | Milho     | Sem | 46  | 114.856   | 108.980   | 94,88% | 105.494   | 91,85% | 91.315    | 79,50% | 89.515    | 77,94% |
| 53    | Eucalipto | Sem | 46  | 121.129   | 113.346   | 93,57% | 109.565   | 90,45% | 91.325    | 75,39% | 89.068    | 73,53% |
| 54    | Eucalipto | Com | 46  | 159.246   | 14.854    | 93,28% | 143.730   | 90,26% | 121.240   | 76,13% | 117.853   | 74,01% |
| 55    | Solo      | Com | 46  | 34.421    | 3.231     | 93,87% | 30.702    | 89,20% | 25.382    | 73,74% | 24.737    | 71,87% |
| 56    | Solo      | Com | 46  | 96.213    | 91.519    | 95,10% | 88.578    | 92,06% | 7.723     | 80,28% | 75.771    | 78,75% |
| 57    | Solo      | Com | 46  | 111.445   | 105.689   | 94,84% | 102.024   | 91,55% | 84.720    | 76,02% | 82.519    | 74,04% |
| 58    | Eucalipto | Sem | 46  | 56.481    | 52.753    | 93,40% | 50.230    | 88,93% | 40.683    | 72,03% | 39.723    | 70,33% |
| 59    | Eucalipto | Com | 46  | 88.681    | 82.311    | 92,82% | 79.738    | 89,92% | 68.422    | 77,16% | 66.959    | 75,51% |
| 60    | Milho     | Sem | 46  | 226.058   | 212.395   | 93,96% | 207.066   | 91,60% | 179.502   | 79,41% | 174.445   | 77,70% |
| 61    | Solo      | Com | 185 | 52.692    | 49.578    | 94,09% | 47.062    | 89,32% | 37.751    | 71,64% | 36.552    | 69,37% |
| 62    | Solo      | Sem | 185 | 96.758    | 91.089    | 94,14% | 88.389    | 91,35% | 77.058    | 79,64% | 75.645    | 78,18% |
| 63    | Milho     | Com | 185 | 87.775    | 82.978    | 94,53% | 79.943    | 91,08% | 69.379    | 79,04% | 68.141    | 77,63% |
| 64    | Milho     | Sem | 185 | 45.736    | 43.050    | 94,13% | 41.091    | 89,84% | 34.773    | 76,03% | 33.732    | 73,75% |
| 65    | Milho     | Com | 185 | 54.473    | 51.422    | 94,40% | 49.596    | 91,05% | 43.720    | 80,26% | 43.187    | 79,28% |
| 66    | Milho     | Sem | 185 | 61.294    | 56.477    | 92,14% | 54.328    | 88,64% | 4.632     | 75,58% | 45.318    | 73,94% |
| 67    | Milho     | Com | 185 | 90.913    | 82.754    | 91,03% | 80.120    | 88,13% | 68.542    | 75,39% | 67.306    | 74,03% |
| 68    | Eucalipto | Com | 185 | 103.833   | 97.404    | 93,81% | 93.667    | 90,21% | 79.546    | 76,61% | 77.309    | 74,46% |
| 69    | Eucalipto | Sem | 185 | 80.276    | 75.466    | 94,01% | 72.800    | 90,69% | 62.324    | 77,64% | 6.109     | 76,10% |
| 70    | Eucalipto | Com | 185 | 171.240   | 156.646   | 91,48% | 152.958   | 89,32% | 135.672   | 79,23% | 132.087   | 77,14% |
| 71    | Solo      | Sem | 185 | 115.731   | 108.175   | 93,47% | 105.834   | 91,45% | 95.791    | 82,77% | 93.815    | 81,06% |
| 72    | Solo      | Sem | 185 | 11.829    | 10.914    | 92,26% | 10.152    | 85,82% | 8.026     | 67,85% | 7.795     | 65,90% |
| 73    | Eucalipto | Com | 185 | 139       | 55        | 39,57% | 7         | 5,04%  | 0         | 0,00%  | 0         | 0,00%  |
| 74    | Eucalipto | Sem | 185 | 26.393    | 24.745    | 93,76% | 23.564    | 89,28% | 20.392    | 77,26% | 19.477    | 73,80% |
| 75    | Eucalipto | Sem | 185 | 66.756    | 62.209    | 93,19% | 60.434    | 90,53% | 54.228    | 81,23% | 53.060    | 79,48% |
| 76    | Solo      | Sem | 185 | 77.716    | 72.905    | 93,81% | 71.477    | 91,97% | 65.444    | 84,21% | 64.095    | 82,47% |
| 77    | Solo      | Com | 185 | 159.096   | 148.769   | 93,51% | 145.829   | 91,66% | 13.219    | 83,09% | 129.569   | 81,44% |
| 78    | Solo      | Sem | 185 | 8.991     | 8.408     | 93,52% | 7.780     | 86,53% | 6.114     | 68,00% | 5.956     | 66,24% |
| 79    | Milho     | Sem | 185 | 624.869   | 587.730   | 94,06% | 581.728   | 93,10% | 533.972   | 85,45% | 520.438   | 83,29% |
| 80    | Milho     | Com | 185 | 90.028    | 84.029    | 93,34% | 81.384    | 90,40% | 70.084    | 77,85% | 68.719    | 76,33% |
| 81    | Milho     | Com | 185 | 102.416   | 94.859    | 92,62% | 92.113    | 89,94% | 79.919    | 78,03% | 78.368    | 76,52% |
| 82    | Milho     | Sem | 185 | 20.276    | 18.808    | 92,76% | 17.550    | 86,56% | 13.542    | 66,79% | 12.950    | 63,87% |
| 83    | Eucalipto | Sem | 185 | 68.181    | 64.367    | 94,41% | 62.685    | 91,94% | 56.869    | 83,41% | 55.370    | 81,21% |
| 84    | Eucalipto | Com | 185 | 140.174   | 132.181   | 94,30% | 128.607   | 91,75% | 109.730   | 78,28% | 106.196   | 75,76% |
| 85    | Solo      | Com | 185 | 32.549    | 30.209    | 92,81% | 28.456    | 87,43% | 23.243    | 71,41% | 22.778    | 69,98% |
| 86    | Solo      | Com | 185 | 51.894    | 47.310    | 91,17% | 45.552    | 87,78% | 37.538    | 72,34% | 36.742    | 70,80% |
| 87    | Solo      | Com | 185 | 108       | 46        | 42,59% | 20        | 18,52% | 3         | 2,78%  | 3         | 2,78%  |
| 88    | Eucalipto | Sem | 185 | 119.006   | 111.913   | 94,04% | 10.992    | 92,37% | 101.281   | 85,11% | 99.424    | 83,55% |
| 89    | Eucalipto | Com | 185 | 60.040    | 51.725    | 86,15% | 4.997     | 83,23% | 41.337    | 68,85% | 40.368    | 67,24% |
| 90    | Milho     | Sem | 185 | 30.340    | 27.889    | 91,92% | 26.232    | 86,46% | 21.131    | 69,65% | 20.607    | 67,92% |
| TOTAL |           |     |     | 8.234.043 | 7.485.983 |        | 7.282.805 |        | 6.098.358 |        | 6.102.047 |        |

|           |           |            |            |            |            |             |
|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| DCD       | Com       | 3.684.089  | 3.335.536  | 3.252.855  | 2.672.597  | 2.754.703   |
|           | Sem       | 4.549.954  | 4.150.447  | 4.029.950  | 3.425.761  | 3.347.344   |
| Cobertura | Solo      | 2.221.810  | 1.949.433  | 2.016.350  | 1.537.115  | 1.682.785   |
|           | Milho     | 3.074.297  | 2.928.386  | 2.760.375  | 2.397.676  | 2.287.551   |
|           | Eucalipto | 2.937.936  | 2.608.164  | 2.506.080  | 2.163.567  | 2.131.711   |
| Tempo     | 0         | 2.792.560  | 2.557.480  | 2.564.120  | 2.044.478  | 1.975.254   |
|           | 46        | 2.789.961  | 2.454.393  | 2.453.338  | 2.088.620  | 2.105.677   |
|           | 185       | 2.651.522  | 2.474.110  | 2.265.347  | 1.965.260  | 2.021.116   |
| MÉDIA     |           | 91489,3667 | 83177,5889 | 80920,0556 | 67759,5333 | 67800,52222 |
| DCD       | Com       | 81868,6444 | 74123,0222 | 72285,6667 | 59391,0444 | 61215,62222 |
|           | Sem       | 101110,089 | 92232,1556 | 89554,4444 | 76128,0222 | 74385,42222 |
| Cobertura | Solo      | 74060,3333 | 64981,1    | 67211,6667 | 51237,1667 | 56092,83333 |
|           | Milho     | 102476,567 | 97612,8667 | 92012,5    | 79922,5333 | 76251,7     |
|           | Eucalipto | 97931,2    | 86938,8    | 83536      | 72118,9    | 71057,03333 |
| Tempo     | 0         | 93085,3333 | 85249,3333 | 85470,6667 | 68149,2667 | 65841,8     |
|           | 46        | 92998,7    | 81813,1    | 81777,9333 | 69620,6667 | 70189,23333 |
|           | 185       | 88384,0667 | 82470,3333 | 75511,5667 | 65508,6667 | 67370,53333 |

\*Células destacadas com a cor azul representam as amostras que foram excluídas



**Figura Suplementar 2 A.** Imagem de gel de agarose obtidas pelo fotodocumentador mostrando a amplificação por PCR com aproximadamente 371 pares de base do Gene 16S rRNA da região V4 do DNA extraído do solo, as amostras foram dispostas no gel na seguinte ordem, da esquerda para a direita as amostras 1, 13, 25, 37, 49, 61, 73, 2, 14, 26, 38, 50, 62, 74, 3, 15, 27, 39, 51, 63, 75, 4, 16, 28, 40, 52, 64, 76 no grupo superior do gel, as amostras 5,17,29, 41, 53, 65, 77, 6, 18, 30,42, 54, 66, 78,7, 19, 31, 43, 55, 67, 79, 8, 21, 33, 45, 57, 69, 80 no grupo intermediário e as amostras 9, 21, 33, 45, 57, 69, 81, 10, 22, 34, 46, 58, 70, 82, 11, 23, 35, 47, 59, 71, 83, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84.

Fonte: O autor

B



**Figura Suplementar2 B.** Imagem de gel de agarose obtidas pelo fotodocumentador mostrando a amplificação por PCR com aproximadamente 371 pares de base do Gene 16S rRNA da região V4 do DNA extraído do solo, as amostras foram dispostas no gel na seguinte ordem, 85, 86,87,88,89,90 e as repetições das amostras 5, 35, 39, 42, 73, 82.

Fonte: O autor

**Figura\_suplementar 3.** Demonstração da posição dos iniciadores 515F e 806R no organismo na sequência do gene 16S rRNA *Escherichia coli* demonstrando o tamanho do amplificado de 254 pb.

```

0 AAAATTGAAGAGTTTGCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGA 80
81 AGCTTGCTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCGTATGGAGGGGGATAACTACTGGAA 160
161 ACGGTAGCTAATACCGCATAACTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGG 240
241 GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA 320
321 CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC 400
401 GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG 480
481 ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT 560
561 TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACATGCATCTGAT 640
641 ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG 720
721 GTGGCGAAGGCGGCCCTTCGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT 800
801 AGTCCAGCCCTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCG 880
881 CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATT 960
961 CGATGCAACGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCCTCGGGAACCGTG 1000
1001 AGACAGGTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCCAACCCCTTATCCCT 1120
1121 TTGTTGCCAGCGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACCTCAAGTCA 1200
1201 TCATGGCCCTTACGACCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCCGAC 1280
1281 CTCATAAAGTGGCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG 1360
1361 AATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTA 1440
1441 GCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAGGTAAACCGTAGGGGAAC 1520
1521 TCGGTTGGATCACCTCCTTA 1540

```

| Figura supl.6 30 Eucalipto -DCD  |  | Reino        |        | Filo                 |      |      | Gênero            |       |       |        |
|----------------------------------|--|--------------|--------|----------------------|------|------|-------------------|-------|-------|--------|
| W 6840                           |  | D_0_Bacteria |        | D_1_Actinobacteria   |      |      | D_5_Nocardioides  |       |       |        |
| Percentil                        |  | 25           | 50     | 75                   | 25   | 50   | 75                | 25    | 50    | 75     |
| Grupo                            |  | Início       | Início | Início               | Meio | Meio | Meio              | Final | Final | Final  |
| 5ddc39973a65183a235b973d6107e4a3 |  | 1.0          | 1.0    | 1.0                  | 1.0  | 1.0  | 1.0               | 564.0 | 777.0 | 1219.0 |
| Figura supl.7 Eucalipto +DCD     |  | Reino        |        | Filo                 |      |      | Gênero            |       |       |        |
| W 150                            |  | D_0_Bacteria |        | D_1_Gemmatimonadetes |      |      | D_5_Gemmatimonas  |       |       |        |
| Percentil                        |  | 25           | 50     | 75                   | 25   | 50   | 75                | 25    | 50    | 75     |
| Grupo                            |  | Início       | Início | Início               | Meio | Meio | Meio              | Final | Final | Final  |
| b5259ad782032057aeb489ea198d733f |  | 1.0          | 1.0    | 1.0                  | 1.0  | 1.0  | 1.0               | 718.5 | 821.0 | 906.00 |
| Figura supl.8 Milho -DCD         |  | Reino        |        | Filo                 |      |      | Gênero            |       |       |        |
| W 168                            |  | D_0_Bacteria |        | D_1_Actinobacteria   |      |      | D_5_Modestobacter |       |       |        |
| Percentil                        |  | 25           | 50     | 75                   | 25   | 50   | 75                | 25    | 50    | 75     |
| Grupo                            |  | Início       | Início | Início               | Meio | Meio | Meio              | Final | Final | Final  |
| f2a25bcd1a407e0071ebd4b9fafb8002 |  | 1.0          | 1.0    | 1.0                  | 1.0  | 1.0  | 1.0               | 163.0 | 384.0 | 452.0  |
| Figura supl.9 Milho +DCD         |  | Reino        |        | Filo                 |      |      | Gênero            |       |       |        |
| W 6275                           |  | D_0_Bacteria |        | D_1_Proteobacteria   |      |      | D_5_Ellin6055     |       |       |        |
| Percentil                        |  | 25           | 50     | 75                   | 25   | 50   | 75                | 25    | 50    | 75     |
| Grupo                            |  | Início       | Início | Início               | Meio | Meio | Meio              | Final | Final | Final  |
| e1999277a0fbcb501a4ae0a4844ec188 |  | 1.0          | 1.0    | 1.0                  | 1.0  | 1.0  | 1.0               | 483.0 | 559.0 | 772.0  |
| Figura supl.10 Solo-nu -DCD      |  | Reino        |        | Filo                 |      |      | Gênero            |       |       |        |
| W 167                            |  | D_0_Bacteria |        | D_1_Proteobacteria   |      |      | D_5_Ellin6055     |       |       |        |

|                                    |              |        |        |                    |      |      |           |       |       |
|------------------------------------|--------------|--------|--------|--------------------|------|------|-----------|-------|-------|
| Percentil                          | 25           | 50     | 75     | 25                 | 50   | 75   | 25        | 50    | 75    |
| Grupo                              | Inicio       | Inicio | Inicio | Meio               | Meio | Meio | Final     | Final | Final |
| e1999277a0fbc501a4ae0a4844ec188    | 1.0          | 1.0    | 1.0    | 1.0                | 1.0  | 1.0  | 130.0     | 582.0 | 786.0 |
| <b>Figura supl.11</b> Solo nu +DCD | Reino        |        |        | Filo               |      |      | Gênero    |       |       |
| W 1165                             | D_0 Bacteria |        |        | D_1 Proteobacteria |      |      | D_5 966-1 |       |       |
| Percentil                          | 25           | 50     | 75     | 25                 | 50   | 75   | 25        | 50    | 75    |
| Grupo                              | Inicio       | Inicio | Inicio | Meio               | Meio | Meio | Final     | Final | Final |
| e62705aa17e7362869622aaa232d2638   | 17.0         | 21.0   | 35.0   | 1.0                | 1.0  | 1.0  | 1.0       | 1.0   | 1.0   |

fonte: <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/A14565> modificado pelo autor.

**Tabela\_suplementar 3** identificação das sequencias mais abundantes diferencialmente.

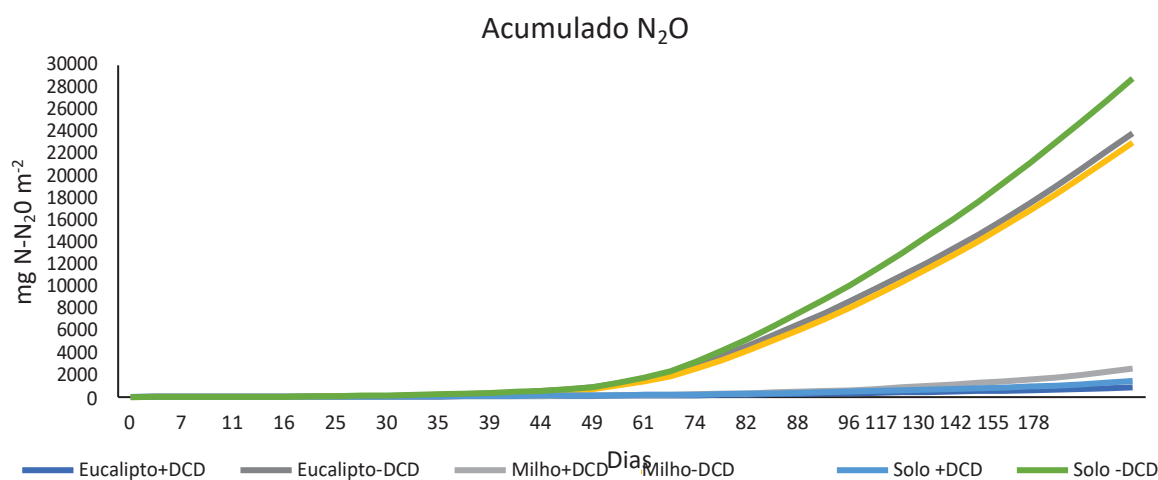


**Figura Suplementar 4** Acumulado N-N<sub>2</sub>O calculado pela área integrada em mg N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>dia<sup>-1</sup> nos 185 dias amostrados.  
Fonte: O autor

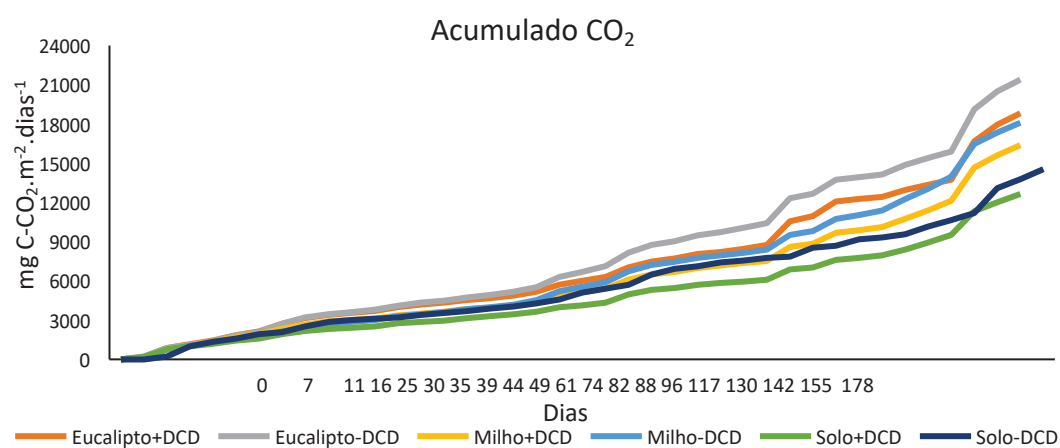


**Figura Suplementar 5** Acumulado CO<sub>2</sub> calculado pela área integrada em mg C-CO<sub>2</sub>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> nos 185 dias amostrados.  
Fonte: O autor

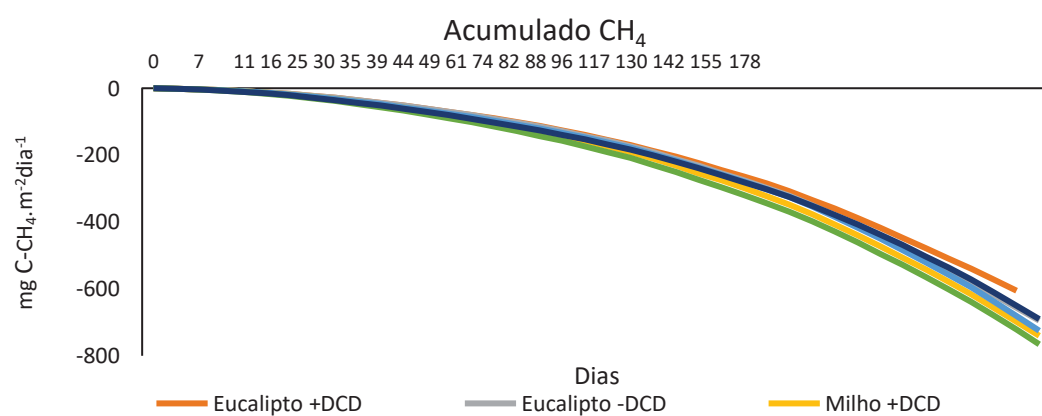


**Figura Suplementar 6** Acumulado CH<sub>4</sub> calculado pela área integrada em mg C-CH<sub>4</sub>. m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> nos 185 dias amostrados.  
Fonte: O autor

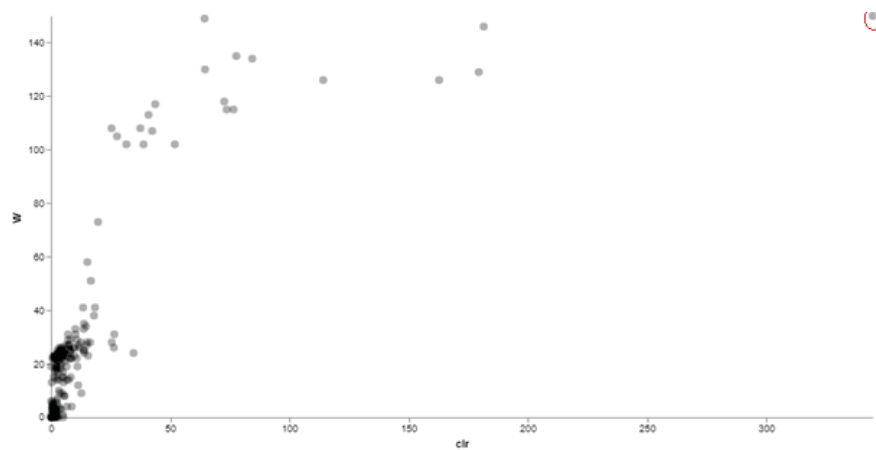


Figura suplementar 7 Abundancia diferencial Eucalipto Com-DCD  
 Fonte: O autor

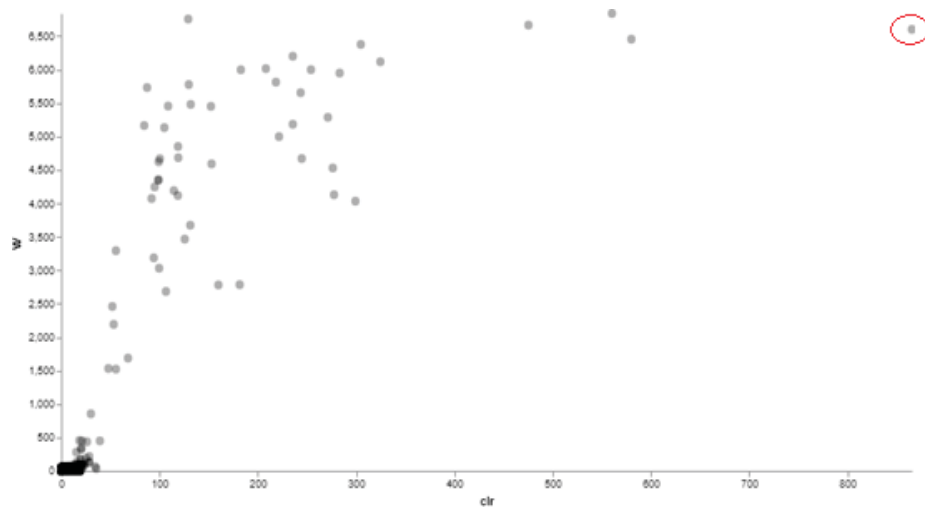


Figura suplementar 8 Abundancia diferencial Eucalipto Sem-DCD  
 Fonte: O autor

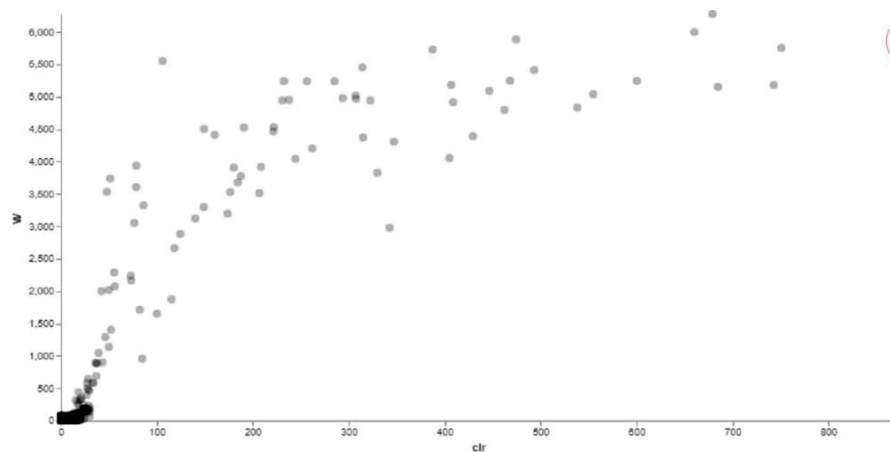


Figura suplementar 9 Abundancia diferencial Milho Com-DCD  
 Fonte: O autor

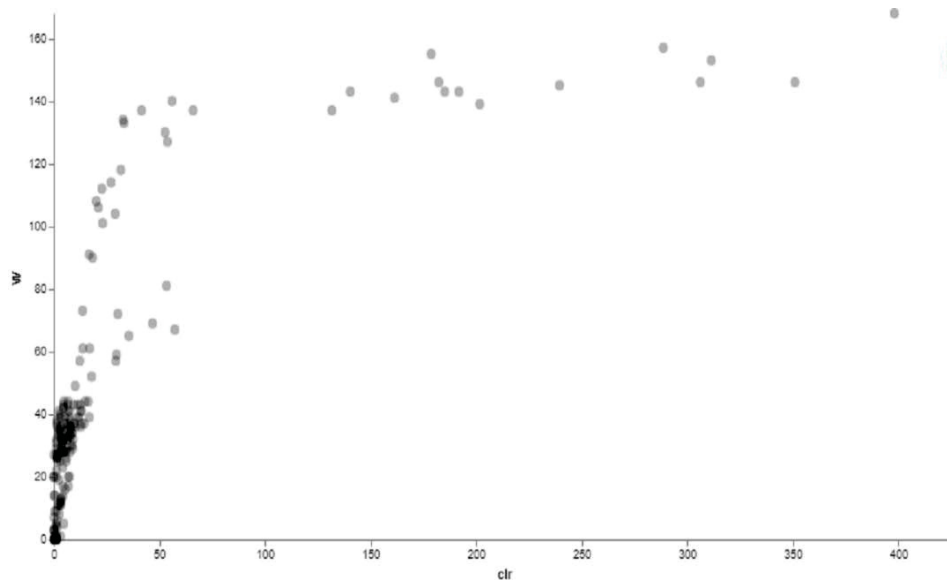


Figura suplementar 10 Abundancia diferencial Milho Sem- DCD.  
 Fonte: O autor

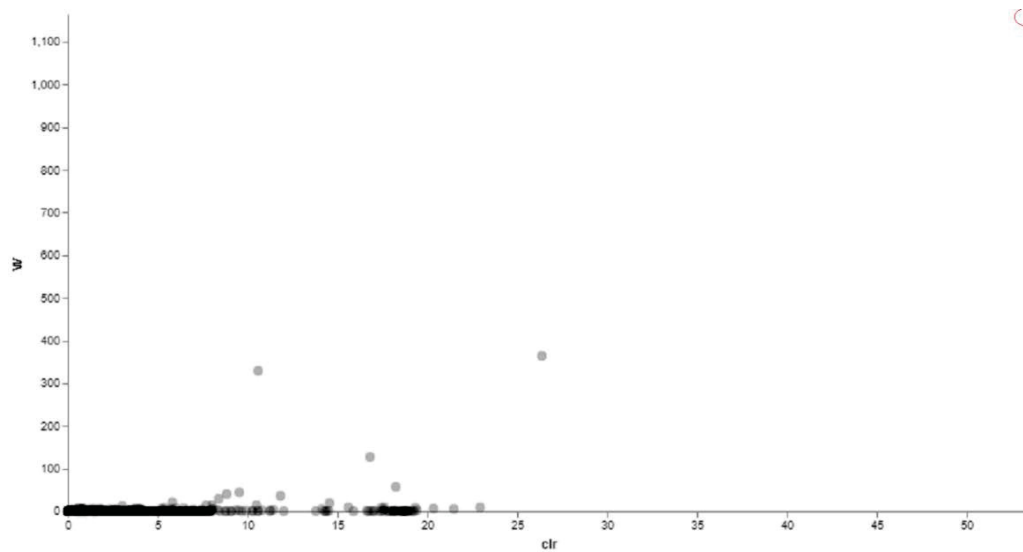


Figura suplementar 11 Abundancia diferencial Solo nu Com-DCD.  
Fonte: O autor

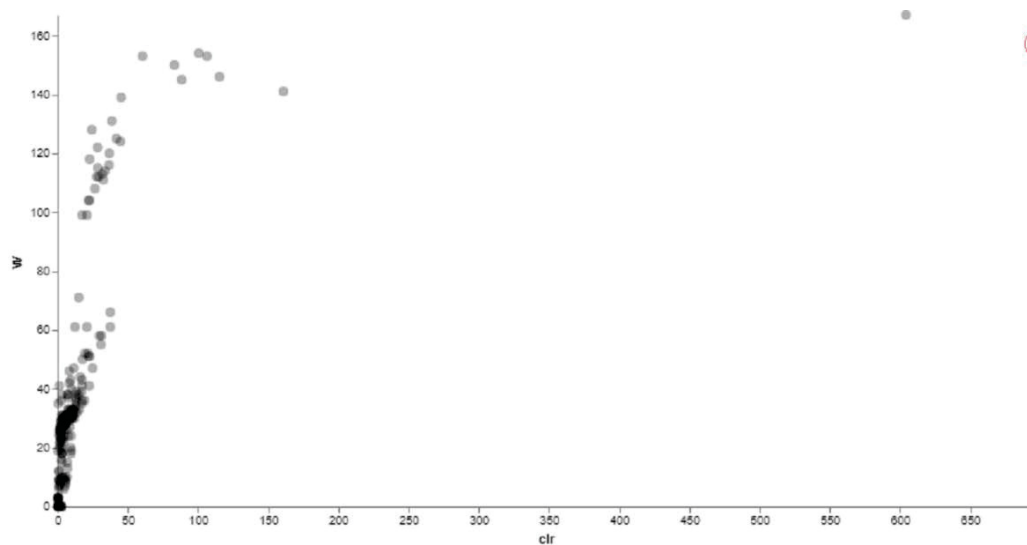


Figura suplementar 12 Abundancia diferencial Solo nu Sem-DCD.  
Fonte: O autor