

FERNANDA CRISTINA CAPARELLI DE OLIVEIRA

**EMIÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E DINÂMICA DA
POPULAÇÃO MICROBIANA E DO CARBONO NO SOLO EM
POVOAMENTO DE EUCALIPTO IMPLANTADO NO BIOMA PAMPA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Oliveira, Fernanda Cristina Caparelli de, 1984-
O48e Emissão de gases de efeito estufa e dinâmica da população
2015 microbiana e do carbono no solo em povoamento de eucalipto
implantado no bioma Pampa / Fernanda Cristina Caparelli de
Oliveira. – Viçosa, MG, 2015.
ix, 66f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ivo Ribeiro da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.60-66.

1. Ciências do solo. 2. Eucalipto. 3. Gases estufa. 4. Ácidos
Graxos. 5. Isótopos de Carbono. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Solos. Programa de Pós-graduação em
Solos e Nutrição de Plantas. II. Título.

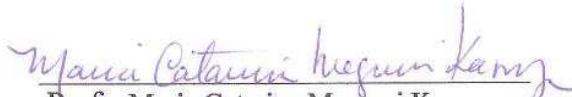
CDD 22 ed. 631.4


FERNANDA CRISTINA CAPARELLI DE OLIVEIRA

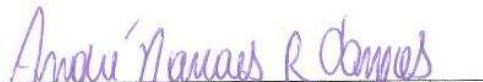
**EMIÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E DINÂMICA DA
POPULAÇÃO MICROBIANA E DO CARBONO NO SOLO EM
POVOAMENTO DE EUCALIPTO IMPLANTADO NO BIOMA PAMPA**


Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Solos e
Nutrição de Plantas, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.


APROVADA: 31 de julho de 2015.


Profa. Maria Catarina Megumi Kasuya


Dra. Fernanda Schulthais


Prof. André N. da Rocha Campos


Profa. Emanuelle M. Barros Soares
(Co-orientadora)


Prof. Ivo Ribeiro da Silva
(Orientador)

Ao povo brasileiro, pois sob o suor de seus esforços
fui agraciada com uma universidade pública de qualidade.
Que eu consiga retribuir à sociedade minha eterna gratidão!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

E o que parecia distante há quatro anos chega ao final...Tese, sua linda, você está pronta! Porém, todo final é um novo recomeço e quem experimenta o mundo acadêmico sabe disto. O conhecimento é realmente uma fonte que não se seca e quem a bebe nunca mais será o mesmo. Foram momentos enriquecedores, com crescimento intelectual e pessoal. Nesta trajetória, tive o imenso privilégio de conhecer e contar com pessoas muito especiais. Fica registrada aqui, minha eterna gratidão...

FAPEMIG E CAPES, pelo apoio financeiro

Universidade Federal de Viçosa, berço de toda minha formação profissional

Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, pela formação acadêmica e minha eterna gratidão aos professores deste departamento pelo exemplo e pela importante contribuição ao meu aprendizado acadêmico. Em especial, Júlio César Lima Neves, Nairam Félix de Barros, Victor Hugo Alvarez V.

Ao meu orientador, Ivo Ribeiro da Silva, por ter me aceitado com sua orientada, acreditado no meu trabalho e pelo esforço para que este pudesse ser realizado.

Emanuelle Mercês Barros Soares, por sua coorientação e pelo suporte em tantos momentos difíceis.

A dra. Jennifer A.J. Dungait e ao instituto Rothamsted Research...”where knowledge grows”

Aos professores, Maria Catarina Megumi Kasuya, André Narvaes da Rocha Campos e a doutora Fernanda Schulthais pelas críticas e sugestões na correção deste trabalho

Ao Elias Frank de Araújo, por ter disponibilizado à área de estudo deste trabalho e cedido à mão-de-obra, equipe SETERF, que sobre chuva, suor montou um experimento tão sacrificante. Marcão, Donai, Soldadinho, Dionathan, Claudinho, Sr. Renato e Sr. Joãozinho, muito obrigada!

Aos funcionários do DPS: João Milagres, Humberto, Júlio e Giovani, Cardoso, Beto, Poliana, Geraldo Vitor, Zé Luiz, Carlinhos e Lú.

Aos amigos do Laboratório de Isótopos Estáveis, que se tornou para mim, a família LIE: Aline, Silvano, Rafa, Croc, Ivan, Chico Bento, Thalles, Holandês, Denner, Baiano, Maílson, Gusta, Colcho, Luís Fernando foram momento de tantas alegrias, cumplicidade e apoio! Em especial ao Lucas e Françoise...obrigado por terem se dedicado a este experimento.

Amigas de republica, família que escolhi.

Família, base de tudo o que sou. Apoio incondicional, amor maior

Gabriel, pois tudo faz mais sentido contigo!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
I – INTRODUÇÃO GERAL	1
II – CAPÍTULO 1	3
EMISSÕES DE CO ₂ E CH ₄ E O PARTICIONAMENTO DA RESPIRAÇÃO DO SOLO EM ÁREAS DE EUCALIPTO E VEGETAÇÃO NATURAL, NO BIOMA PAMPA	3
1. Introdução.....	3
2. Material e Métodos	5
2.1 Caracterização da área de estudo e instalação do experimento.	5
2.2 Medições do crescimento florestal.....	8
2.3 Coleta dos gases	9
2.4 Cálculo de fluxos de gases e particionamento do CO ₂	9
2.4.1 Fluxo de CO ₂ e CH ₄ e a $\delta^{13}\text{C-CO}_2$	9
2.4.2 Partição do CO ₂ autotrófico e heterotrófico nas florestas de eucalipto.....	10
2.4.3 Contribuição do C de eucalipto para a concentração de CO ₂ nas camadas do solo	10
2.5 Análises estatísticas	11
3. Resultados e Discussão.....	12
3.1 Crescimento florestal	12
3.2 Variação temporal da umidade no perfil do solo	12
3.3 Efluxos de C-CO ₂ , C-CH ₄ e $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ durante o experimento	13
3.3.1 Efluxos de C-CO ₂ e C-CH ₄ em áreas de eucalipto e Pampa	13
3.3.2 Dinâmica do CO ₂ nas áreas de eucalipto e os componentes da respiração do solo.	15
3.4 Concentração de CO ₂ , CH ₄ e $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ em profundidade.....	18
3.4.1 Concentrações de CO ₂ e CH ₄ em áreas de Pampa e Eucalipto e a contribuição do C de eucalipto para o CO ₂ por camadas do solo.....	18
3.4.2 Concentrações de CO ₂ nas áreas de eucalipto	21
3.4.3 Razão Isotópica do C-CO ₂ ao longo do perfil do solo.....	26
3.4.4 Dinâmica da concentração de CO ₂ nas camadas do solo	28
3.4.5 Concentração de CH ₄	30
4. Conclusões	32
5. References.....	32
III- CHAPTER 2.....	40

STABLE ISOTOPE TRACING OF CHANGES ON SOIL ORGANIC MATTER FRACTIONS AND MICROBIAL COMMUNITIES FOLLOWING THE SIMULATED MANAGEMENT OF EUCALYPT HARVEST RESIDUES	40
1. Introduction.....	40
2. Material and methods	42
2.1 Study site and experimental design	42
2.2 Soil CO ₂ efflux measurements	44
2.3 Residue and soil analyses	45
2.4 PLFA analyses	45
2.5 Isotopic calculations	46
3. Results	48
3.1 Residue decomposition.....	48
3.2 Labile carbon mineralization and $\delta^{13}\text{C}$ -CO ₂ efflux.....	48
3.3 PLFA abundance and C input from residue to PFLA.....	50
3.4 C and N on SOM fractions.....	53
3.5 C input from residue to SOM fractions.....	53
4. Discussion.....	54
4.1 Residue mineralization.....	54
4.2 Microbial dynamics over litter decomposition	56
4.3 Soil C concentration and contribution of residue derived-C to SOM fractions.....	58
5. Conclusions.....	60
6. References.....	60
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

RESUMO

OLIVEIRA, Fernanda Cristina Caparelli de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Emissão de gases de efeito estufa e dinâmica da população microbiana e do carbono no solo em povoamento de eucalipto implantado no Bioma Pampa.** Orientador: Ivo Ribeiro da Silva. Coorientadores: Emanulle Mercês Barros Soares e Igor Rodrigues de Assis.

A contribuição da agricultura para as emissões dos gases de efeito estufa (GEE) tem sido abordada em vários estudos. Os solos podem atuar como fonte ou dreno destes gases. O sequestro de C no solo pode contribuir para a mitigação das mudanças climáticas em algumas regiões, dependendo das opções disponíveis para as práticas de manejo e uso do solo. Este estudo está dividido em 2 experimentos, os quais foram conduzidos em uma área localizada no município de São Gabriel (30°26' S; 54°31' W), região da Depressão Central, Rio Grande do Sul, Brasil. O experimento 1 teve como objetivos: (1) avaliar as emissões de CO₂ e CH₄ em uma área de substituição do Bioma Pampa por plantio de Eucalipto; (2) avaliar as emissões de CO₂ na floresta de eucalipto frente à diferentes entradas de C ao solo; (3) determinar a contribuição da respiração autotrófica para os fluxos de CO₂; (4) avaliar a concentração de CO₂, CH₄ nas camadas do solo sob o bioma Pampa e o plantio de eucalipto, (5) determinar a contribuição relativa do CO₂ de eucalipto para as camadas do solo. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados (DBC) com 4 repetições. Nas áreas de eucalipto, para a quantificação da concentração de CO₂, CH₄ e razão isotópica do carbono (¹³C/¹²C), os tratamentos consistiram em 2 posições no talhão (L ou EL), 2 manejos da serapilheira [com (+S) e sem (-S)], 2 aportes de C radicular [com (+R) e sem (-R)] e um tratamento adicional (Bioma Pampa). Nos pampas, para a comparação da concentração de CO₂, CH₄ e ¹³C/¹²C e fluxo de CO₂, CH₄ com o plantio de eucalipto, foi utilizado o delineamento sistemático. Durante 29 meses de crescimento da floresta de eucalipto, as emissões de CO₂ foram maiores na área do Pampa do que no plantio florestal. O mesmo foi observado para a concentração de CO₂ ao longo do perfil do solo, até 1 m de profundidade. O estabelecimento de plantios de eucalipto não alterou as emissões de CH₄. A contribuição da respiração autotrófica para a respiração do solo aumentou linearmente ao longo do experimento sendo a menor contribuição observada em Fevereiro 2014. O experimento 2 teve como objetivos: 1) avaliar a taxa de decomposição dos resíduos da colheita de eucalipto; 2) Identificar os grupos de microorganismos responsáveis pela

decomposição dos resíduos; 3) Avaliar o efeito da qualidade dos resíduos de eucalipto para as frações da MOS; 4) Quantificar o conteúdo de C derivado do resíduo incorporado no PLFA e na MOS. Utilizado o DBC com 4 repetições, com os tratamentos foram arranjados em parcelas subdivididas. A parcela constituiu dos 4 tempos de coleta (0, 3, 6, 12 meses posteriores à instalação do experimento). Na subparcela, os tratamentos consistiram de um fatorial 3x2x2, sendo 3 composições do resíduo (sem resíduo, resíduo completo e resíduo completo menos casca), 2 tipos de manejo (resíduos incorporados e deixados na superfície) e níveis de N (0 e 200 kg/ha). A incorporação dos resíduos aumenta taxa de decomposição e reduz a estabilização de C no solo. Quando deixados na superfície houve uma redução na taxa de decomposição e para resíduos com casca a taxa de decomposição era 20 % menor. Bactérias gram-negativa e Fungos foram os grupos microbianos mais responsáveis pela decomposição dos resíduos. A presença da casca e a adição de N aumentaram a estabilização do C no solo e a incorporação de C dos resíduos pelos G-ve e Fungos. O estabelecimento de plantios de eucalipto nas áreas do Pampa mostrou um grande potencial para mitigar as emissões de GEE e aumentar a estabilização do C no solo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Fernanda Cristina Caparelli de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Greenhouse gases emission and dynamic of microbial population and carbon in soil of Eucalyptus stand planted in Pampa Biome.** Adviser: Ivo Ribeiro da Silva. Co-advisers: Emanulle Mercês Barros Soares and Igor Rodrigues de Assis.

The contribution of agriculture to greenhouse gases emissions has been reported in many studies. Soils can act as a sink or source for these gases. Soil carbon sequestration can contribute to climate change mitigation in some regions, relying on available management practices and soil use. This study is shared in 2 experiments, that were conducted in a site located at São Gabriel town (30°26' S; 54°31' W), Central Depression region, Rio Grande do Sul, Brazil. Experiment 1 aims to (1) evaluate CO₂ and CH₄ emissions in a site which Pampa Biome was substituted by Eucalyptus plantation; (2) evaluate CO₂ in a eucalyptus plantation due to different C source in soil; (3) determinate the contribution of autotrophic respiration to CO₂ fluxes; (4) evaluate CO₂ and CH₄ concentration of soil depths in Pampa biome and Eucalyptus stand; (5) determinate eucalyptus C-CO₂ contribution for soil depths. A complete randomized block design with four replications was performed. Attempting to quantify CO₂ and CH₄ concentrations and the C isotopic ratio (¹³C/¹²C) in Eucalyptus stand, treatments consisted of 2 positions in the experimental plot (row and inter-row), 2 litter management [with (+S) or without (-S)], 2 C roots input [with (+R) or without (-R)] and an additional treatment (Pampa Biome). Attempting to compare CO₂ and CH₄ concentration, ¹³C/¹²C and CO₂ and CH₄ fluxes in Pampa Biome with Eucalyptus stand, a systematic design was performed. During 29 months of Eucalyptus plantation establishment, CO₂ emissions were higher in Pampa Biome than in afforested site. Similarly, CO₂ concentration in soil layers until 1 m depth was higher in Pampa than in Eucalyptus sp. Afforestation of Pampa did not alter the CH₄ emissions. The contribution of autotrophic respiration linearly with time and the lowest contribution was observed in February 2014. The experiment 2 aims to: (1) evaluate the rate of eucalypt harvest residues; (2) identify microbial groups responsible of litter decomposition; (3) evaluate effects of quality of eucalypt harvest residue to SOM fractions; (4) quantify the amount of residue-C incorporated on PLFA and SOM. A complete randomized block design with four replications was performed and treatments were arranged in a split-plot design. The main plot were 4 sampling times (0, 3, 6 and 12 months after the experiment establishment). The

subplot, treatments consisted of a factorial 3x2x2 with 3 litter composition (without residue, with residue and residue with bark maintenance), 2 placement of harvest residue (surface or incorporation) and 2 N levels (0 and 200 kg ha⁻¹). Residue incorporation increased residue decomposition rate and decreased soil C stabilization. Residues were left on soil surface had lower decomposition rate and to residues with bark the decomposition rate was 20 % lower. Gram negative bacteria and Fungi were the main microbial group responsible for decomposition rate. Maintenance of bark and N fertilization enhanced soil C stabilization and residue C incorporation on Gram negative and Fungi. Eucalyptus sp. establishment in Pampa Biome showed great potencial to mitigate GEE and enhance the soil C stabilization.

I – INTRODUÇÃO GERAL

Uma das grandes preocupações da sociedade diz respeito à mudança climática mundial, o papel dos gases de efeito estufa (GEE) neste fenômeno e o desenvolvimento de estratégias e metodologias que mitigam os seus efeitos.

A contribuição da agricultura para as emissões dos GEE tem sido discutida em vários estudos (Burney et al., 2010; Sanderman et al., 2004). Neste cenário, o gás carbônico (CO₂) foi relatado como o GEE mais emitido para a atmosfera (IPCC, 2001). 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). No que se refere às emissões de metano (CH₄), as práticas agrícolas correspondem a cerca de 50% do total das emissões antropogênicas. Estima-se que um aumento de 45 % nos níveis atuais de CO₂, poderá elevar em 3 °C a temperatura global média (IPCC, 2007).

Os solos podem se comportar como fonte ou dreno dos GEE. A maioria das pesquisas sobre solo e aquecimento global se detém à quantificação dos teores de C e a emissão de CO₂. No entanto, incrementos no estoque de C do solo e redução nas emissões de CO₂ podem ser contrabalanceados pelos efeitos negativos da emissão de outros GEE, como o CH₄ e N₂O (Silva & Mendonça, 2007). O potencial de aquecimento global desses gases, em relação ao CO₂, é, respectivamente, 23 e 296 vezes maiores (IPCC, 2001). Assim, a necessidade por informações, que dêem suporte às ações de mitigação do efeito estufa, conduzem a necessidade de maior compreensão a cerca das possíveis fontes e drenos desses GEE no setor agrícola.

Sistemas de cultivo conservacionistas que privilegiam o aporte de resíduos ao solo e reduzem o revolvimento do solo podem manter ou até aumentar os conteúdos de C e N do solo (Ruan e Robertson, 2013). Neste contexto, as plantações de eucalipto, pela elevada produção de biomassa vegetal em curto espaço de tempo e a maior deposição de C nas camadas mais profundas do solo possuem um grande potencial dentro do cenário de mitigação dos GEE.

No Brasil, o Bioma Pampa representa uma nova fronteira da produção florestal. Este bioma cobre parte do Estado do Rio Grande do Sul e é considerado como uma das áreas prioritárias para a conservação da fauna e flora (Ministério do Meio Ambiente, MMA 2007). Em relação à introdução de espécies exóticas nessas áreas e mais especificamente, a

introdução de espécies de eucalipto e todo o manejo da cultura, pouquíssimos estudos (Lupatini et al., 2013) avaliaram as alterações causadas na dinâmica da comunidade microbiana, revelando a carência de conhecimento quanto as possíveis tomadas de decisões frente às alterações na qualidade do solo.

Esta dissertação é composta por dois capítulos. No primeiro, foram quantificadas as emissões de CO₂ e CH₄ de um plantio de eucalipto e área do Bioma Pampa. As avaliações ocorreram logo no início do estabelecimento do povoamento florestal e acompanharam o crescimento da floresta, até 29 meses de idade. O segundo capítulo aborda os efeitos do manejo dos resíduos da colheita de eucalipto sobre a composição da comunidade microbiana e a estabilização do C nas frações da MOS.

2. Referências

- Burney JA, Davis SJ, Lobell DB. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:12052–12057.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate change 2001: The scientific basis*. United Kingdom: Cambridge University, 2001. 881p.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate change 2007: The physical science basis*. United Kingdom: Cambridge University, 2007. 996p
- Lupatini M, Jacques RJS, Antonioli ZI, Suleiman AKA, Fulthorpe RR, Roesch LFW. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29:223–33.
- Ministério do meio ambiente – MMA (2007) – Diversidade brasileira – Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade brasileira. MMA, SBF, Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>
- Ruan L, Robertson PG. Initial nitrous oxide, carbon dioxide, and methane costs of converting conservation reserve program grassland to row crops under no-till vs. conventional tillage. *Glob Chang Biol*. 2013;19:2478–2489.
- Sanderman J, Farquharson R, Baldock J. Soil Carbon Sequestration Potential: A review for Australian agriculture A report prepared for Department of Climate Change and Energy Efficiency.

II – CAPÍTULO 1

EMISSÕES DE CO₂ E CH₄ E O PARTICIONAMENTO DA RESPIRAÇÃO DO SOLO EM ÁREAS DE EUCALIPTO E VEGETAÇÃO NATURAL, NO BIOMA PAMPA

1. Introdução

O gás carbônico atmosférico (CO₂), a biota (principalmente vegetação), a matéria orgânica do solo (MOS) e os oceanos são os principais compartimentos ativos no ciclo do carbono (C) (IPCC 2000). Contabilizando a participação de cada compartimento, Janzen (2004) encontrou que uma concentração de CO₂ na atmosfera em torno de 380 ppm corresponde a cerca de 15 Mg C acima de cada hectare (ha) da superfície da terra. Por sua vez, em escala global, o estoque de C na biomassa vegetal aproxima-se de 400-600 Pg C, sendo as florestas responsáveis pela maior parte deste percentual (75 %) e o estoque de C nos solos são em média, até 1 metro de profundidade, 1500-2000 Pg C (Eswaran et al., 1993).

Como grande parte do C presente nos solos pode vir a ser mineralizado, um aumento na emissão de CO₂ do solo em resposta às mudanças ambientais exacerba a concentração do CO₂ atmosférico (Raich e Tufekcioglu, 2000), colocando os solos em uma posição estratégica frente às alterações climáticas. Adicionalmente, dado o potencial de absorção infravermelha do CH₄, cerca de trinta vezes maior que o de CO₂, e a contribuição da agricultura para a emissão deste gás, que corresponde em média a 50 % das emissões antropogênicas, os solos destacam-se novamente no cenário de mudanças climáticas (Carlsson-Kanyama e González, 2009).

A mudança do uso do solo dada pela conversão de florestas naturais para áreas de pastagem ou cultivo agrícola quase sempre tem levado a perdas nos estoques de carbono (C) do solo (Guo e Gifford, 2002; Houghton et al., 2012) e ao aumento na emissão dos GEE (Fearnside et al., 2009; Ruan e Robertson, 2013). Em uma análise global, Don et al. (2011) verificaram que a substituição de florestas tropicais para áreas de cultivo agrícola pode acarretar perdas de 25 % da MOS. Não obstante, poucos estudos avaliam o potencial de mitigação dos GEE quando áreas agrícolas ou degradadas são substituídas por florestas plantadas, especialmente em relação aos estoques de C e concentração de CO₂ nas camadas mais profundas do solo.

O reflorestamento de áreas degradadas ou intensamente manejadas aumenta o aporte de biomassa ao solo, favorecendo possíveis incrementos na matéria orgânica do solo (MOS)

(Jandl et al., 2007). Estima-se que em florestas plantadas de eucalipto, com 84 meses de idade, o estoque de C presente na biomassa área possa alcançar 100 Mg ha^{-1} , com o lenho representando mais de 50 % deste total (Gatto et al., 2010), e os estoques de C nas raízes correspondendo em média à 30 Mg ha^{-1} (Gatto et al., 2011). Contudo, o maior aporte de C ao solo não necessariamente resultará em mitigação dos GEE, uma vez que o potencial de estabilização do C nas frações mais estáveis da MOS, dependerá da interação entre fatores climáticos, edáficos e biológicos (Six et al., 2002; Lützow et al., 2006).

Post and Know (2000) reportam que a taxa média do sequestro de C no solo, em áreas florestais, é de aproximadamente $0,3 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Em florestas de eucalipto do Rio Grande do Sul, Soares et al. (2011) observaram além dos incrementos dos estoques de C do solo, alteração na qualidade da MOS. Quando comparada à vegetação anteriormente presente, pastagens naturais, as frações húmicas e fúlvicas da MOS sob plantios de eucalipto apresentavam uma maior proporção de compostos alifáticos, indicando uma preservação seletiva de compostos originários de plantas, como a suberina e cuitna. Em outro trabalho, a substituição de área de pastagem por um plantio florestal após 30 anos de cultivo, apesar de não alterar os estoques de C do solo, resultou em incrementos na relação C:N destes solos (Cunningham et al., 2012). Alterações na qualidade da MOS são um indicativo da conversão do C do solo para formas mais estáveis, o que ressalta o potencial de solos florestais servirem como drenos na emissão de GEE.

A determinação dos fluxos de CO_2 do solo é bom indicador do balanço de C em um ecossistema. Fatores como temperatura, conteúdo de água, disponibilidade de nutrientes e taxas fotossintéticas podem alterar as trocas de CO_2 ou CH_4 entre os solos e a atmosfera (Irvine et al., 2008; Ma e Lu, 2011; Neto et al., 2011). Assim interação entre processos biológicos de produção de CO_2 , respiração autotrófica (raízes e micorrizas) e heterotrófica (organismos decompositores) e a difusividade de CO_2 no perfil do solo determinam o fluxo de CO_2 no perfil do solo.

O particionamento do fluxo de CO_2 em respiração autotrófica (R_a), proveniente da respiração radicular e da rizosfera e respiração heterotrófica (R_h) é uma importante ferramenta para identificar se um ecossistema se tornará fonte ou dreno de C em consequência da mudança no uso do solo ou do manejo adotado (Millard et al., 2008). Adicionalmente, a quantificação da concentração de CO_2 ao longo do perfil do solo complementa o entendimento dos mecanismos de respiração do solo (Hashimoto et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as emissões de gases de efeito estufa, CO₂ e CH₄, em uma área de substituição do Bioma Pampa por plantio de Eucalipto; avaliar a dinâmica das emissões de CO₂ na floresta de eucalipto dada as diferentes entradas de C no solo e; determinar a contribuição da respiração autotrófica para os fluxos de CO₂.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da área de estudo e instalação do experimento.

O estudo foi conduzido em áreas localizadas no município de São Gabriel (30°26' S; 54°31' W), região da Depressão Central, Rio Grande do Sul, Brasil. Os solos nessas áreas são classificados como Cambissolos Húmicos e suas características são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características e químicas e físicas dos solos no início do experimento e três meses após estabelecimento do povoamento de eucalipto

Vegetação	Camada do solo cm	pH ⁽¹⁾	Densidade	Porosidade	COT ⁽²⁾	Areia ⁽³⁾	Silte ⁽³⁾	Argila ⁽³⁾
		H ₂ O	g cm ⁻³	(m ³ m ⁻³)	-----dag kg ⁻¹ -----			
Eucalipto	0-10	4,71	1,15	0,53	2,33	17	55	28
	10-20	4,82	1,32	0,46	1,58	23	45	32
	20-40	5,07	1,36	0,45	1,05	23	40	37
	40-60	5,11	1,22	0,51	0,98	17	38	45
	60-100	5,27	1,28	0,48	0,75	12	26	62
Pampa	0-10	4,82	1,22	0,53	2,03	15	61	24
	10-20	4,93	1,23	0,46	1,13	18	58	24
	20-40	5,35	1,35	0,49	0,67	20	53	27
	40-60	5,75	1,35	0,48	0,45	13	43	44
	60-100	6,46	1,34	0,48	0,30	8	57	35

⁽¹⁾pH determinado em H₂O (1:2,5) por potenciometria; ⁽²⁾COT= carbono orgânico total determinado por oxidação via-úmida (Walkley-Black, 1934); ⁽³⁾ Textura do solo determinado pelo método adaptado de Ruiz, 2005

O clima da região é do tipo subtropical úmido, segundo a classificação climática de Köppen, com precipitação abundante e bem distribuída ao longo do ano, com inverno mais úmido que o verão. Dados climáticos, pluviosidade e temperatura (Figura 1), foram obtidos em estação climatológica automatizada pertencente ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada numa área próxima ao experimento (30°34' S; 54°31' W).

Duas áreas com diferentes usos do solo foram selecionadas para o experimento. A primeira compreende uma área de plantios de *Eucalyptus dunnii*, com quatro meses de idade

na época da implantação da cultura (Figura 2). A área era utilizada, anteriormente, como campo nativo, para o pastejo de animais. No processo de implantação da floresta, a área deste experimento foi inicialmente sub-solada e gradeada para a construção dos camalhões nas linhas do plantio. Além disso, aplicou-se herbicida como medida para eliminar a mato-competição, favorecendo o crescimento inicial das mudas de eucalipto. O espaçamento dos plantios de eucalipto foi de 2,17 x 3,3 m e as linhas de plantio montadas em sistema de camalhões.

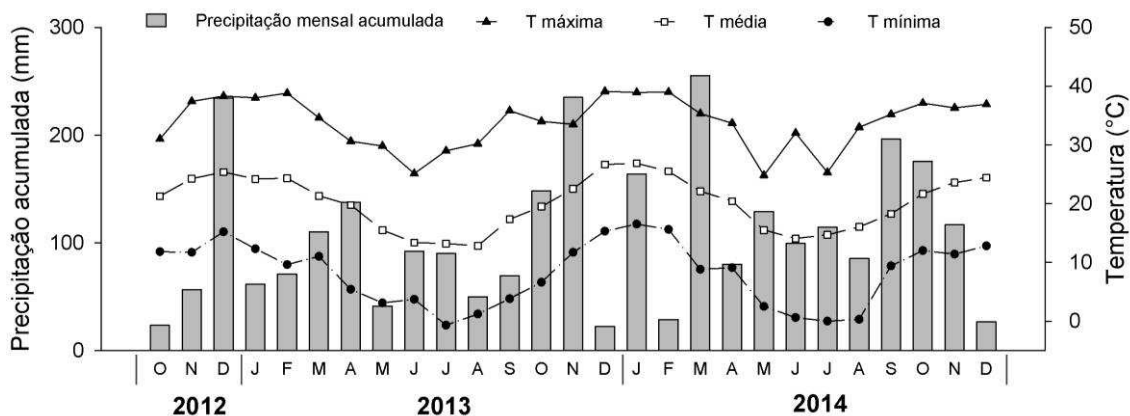


Figura 1. Precipitações mensais acumuladas e temperatura (T) máxima, média e mínima ao longo do período do experimento.

Outra área, sob vegetação do Pampa, adjacente ao plantio florestal foi selecionada (Figura 2). O Bioma Pampa caracteriza-se por apresentar 60 % de sua área coberta com gramíneas, como *Paspalumnotatum* e *Aristidapallens* (Overbeck et al., 2007). A partir do momento da instalação do experimento esta área foi mantida isolada, para evitar o pisoteio animal durante todo o período do experimento.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com 4 repetições. Para a avaliação dos fluxos superficiais de C-CO₂, C-CH₄ e do δ¹³CO₂, 7 tratamentos foram instalados, sendo 2 posições no talhão de eucalipto (linha ou entrelinha de plantio), 2 manejos da serapilheira, em área sob coleta ou sem coleta da serapilheira de eucalipto (Figura 3), 2 aportes de C radicular, com ou sem aporte, e 1 representado o tratamento controle, localizado na área do Pampa.

Para a avaliação da concentração de CO₂, CH₄ e δ¹³CO₂ ao longo do perfil do solo nas áreas que receberam a deposição da serapilheira, os tratamentos foram definidos por um

fatorial 2x2+1 distribuídos em parcelas sub-subdivididas em profundidade e no tempo. As parcelas principais consistiram de coletores de gases em profundidade (CGP) inseridos, na área do plantio de eucalipto, na linha (L) e entrelinha (EL) dos tratamentos com raiz (+R) e com exclusão de raízes (-R), todos com aporte da serapilheira (+S).

As subparcelas foram constituídas das camadas de solo 0-10, 10-20, 20-40, 40-60 e 60-100 cm. No total, foram instalados na área de eucalipto e Pampa, respectivamente, 16 e 4 câmaras de coleta de gases para a quantificação dos fluxos de gases. A mesma distribuição das CGP foi realizada para quantificar a concentração de CO₂ nas camadas do solo.



Figura 2. a) Área do plantio florestal no início do experimento (Novembro 2012), ou seja, após quatro meses do plantio das mudas. b) área do Pampa, foto tirada em Novembro 2012.

As câmaras de gases foram fabricadas em cloro-polivinil (PVC), com dimensões de 40 cm de altura e 50 cm de diâmetro (Figura 3b). Os CGPs também foram fabricados em PVC, tendo 6 cm de diâmetro interno e 1,10 m de comprimento (Fig 3a). Os CGPs foram divididos em camadas, como previamente descritos. Essas camadas foram separadas entre si por um isolamento confeccionado com tarugo de nylon (Poliamida 6). Em cada camada, furos laterais estavam presentes, os quais permitiam a troca gasosa entre o interior do tubo e a camada do solo. Os gases eram coletados por meio de um tubo de coleta em PVC flexível inserido, separadamente, por cada camada, o qual a conectava com a superfície do solo. O

CGP, a câmara de gases, o isolamento das raízes e o coletor de serapilheira são mostrados na Figura 3.

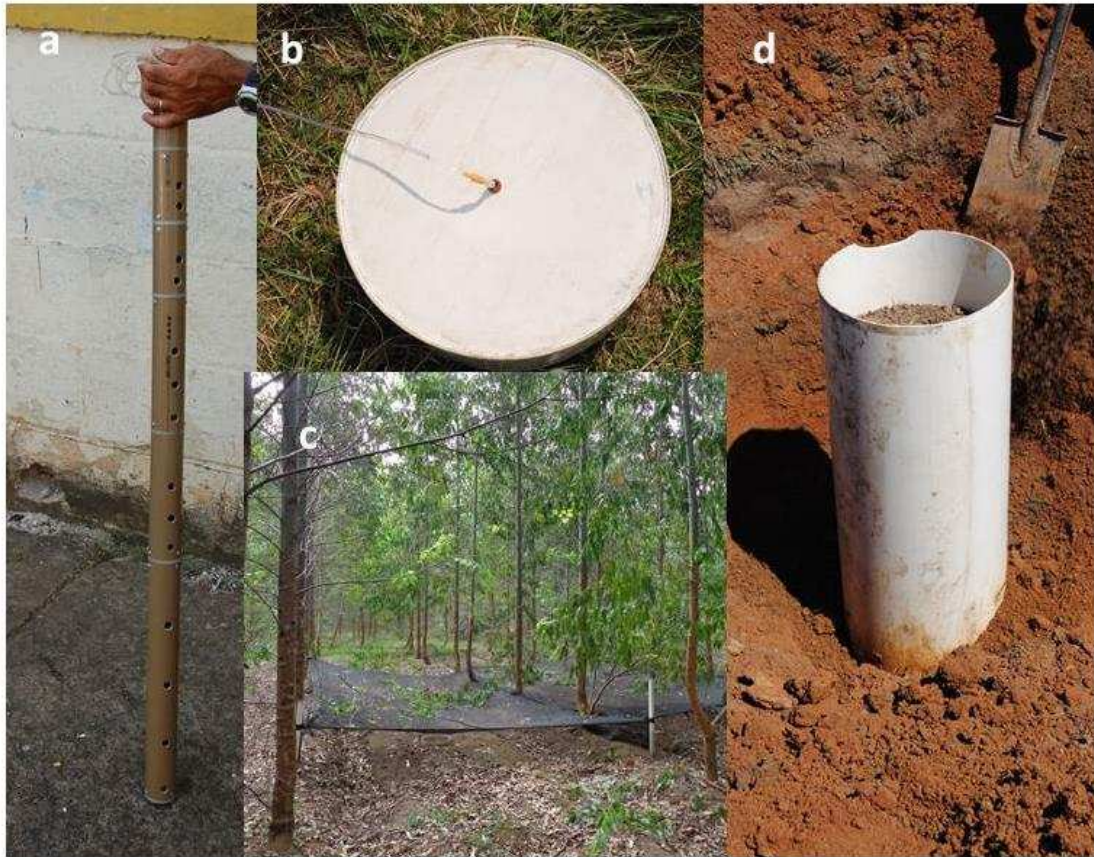


Figura 3. Detalhes do experimento: a) Tubo coletor de gases em profundidade; b) câmara de coleta gases de superfície, foto tirada com a câmara fechada no momento da coleta dos GEE; c) visualização da área sob coleta da serapilheira, d) tubos instalados para isolamento de raízes, com comprimento total de 1,30 m.

2.2 Medições do crescimento florestal

Para a determinação do crescimento florestal, o inventário florestal foi realizado pela da medição de 100 % do diâmetro a 1,3 m do terreno (DAP) e da altura (H) de todas as árvores localizadas na linha central do bloco e da altura de cerca de cinco árvores dominantes, excluindo aquelas localizadas na linha central. O inventário da área foi baseado no proposto por Assmann (1970). O inventário foi realizado em Agosto 2013, Fevereiro e Dezembro 2014.

2.3 Coleta dos gases

Foram realizadas coletas de gases, ao longo de dois anos e cinco meses do estabelecimento do plantio florestal. As amostragens nos dois estudos ocorreram em Novembro 2012, Fevereiro, Agosto e Dezembro do ano de 2013 e em Março, Julho e Dezembro 2014, o que corresponde a 4, 7, 13, 16, 19, 24 e 29 meses de idade do plantio.

As concentrações de CO₂, CH₄ e a razão isotópica do ¹³C (δ^{13}) foram mensuradas por espectroscopia num analisador de gases (Cavity Ring-Down Spectroscopy-CRDS Picarro). Na primeira e segunda coleta dos gases a leitura e quantificação foram realizadas diretamente em campo. A leitura do fluxo de CO₂, CH₄ e δ^{13} CO₂ foi feita durante 10 minutos após o fechamento da câmara. A leitura nas câmaras instaladas em profundidade teve duração de 2 minutos. O tempo de análise dos gases foi baseado no tamanho das câmaras e no tempo para estabilização da leitura da razão isotópica do C-CO₂ no CRDS.

A partir da terceira coleta foram utilizadas seringas para a coleta dos gases. Durante cada coleta, foram retiradas 4 amostras de ar (60 mL), sendo a primeira no momento em que a câmara era fechada e posteriormente aos 10, 20 e 40 minutos. Os tempos de amostragem dos gases foram determinados em estudos prévios realizados no laboratório, após análises estatísticas dos dados de modo a aumentar a praticidade da amostragem, sem reduzir a precisão dos resultados obtidos e o aumento do erro experimental.

Para a determinação da concentração de CO₂, a amostragem dos gases também foi realizada em seringas (60 mL) posteriormente à homogeneização do ar presente no interior da CGP e o interior de cada camada do solo. A concentração dos gases foi determinada a partir do volume de ar contido em cada seringa.

A leitura dos gases foi realizada no laboratório e quantificada no CRDS.

Durante todas as coletas, foram determinadas a temperatura e a umidade da camada superficial do solo por meio do sensor 5TM acoplado a um datalogger (Decagon Devices Inc., Pullman, WA). A umidade do solo de cada camada foi determinada após pesagem da amostra fresca e seca em estufa (105-100° C), até massa constante.

2.4 Cálculo de fluxos de gases e particionamento do CO₂

2.4.1 Fluxo de CO₂ e CH₄ e a δ^{13} CO₂

Os fluxos foram calculados pela equação:

$$fluxo_x = \frac{\left(\frac{\Delta Q}{\Delta t}\right) x M x P x V}{R x T x A} \quad (1)$$

em que $fluxo_x$ é o fluxo de C-CO₂ (mg H⁻¹ m²) ou C-CH₄ (μg H m²); $\Delta Q/\Delta t$: o coeficiente angular da reta ajustada (μg g⁻¹) por t (min); M: a massa molar do C (g mol⁻¹); P: pressão no interior da câmara, assumindo ser de 1 atmosfera (atm); V: volume da câmara (L); R: constante universal dos gases (0,08205 L atm K⁻¹ mol⁻¹); T: temperatura do solo (K); A: área basal da câmara (m²).

Em seguida, a variação da concentração de CO₂ e CH₄ no interior das câmaras foi obtida a partir do coeficiente angular da reta ajustada entre o fluxo de CO₂ ou CH₄ ao longo do tempo de amostragem.

O δ¹³C-CO₂ foi calculado como sugerido por Kayler et al.(2010), a partir do ajuste do modelo de regressão linear entre a concentração de CO₂, durante os intervalos amostrados, e o produto da concentração de CO₂ pelo δ¹³CO₂ determinado no CRDS. A inclinação da reta obtida é equivalente ao δ¹³C-CO₂ do fluxo do solo, o qual corrige a mistura com o CO₂ atmosférico (Miller & Tans, 2003).

2.4.2 Partição do CO₂ autotrófico e heterotrófico nas florestas de eucalipto

A partição da respiração do solo nos componentes autotróficos (Ra) e heterotrófica (Rh) foram calculadas usando o modelo:

$$R_{a=} \frac{\delta^{13}CO_{2+R+S} - \delta^{13}CO_{2-R+S}}{\delta^{13}CO_{2rr} - \delta^{13}CO_{2-R+S}} \quad (2)$$

onde, +R+S corresponde ao tratamento com aporte de C ao solo via raiz e serapilheira, -R+S corresponde ao tratamento com exclusão de raiz e único aporte de C via serapilheira e rr é δ¹³C médio da respiração radicular de eucalipto, o que corresponde ao δ¹³C da biomassa radicular.

A Rh foi calculada como a diferença entre 1 e a Ra.

2.4.3 Contribuição do C de eucalipto para a concentração de CO₂ nas camadas do solo

A contribuição do C de eucalipto (f) para a concentração de CO₂ foi calculada como:

$$f_{x=} \frac{\delta^{13}CO_{2e} - \delta^{13}CO_{2p}}{\delta^{13}CO_{2rr} - \delta^{13}CO_{2p}} \quad (3)$$

onde x é o período e camada amostrada, e é o $\delta^{13}\text{CO}_2$ na área de eucalipto, p é $\delta^{13}\text{CO}_2$ na área do pampa, rr é $\delta^{13}\text{C}$ médio da respiração radicular do eucalipto. O $\delta^{13}\text{CO}_2$ da área útil do plantio florestal corresponde a 65 % do $\delta^{13}\text{CO}_2$ quantificado na entrelinha e 35 % do $\delta^{13}\text{CO}_2$ da linha de plantio, ambos nos tratamentos sem exclusão de raiz. Esta abordagem fez-se necessária uma vez que a área da linha e entrelinha é diferente.

Para a área do Pampa, foram adotados os $\delta^{13}\text{CO}_2$ médios das camadas ao longo do tempo. Tal abordagem fez-se necessária uma vez que, em alguns períodos avaliadas, a concentração de CO_2 ultrapassou 35000 ppm, o que limita a linearidade dos valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ determinados no CRDS. Assim, o $\delta^{13}\text{CO}_2$ do Pampa adotado neste experimento foi obtido após incubação de amostras frescas de cada camada do solo em condições controladas.

2.5 Análises estatísticas

Os dados de fluxo de C-CO_2 , C-CH_4 e o $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ durante o período de avaliação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste F e Fisher, ao nível de significância de 5 %.

Os dados da concentração de CO_2 , CH_4 e o $\delta^{13}\text{CO}_2$ foram submetidos à ANOVA, pelo subprocedimento de medidas repetidas no tempo. Desta forma é possível detectar o efeito da causas de variação principal (Posição no talhão e profundidade), as interações entre elas, além do efeito do tempo dentro de cada uma das causas de variação principal. As médias da concentração de CO_2 , CH_4 e $\delta^{13}\text{CO}_2$ foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de teste F e de Fisher, a 5 % de probabilidade de erro. As concentrações de CO_2 no Pampa ao longo do perfil do solo excederam os limites de detecção calibrado do CRDS (20-35000 ppm) e, portanto, a margem de confiabilidade para a determinação do $\delta^{13}\text{CO}_2$. Por este motivo, os dados do $\delta^{13}\text{CO}_2$ das camadas do solo não foram estatisticamente analisados.

A comparação entre as emissões nas áreas do Pampa e Eucalipto foi realizada por meio da média ponderada dos valores quantificados na L e EL levando em consideração que nestas áreas a L e EL correspondiam, respectivamente, a 35 e 65 % da área útil total do talhão, e finalmente o valor calculado representava o valor médio da área de eucalipto. Os tratamentos na área de eucalipto utilizados para a comparação com área do Pampa, correspondem à amostradas coletadas na L e EL no tratamento +R+S. As médias foram comparadas pelo teste F a 5 % de probabilidade de erro, considerando o delineamento experimental sistemático.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). As médias observadas serão apresentadas com o seu respectivo erro padrão (média \pm erro padrão).

3. Resultados e Discussão

3.1 Crescimento florestal

Em agosto 2013, após 13 meses do plantio, as árvores tinham em média 4 cm de DAP e 4 m de H. Em Fevereiro 2014, seis meses após a primeira medição, DAP e H eram em médio o dobro do observado anteriormente. Por sua vez, em Dezembro 2014 a H média era 12 m e o DAP 11 cm. As taxas de incrementos observadas mostram que o crescimento da floresta se concentra, principalmente, nos meses mais quentes do ano, sendo este incremento muito pequeno nos períodos do Outono e Inverno.

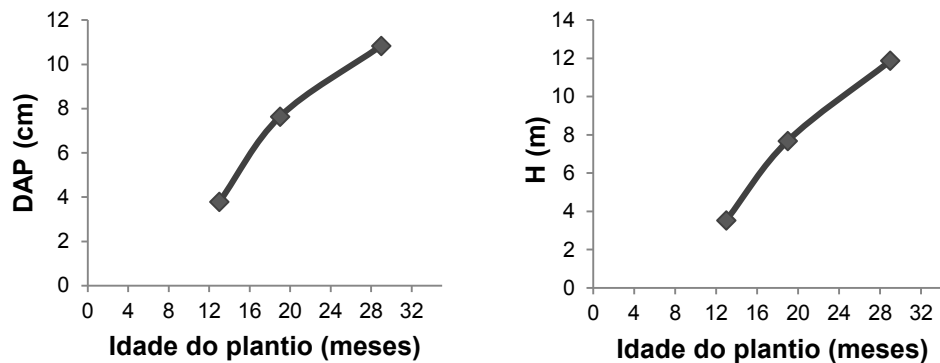


Figura 4. Diâmetro a 1,30 m (DAP) e altura (H) das árvores do plantio no primeiro, segundo e terceiro ano de implantação da floresta. Dados coletados em Julho 2012, Agosto 2013, Fevereiro e Dezembro 2014.

3.2 Variação temporal da umidade no perfil do solo

A umidade do solo variou entre os períodos avaliados. As coletas realizadas nas épocas mais frias do ano (Agosto 2013 e Julho 2014) apresentaram alta umidade ao longo do perfil para as duas áreas avaliadas (Figura 5). Em Fevereiro 2014, foi observado menor conteúdo de água no perfil do solo e o oposto observado nos meses mais frios avaliados (Figura 1).

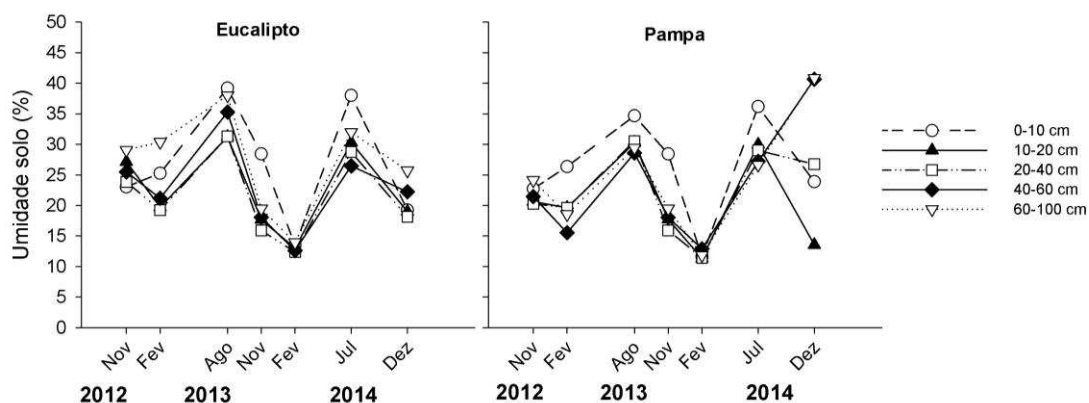


Figura 5. Umidade ao longo do perfil do solo em áreas do plantio de eucalipto, quantificada no período da coleta dos GEE.

3.3 Efluxos de C-CO₂, C-CH₄ e δ¹³C-CO₂ durante o experimento

3.3.1 Efluxos de C-CO₂ e C-CH₄ em áreas de eucalipto e Pampa

A mudança no uso do solo, expressivamente, alterou as emissões de CO₂ em todos os períodos avaliados, com as maiores emissões sendo observadas na área do Pampa, para a maioria dos meses avaliados ($P < 0,05$) (Figura 6). Ao longo do período do experimento, os fluxos de CO₂ variaram entre $397,9 \pm 9,1$ e $55,8 \pm 8,8$ mg C-CO₂ h⁻¹ m⁻² na área do Pampa e entre $230,9 \pm 10,6$ e $61,38 \pm 4,9$ mg C-CO₂ h⁻¹ m⁻² no plantio de eucalipto. As menores emissões foram observadas, em ambas as áreas, nos meses mais frios (Julho e Agosto) ($P < 0,05$). Se comparado ao período de crescimento da floresta (Figura 4), o período entre outono e inverno correspondeu aos menores incrementos no DAP e H das árvores do plantio.

Por outro lado, as emissões de CH₄ em ambas as áreas foram semelhantes (Figura 6) ($P > 0,05$), com dinâmica similar ao longo do experimento, ou seja, a substituição do Bioma Pampa por florestas de eucalipto não resultou na alteração dos fluxos de CH₄. Uma exceção foi observada em Novembro 2013, onde a emissão de CH₄ no Pampa foi significativamente maior do que na área de Eucalipto. De maneira geral, os solos se comportaram com um dreno de CH₄, ou seja, a absorção de CH₄ é maior do que sua emissão. Nos plantios de eucalipto, a absorção líquida de foi de $7,04 \pm 13,7$ à $62,7 \pm 1,02$ µg C-CH₄ h⁻¹ m⁻². No Pampa, houve uma emissão de $34,13$ µg C-CH₄ h⁻¹ m⁻² e uma absorção máxima de $58,5 \pm 1,77$ µg C-CH₄ h⁻¹ m⁻².

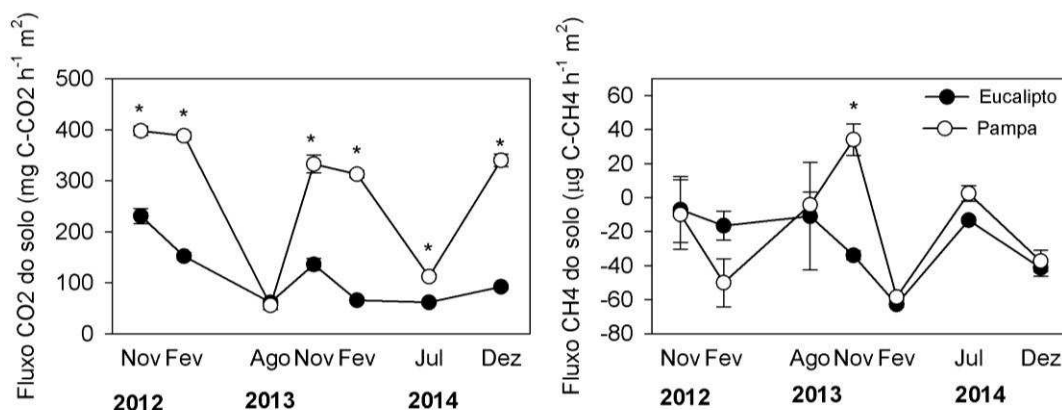


Figura 6. Fluxo de CO₂ e CH₄ em duas áreas sob diferentes usos do solo. * Indica diferença significativa entre as áreas em cada época avaliada, a 5 % pelo teste t.

Durante o período avaliado, as áreas sob diferentes usos do solo atuaram similarmente como um dreno de CH₄. A capacidade de um solo atuar como dreno ou fonte para o CH₄ depende das condições que governam as atividades metanogênicas e metanotróficas. Estudos apontam que a oxidação do CH₄ no solo pode ser afetada diretamente pelo clima, mudança no uso do solo, propriedades físicas do solo, como porosidade e conteúdo de água (Hornibrook et al., 2009), composição da comunidade microbiana (Reay et al., 2001) ou indiretamente pelo manejo do solo (Plaza-Bonilla et al., 2014). Embora, uma mudança do uso do solo possa afetar as propriedades físicas do solo (Ojima et al., 1993), características peculiares deste experimento podem favorecer a contínua e progressiva atividade metanotrófica. Primeiro, porque presente estudo consiste na primeira rotação da cultura e segundo Silva et al., (2007) reduções na qualidade física, relacionadas à compactação dos solos, em florestas de eucalypto, se pronunciam principalmente após a colheita. Segundo, a alta porosidade dos solos e sua baixa densidade (Tabela 1) bem como o contínuo aporte de resíduos ao solo, característicos deste experimento, são citados por Dutaur e Verchot (2007) como condições que garantem uma intensa atividade metanotrófica em uma ampla diversidade climática. Vale ressaltar que, uma análise microbiológica do perfil da comunidade de Archaea permitirá determinar se as baixas emissões de CH₄ neste experimento foram causadas pelo favorecimento do ambiente para a atividade metanotrófica ou é consequência de um ambiente desfavorável à atividade das metanogênicas.

A magnitude dos fluxos de CO₂ neste experimento, com fluxo máximo de 397 mg C-CO₂ h⁻¹ m⁻² no Pampa, é consideravelmente menor ao encontrado na literatura para uma área

de pastagem ($2,18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Zhou et al., 2007). Por sua vez, a magnitude do fluxo de CO_2 no eucalipto foi expressivamente menor ao estimado para florestas temperadas e tropicais, 900 e $1489 \text{ g C m}^{-2} \text{ ano}^{-1}$, respectivamente (Wei et al., 2010), porém, apenas levemente superior às emissões em áreas do Cerrado do Brasil, $770 \text{ g C m}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ (Jose et al., 2006). Tal fato se deve a variabilidade espacial quando se avalia emissões de GEE, com inúmeros fatores interagindo no processo de respiração do solo, bem como em função da metodologia adotada para a quantificação desses gases.

Com exceção do observado em Agosto 2013, os fluxos de C- CO_2 no Pampa foram significativamente maiores do que o observado no plantio florestal (Figura 6). De acordo com Vargas et al. (2010), a produção primária bruta é uma das principais variáveis que explicam as variações na respiração do solo. Da mesma forma, Raich & Tufekcioglu (2000) observaram que a respiração de solos sob pastagem pode ser até 20% maior ao encontrado em florestas temperadas, ou tropicais. Para os autores, a fisiologia das espécies, com pastagem alocando maior proporção dos fotoassimilados no sistema radicular, explica a superioridade das emissões nestas áreas.

3.3.2 Dinâmica do CO_2 nas áreas de eucalipto e os componentes da respiração do solo.

Na Figura 7 são apresentados os fluxos de CO_2 das áreas de eucalipto. De maneira geral, os fluxos na linha de plantio (L) tenderam a ser maior do que na entrelinha (EL) ($P < 0,10$), embora não houve diferença significativa entre EL_{+R+S} e os fluxos na L_{+R+S} e EL_{+R-S} ($P > 0,05$). Entre os tratamentos avaliados, o tratamento com exclusão de raiz (-R) apresentou o menor fluxo de CO_2 .

Laclau et al. (2001) avaliando a distribuição das raízes de eucalipto verificaram uma maior densidade de raízes finas nas proximidades da linha, principalmente nas camadas mais superficiais do solo. Uma vez que a maior parte da respiração radicular é proveniente de raízes finas, os maiores fluxos observados na L podem estar associados à maior biomassa radicular. Contudo, vale ressaltar que, embora os fluxos na L sejam significativamente maiores que na EL, a área da L e EL correspondem, respectivamente, à 35 e 65% da área útil do talhão. Assim, na extrapolação das emissões por área do talhão, as emissões da L são menores do que na EL.

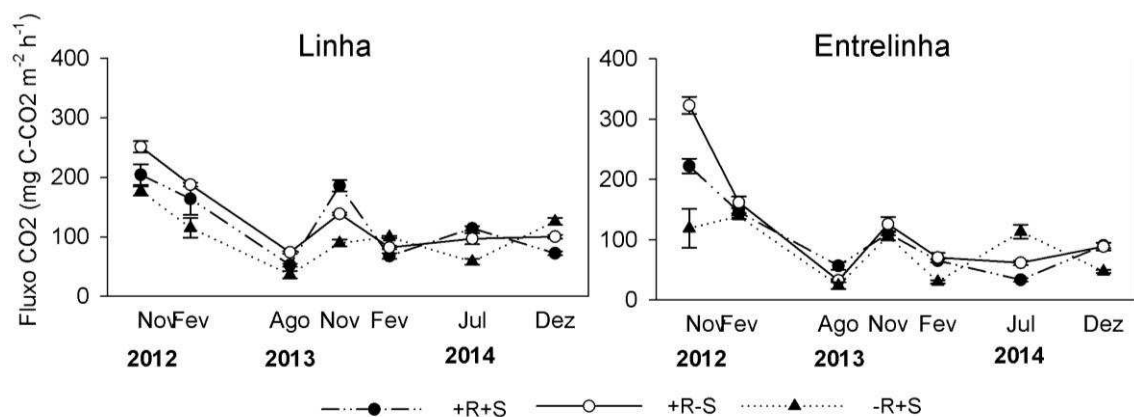


Figura 7. Fluxo total de CO₂ mensurado na linha (L) e (EL) do talhão de eucalipto, nos tratamentos com e sem exclusão de raiz, -R e +R, respectivamente, e nos tratamentos com e sem deposição da serapilheira, +S e -S, respectivamente, durante o período de avaliação do experimento.

Os fluxos de CO₂ do solo variaram ao longo do período de condução do experimento ($P < 0,05$) (Tabela 2, anexo). Alguns padrões puderam ser observados como, por exemplo, as menores emissões ocorrendo em Agosto 2013, Fevereiro e Julho 2014 e as maiores em Novembro 2012 e Fevereiro 2013 ($P < 0,05$). Em Novembro 2013, as emissões nos tratamentos +R+S foram superiores que no +R-S, tanto para amostradas coletadas na L como na EL. Por sua vez, o oposto foi observado em Dezembro 2014 ($P < 0,05$).

Esta variação era esperada porque entre os meses avaliados, Agosto 2013 e Julho 2014 apresentaram a menor temperatura média anual. A temperatura mínima observada nestes meses foi de 1,2 e 0 °C, respectivamente. Avaliando o risco de ocorrência de geadas, Brixner et al. (2014), com base em dados climáticos dos últimos 40 anos, observaram que no mês de Julho o risco de geada para o município de São Gabriel gira em torno de 25% e pode chegar a 15% no mês de Agosto. Em relação às alterações dos aspectos fisiológicos, que as baixas temperaturas e as geadas podem causar, neste experimento foi observado um baixo incremento médio da biomassa florestal entre os meses mais frios do ano (Figura 4). Além disso, em outro estudo ciclos de congelamento e descongelamento do solo foram associados à perda da biomassa microbiana, diminuição da respiração basal e alterações na composição microbiana do solo (Schimel et al., 2007). Ao mesmo tempo, o solo nos meses de Julho e Agosto foram aqueles que apresentaram o maior conteúdo de água ao longo do perfil do solo (Figura 5). Portanto, uma vez que o fluxo de CO₂ do solo consiste da interação entre a

produção de CO₂ no perfil do solo e o processo de transporte desse gás até a superfície do solo, um maior conteúdo de água no solo pode diminuir a difusividade do CO₂, resultando em menor respiração do solo.

Com exceção dos valores observados no início do experimento para amostras coletadas na L, os valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ foram significativamente maiores nos tratamentos com exclusão de raiz do que sem exclusão de raiz ($P < 0,05$) (Tabela 2, anexo). Portanto, foi possível separar a contribuição autotrófica e heterotrófica para a respiração do solo (Figura 8).

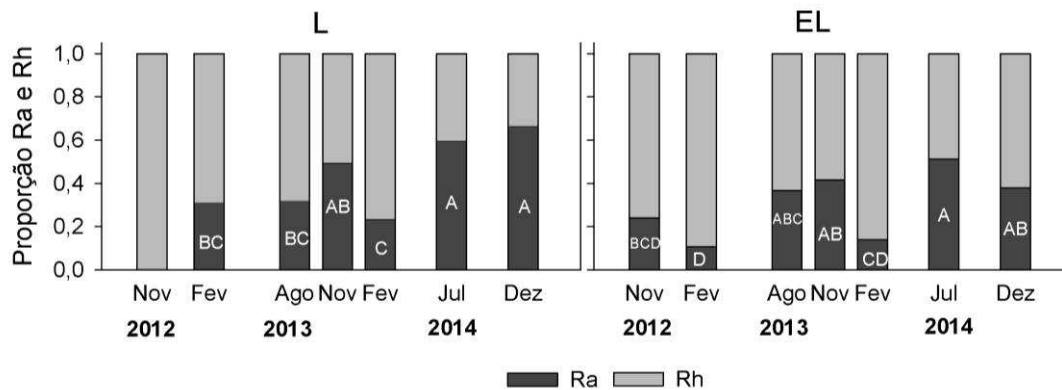


Figura 8. Particionamento do fluxo superficial de CO₂ do solo nos componentes autotrófico (Ra) e heterotrófico (Rh) na linha (L) e entrelinha de plantio (EL). Médias da Ra seguidas por mesma letra dentro de cada posição no talhão, não diferem entre si a 5% pelo teste t.

De maneira geral, não houve diferença na contribuição da Ra e Rh para a respiração do solo da L e EL do plantio ($P > 0,05$). Em média, para ambas as posições de amostragem dentro do talhão, a proporção da Ra e Rh era de 0,34 e 0,66, respectivamente. A contribuição da Ra observada neste experimento foi superior a encontrada, por Sulzman et al. (2005), em florestas adultas de coníferas no norte dos Estados Unidos. As diferenças observadas podem ser função da maior taxa de crescimento da floresta de eucalipto se comparada a outras florestas do clima temperado.

Embora a dinâmica entre Ra e Rh seja mantida entre as duas posições de amostragem no talhão, o maior fluxo de CO₂ observado na L (Tabela 2, anexo) indica que a intensidade da Ra e Rh é diferente entre as posições. Esta pode estar associada a uma maior densidade de raiz, a qual em função de uma maior exsudação radicular pode estimular a atividade de decomposição da comunidade microbiana. De fato, a decomposição microbiana da MOS como consequência do aporte recente de C orgânico via exsudado radicular ou resíduos frescos de plantas, conhecido como priming positivo, tem sido relatado em diversos estudos

(Fontaine et al., 2003a, 2003b; Kuzyakov, 2010). De acordo com Kuzyakov (2010), se considerarmos que a volume ocupado pela rizosfera corresponde a menos de 10% do volume do solo, o efeito priming nesta região pode ser até 10 vezes maior do que ocorre em todo solo.

Ao longo do tempo, diferenças nas contribuições da Ra para a respiração do solo foram observadas. Para a L, a Ra aumentou durante o período do experimento, sendo observada a menor contribuição no início do experimento e a maior em Julho e Dezembro 2014 ($0,63 \pm 0,09$). Na EL, o mesmo padrão foi observado, e nos meses de Julho e Dezembro a contribuição da Ra era em média $0,44 \pm 0,08$. Embora as contribuições sejam crescentes ao longo do tempo, em Fevereiro 2013, a Ra foi em média igual ao observado no início do experimento.

A análise da influência dos fatores climáticos sobre a Ra e Rh tem mostrado que para o intervalo de -5 a 27°C os compartimentos da respiração do solo são linear e positivamente correlacionados com a temperatura média anual, ao passo que, apenas a Rh responde linearmente às variações na precipitação média acumulada (Wei et al., 2010). Em outros estudos, o incremento na temperatura do solo aumenta a importância do conteúdo de água sobre a respiração do solo (Borken et al., 2006), em outras palavras o menor conteúdo água em temperaturas mais altas, altera intensamente a respiração do solo. Por exemplo, uma diferença de 10% na umidade do solo, pode reduzir em até 30% a Rh (Suseela et al., 2012). Contudo no nosso experimento, a menor umidade do solo e alta temperatura média em Fevereiro 2014 reduziram especialmente a Ra. Sob situações de estresse hídrico algumas espécies de eucalipto apresentam redução na biomassa total, redução do comprimento radicular (Shvaleva et al., 2005), alterações no comportamento estomático (Héroult et al., 2013), o que podem acarretar na diminuição da Ra.

3.4 Concentração de CO_2 , CH_4 e $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ em profundidade.

3.4.1 Concentrações de CO_2 e CH_4 em áreas de Pampa e Eucalipto e a contribuição do C de eucalipto para o CO_2 por camadas do solo

As concentrações médias de CO_2 das camadas do solo (Figura 9), na área do Pampa foram superiores às encontradas em áreas de eucalipto, em todos os períodos avaliados ($P < 0,01$).

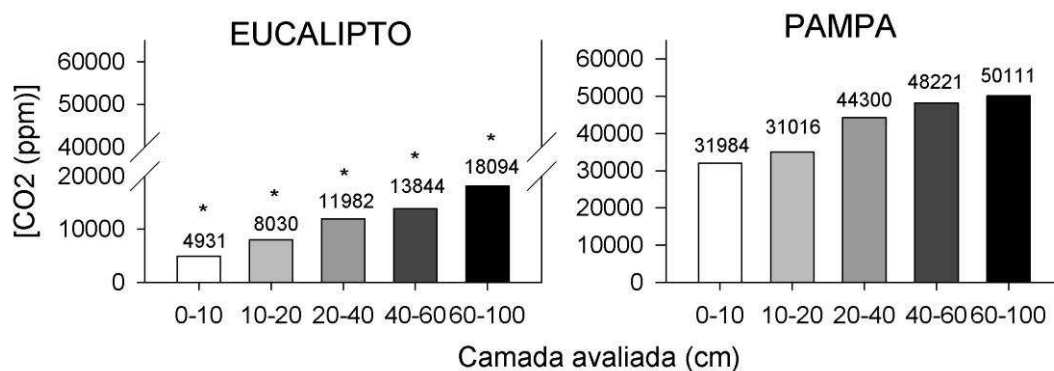


Figura 9. Média da concentração de CO₂ em diferentes camadas e uso do solo. Dento da mesma camada média seguida por * diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste F.

A introdução do plantio de eucalipto em uma área requer um conjunto de práticas silviculturais que favoreçam o crescimento inicial das plantas em campo e reduzam a mato-competição. Em contrapartida à adoção destas práticas, reduz-se a cobertura vegetal do solo, cujas diferenças foram visualmente notadas entre a área do Pampa e de Eucalipto, mesmo após 4 meses do plantio das mudas (Figura 1). A diminuição da cobertura vegetal está associada à perda na biomassa radicular, o que pode explicar a menor concentração de CO₂ nas camadas de solo das áreas de eucalipto, em um primeiro momento. De acordo com Kuzyakov (2006), outros fatores além da densidade de raiz estão associados com a concentração de CO₂ do solo, podendo citar a atividade e composição da comunidade microbiana, quantidade e qualidade da C disponível e a atividade fotossintética.

Ao longo do crescimento/desenvolvimento da floresta deste experimento, outras diferenças também foram observadas. Por se tratar de uma floresta no início do cultivo, a entrada de C no solo via serapilheira, medida a partir do 2º ano de crescimento da floresta, era em média 3,3 Mg ha⁻¹ e 4,1 Mg ha⁻¹. Segundo, Fidelis et al. (2009), em áreas do Bioma Pampa, onde não faz-se uso de queimadas, a biomassa aérea pode chegar a 9,6 t ha⁻¹ e biomassa radicular é estimada sendo tão alta quanto a biomassa aérea.

Em relação à atividade dos microorganismos do solo, a comunidade microbiana mostra alta capacidade de se adaptar a novas condições impostas ao solo, tornando-se altamente especializada em degradar o C que estiver disponível (Dungait et al., 2012; Freschet et al., 2012). Se associada à entrada de C de eucalipto no solo, ao longo do tempo, via crescimento, ciclagem e deposição radicular esperava-se um aumento progressivo na

contribuição do C de plantas C₃, originada de eucalipto, para a concentração de CO₂ das camadas do solo.

Neste cenário, foi observado neste experimento que a contribuição do C de eucalipto para o CO₂ do solo aumentou em todas as camadas do solo durante o período de avaliação do experimento (Figura 10). Entretanto, em Fevereiro 2014, houve uma forte queda desta contribuição.

Contrastantes contribuições do C de eucalipto para a concentração de CO₂ do solo foram observadas no ano de 2014. Em Fevereiro, uma menor contribuição se opôs ao observado no mês de Julho. Em relação às características climáticas, Fevereiro apresentou T média em torno de 25 °C e precipitação acumulada de 28,6 mm e umidade média das camadas do solo em torno de 10%. Por sua vez, em Julho foram observadas T média de 14,6 °C e precipitação acumulada de 114,6 mm e umidade em torno de 30%. Em situações onde ocorre um déficit de suprimento de água às raízes das plantas, é observado o fechamento estomático, como tentativa de diminuir a transpiração, acarretando também na redução da capacidade de crescimento das plantas (Pallardy, 1997). A redução no crescimento pode estar associada à diminuição na taxa de respiração. Corroborando com esta observação, em florestas de Pinus a sazonalidade da respiração do solo observada foi governada pelo conteúdo de água do solo e às conseqüentes flutuações da contribuição da respiração radicular entre épocas mais secas e úmidas (Carbone et al., 2011).

Por sua vez, a distribuição da concentração de CH₄ no perfil do solo, foi similar entre as duas áreas, apenas nas camadas mais superficiais (Figura 11). Nas camadas 40-60 e 60-100 cm, as concentrações de CH₄ eram superiores aquelas observadas no Pampa (Figura 11). De acordo com Ojima et al. (1993) entre os mecanismos que diminuem a oxidação do CH₄ no solo, pode-se citar a disponibilidade de H₂O, mudanças na estrutura do solo e manejo da cultura. Neste experimento, o maior teor de argila da camada de 60-100 cm na área do eucalipto pode restringir a infiltração de água no perfil do solo, o que aumentaria a sua disponibilidade nas camadas mais profundas e como consequência reduziria a oxidação do CH₄.

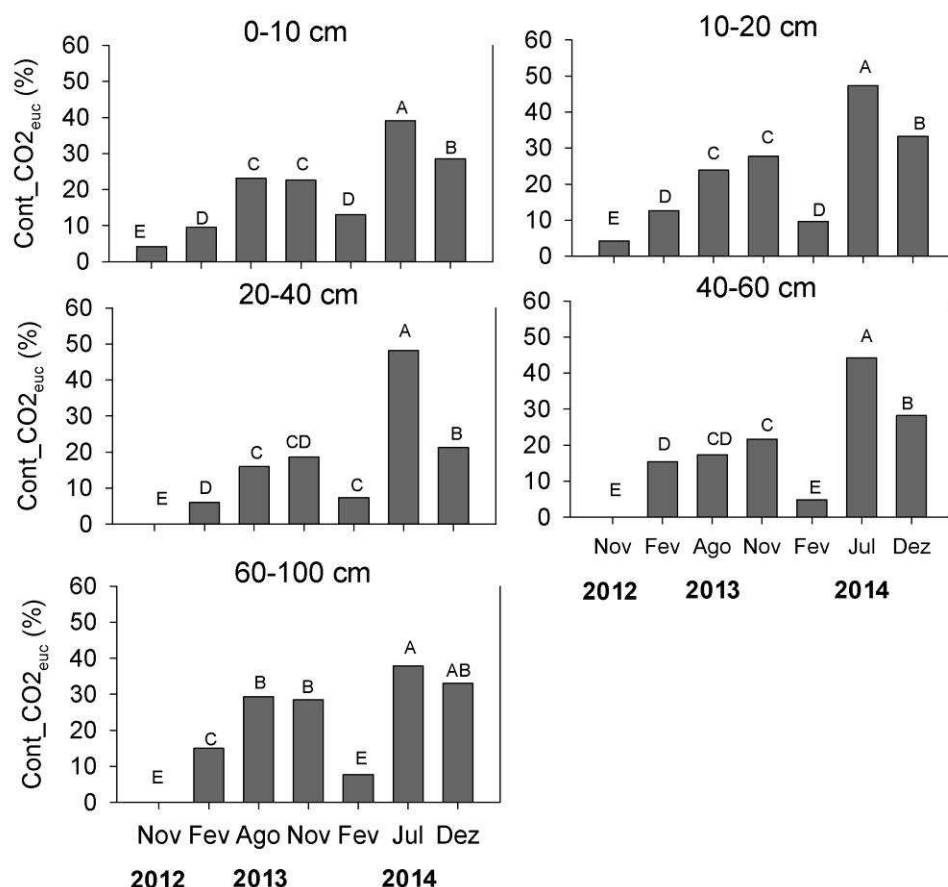


Figura 10. Contribuição média do C de eucalipto (Cont_CO2_{euc}) para o CO₂ total das camadas 0-10, 10-20, 20-40, 40-60 e 60-100 cm. Médias seguidas por mesma letra dentro de cada camada não diferem entre si a 5% pelo teste t (LSD) (P>0,05).

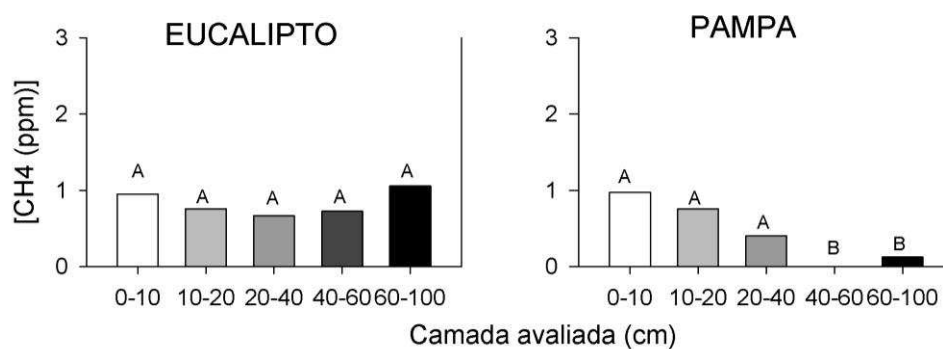


Figura 11. Concentração de CH₄ em diferentes camadas e uso do solo. Médias seguidas por letras maiúsculas dentro da mesma camada não diferem entre si a 5% pelo teste t.

3.4.2 Concentrações de CO₂ nas áreas de eucalipto

A concentração de CO₂ nas camadas de solo amostradas em diferentes posições do talhão diferiu ao longo das coletas realizadas (Figura 12). A concentração de CO₂ variou de 1282 ± 236 ppm à 18938 ± 2863 ppm entre as camadas localizadas na L_{+R}; de 1748 ± 343 ppm à 28970 ± 3580 ppm na EL_{+R}; 2415 ± 626 ppm. Nos tratamentos -R, foram observados 3238 ± 1069 ppm à 33342 ± 7525 ppm para a L e de 2527 ± 130 ppm à 18924 ± 5226 ppm na EL. Nas coletas de Julho 2014 não foi possível quantificar a concentração de CO₂ da camada 60-100 cm amostras na L_{-R}, uma vez que os tubos nestas camadas estavam saturados com água. Na EL_{-R}, o mesmo foi observado e as coletas da camada mais profunda só foram realizadas em Novembro 2012, Novembro 2013 e Julho 2014. A sazonalidade da concentração de CO₂ em diferentes posições do talhão avaliadas mostrou que as menores concentrações foram observadas em Agosto 2013, Fevereiro e Dezembro 2014, meses no qual a precipitação média acumulada não ultrapassou 50 mm. Em outro estudo de avaliação da concentração de CO₂ em florestas, no norte da Tailândia, a respiração do solo era relativamente maior na estação chuvosa do que na estação seca (< 100 mm) (Hashimoto et al., 2004).

Houve interação ($p < 0,001$) entre o período e a posição de amostragem no talhão sobre a concentração de CO₂ (Figura 13), bem como entre a camada avaliada e a posição no talhão (Figura 14).

No início do experimento, a concentração média de CO₂ das camadas avaliadas, até a profundidade de 1m, era maior na L (15.713 ± 524 ppm) do que na EL (11.903 ± 742 ppm), nos tratamentos +R (Figura 14). Essas diferenças observadas foram ocasionadas pela maior concentração de CO₂ da camada 0-10 e 10-20cm na L_{+R} do que na EL_{+R} ($P < 0,01$), uma vez que para as outras camadas as concentrações não foram diferentes. É provável que adoção do sistema de camalhão para formação da linha do plantio, o qual envolve o revolvimento do solo, em associação à adubação de implantação da floresta tenha favorecido a maior concentração de CO₂ na L do que na EL de plantio, no início do experimento. Outros trabalhos também constatarem efeitos positivo da fertilização sobre os fluxos de CO₂ (Jäger et al., 2011; Oliveira, 2013).

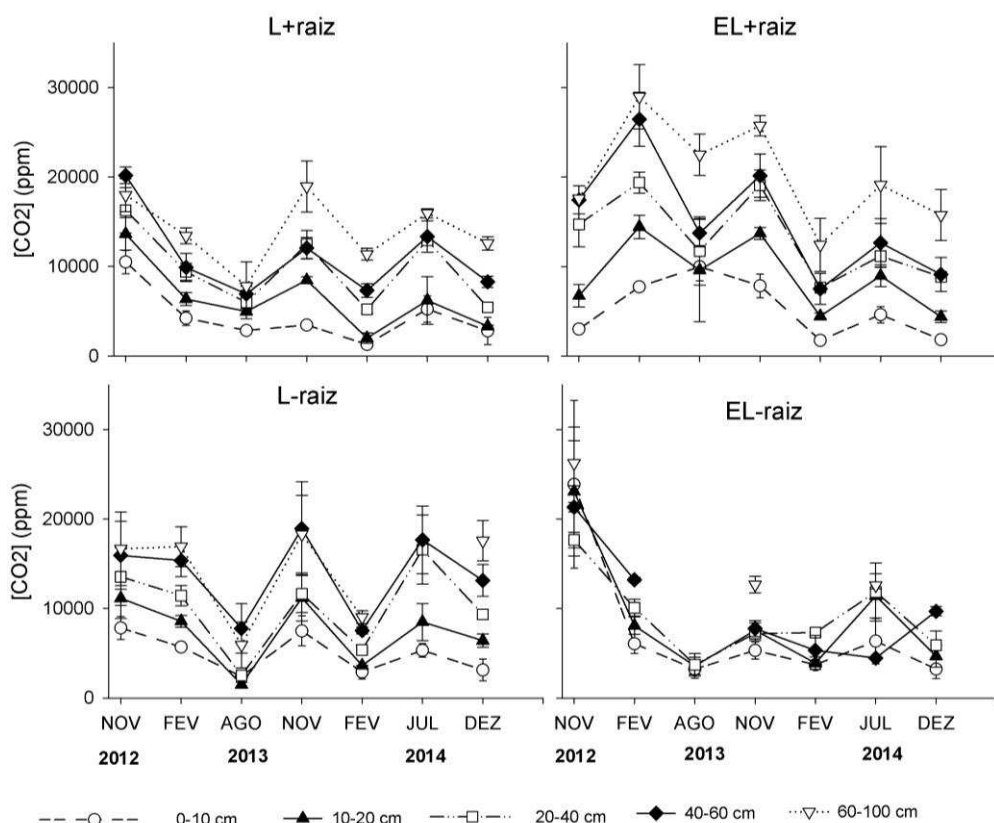


Figura 12. Concentração de CO₂ (média ± erro padrão, N=4), durante dois anos e cinco meses do crescimento do eucalipto, nas camadas do solo 0-10, 10-20, 20-40 e 40-60 e 60-100 cm da linha (L+raiz), entrelinha (EL+raiz), linha com exclusão de raiz (L-raiz) e na entrelinha com exclusão de raiz (EL-raiz).

Entre Fevereiro de 2013 e 2014, as emissões da EL_{+R} foram superiores à L_{+R} (P<0,05) (Figura 13). Entretanto, a partir de Julho 2014, não foram observadas diferenças nas concentrações de CO₂ nas camadas de solo localizadas na L e EL do plantio, no tratamento com +R. As maiores concentrações de CO₂ na L_{+R}, a partir de Julho 2014, podem ser explicadas em função do crescimento e desenvolvimento da floresta. Ao longo do tempo, o desenvolvimento da biomassa aérea (Figura 4) também é acompanhado do crescimento radicular. Adicionalmente ao crescimento radicular, o suprimento de C via exsudação radicular, garante o desenvolvimento de microorganismos no ambiente rizosférico. Ruehr & Buchmann (2009), ao particionar a respiração autotrófica do solo sob florestas temperadas, verificaram que a contribuição da respiração proveniente da rizosfera para a respiração do solo era similar àquela originada de raízes finas.

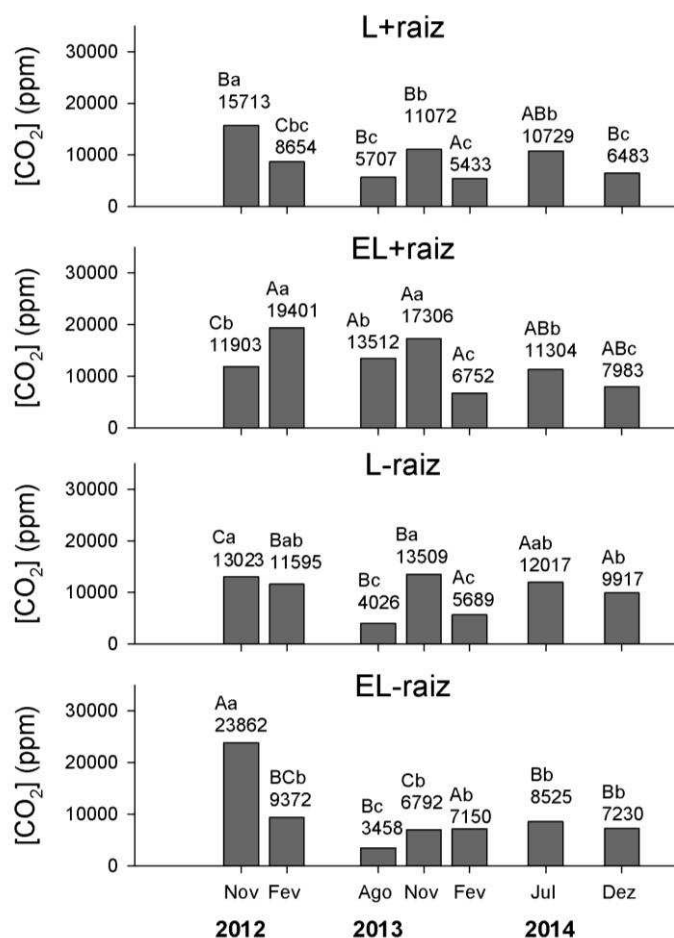


Figura 13. Concentração CO₂ ([CO₂]) nas camadas avaliadas em diferentes localizações do talhão, isto é linha (L+raiz), entrelinha (EL+raiz), linha com exclusão de raiz (L-raiz), entrelinha com exclusão de raiz (EL-raiz). Médias seguidas de mesma letra maiúscula em cada período de avaliação e minúscula dentro de cada localização do talhão, não diferem a 5% pelo teste t (LSD).

Em relação às outras posições do talhão amostradas, de maneira geral, as concentrações de CO₂ na L-R foram maiores que L+R, nas coletas realizadas em Fevereiro 2013 e Julho e Dezembro 2014, não sendo observada diferenças nos outros períodos avaliados (P>0,05). Para medições realizadas no ano de 2013, a média da concentração de CO₂ nas camadas do solo foi significativamente superior na EL+R do que na EL-R, não havendo diferenças entre os outros períodos (P>0,05). As observações encontradas se opõem a hipótese de que nos tratamentos com exclusão de raízes, a concentração de CO₂ seria menor do que nos tratamentos sem isolamento. Este resultado pode ter sido causado por um artefato do experimento, onde os tubos de exclusão de raiz favorecem o permanência de uma maior

umidade ao longo do perfil do solo. Tal fato foi observado em outros estudos com exclusão de raiz (Irvine et al., 2008; Ruehr e Buchmann, 2009), o que poderia ter favorecido a atividade microbiana, especialmente em épocas mais secas.

A concentração de CO₂ na EL_{+R} foi significativamente maior do que na L_{+R}, com exceção da camada 0-10 cm (Figura 14). A concentração de CO₂, ao longo do perfil do solo na L_{+R}, foi similar à encontrada na L_{-R}, exceto na camada 40-60 cm onde a concentração na L_{-R} era torno 25% superior ao encontrado na L (11140 ± 910). Por sua vez, a concentração de CO₂ nas camadas 20-40 e 40-60 cm da EL_{+R} foram maiores que na EL_{-R}.

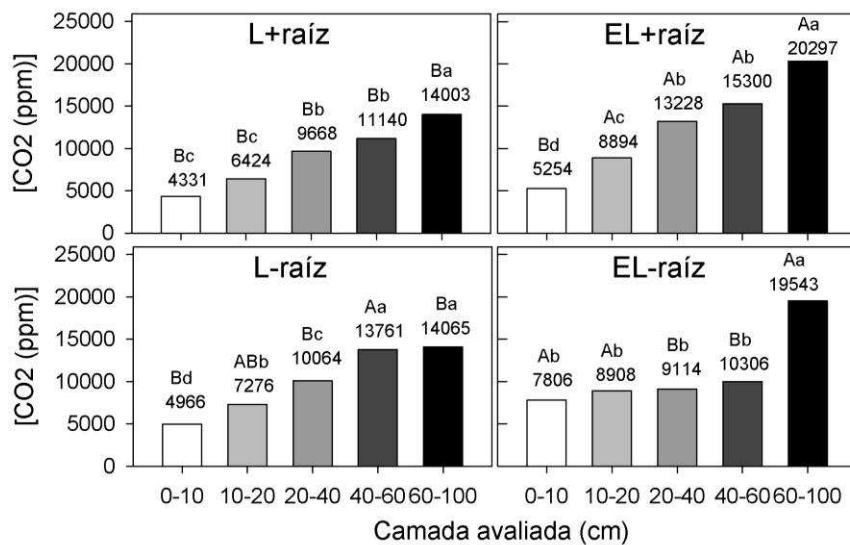


Figura 14. Concentração média de CO₂ ([CO₂]) no perfil do solo em diferentes localizações do talhão, sendo L = linha de plantio, EL= entrelinha de plantio, L IR= Linha isolada de raiz e EL IR= entrelinha isolada de raiz. Médias seguidas de mesma letra maiúscula dentro cada camada e minúscula dentro de cada localização do talhão não diferem a 5% pelo teste t (LSD).

De maneira geral, a concentração de CO₂ aumentou ao longo do perfil do solo, com exceção do que foi observado na EL_{-R} (Figura 14). As variações na concentração de CO₂ ao longo do perfil do solo são governadas pela interação entre os processos que controlam a produção de CO₂, tanto originado da respiração autotrófica como heterotrófica (Flechard et al., 2007), assim como pelos fatores que afetam a difusão do CO₂ no solo, entre eles a porosidade, tortuosidade do solo, umidade, textura e densidade do solo (Goutal et al., 2012). Como consequência do mais lento transporte de CO₂ das camadas mais profundas para a superfície do solo, um gradiente de concentração é formado ao longo do perfil do solo, sendo

as concentrações nas camadas mais profundas sempre maiores que nas camadas superficiais. Neste experimento, a espessura da última camada avaliada corresponde a quatro vezes a espessura da camada superficial, o que possivelmente aumentou a diferença no gradiente de concentração observada.

3.4.3 Razão Isotópica do C-CO₂ ao longo do perfil do solo

A Figura 15 mostra a dinâmica da composição isotópica de CO₂ ao longo da duração do experimento (Figura 1). Em alguns períodos amostrados, principalmente na camada 60-100 cm da EL-R+S não foi possível realizar a coleta de gases para a determinação do $\delta^{13}\text{CO}_2$, uma vez que os tubos de gases estavam saturados por água.

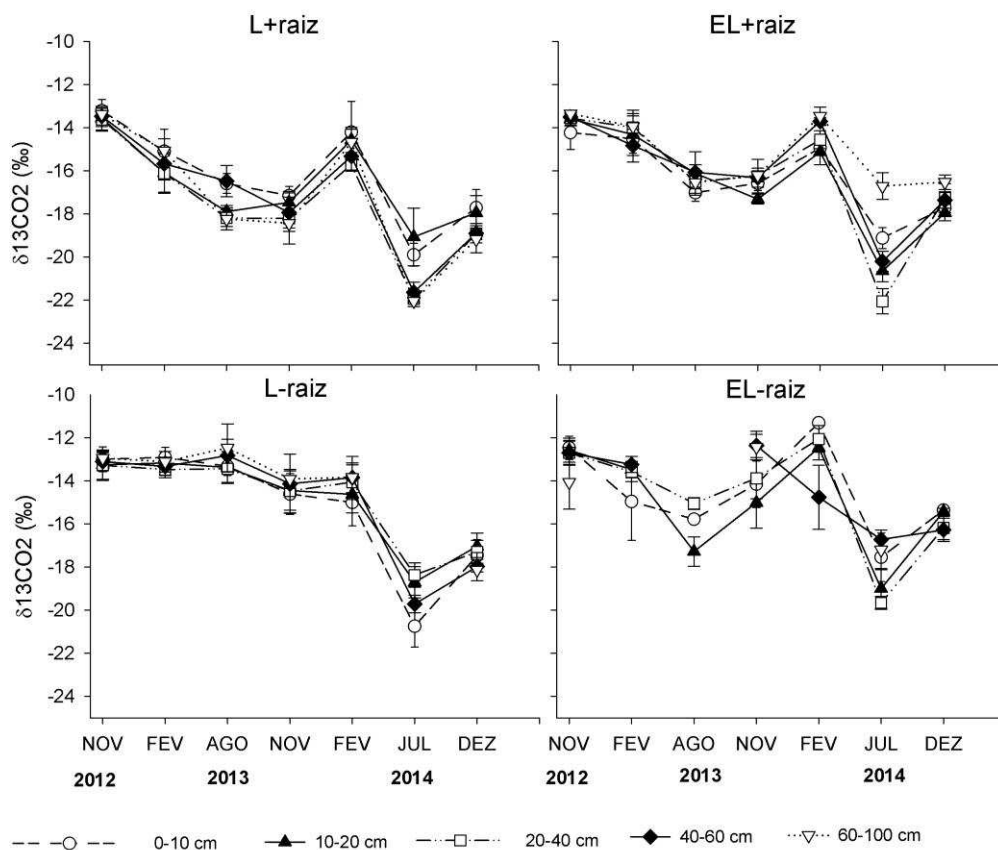


Figura 15. Razão isotópica do CO₂ ($\delta^{13}\text{CO}_2$) (média \pm erro padrão, N=4), durante dois anos e cinco meses do crescimento do eucalipto, nas camadas de solo 0-10, 10-20, 20-40 e 40-60 e 60-100 cm da linha (L+raiz), entrelinha (EL+raiz), linha com exclusão de raiz (L-raiz) e na entrelinha com exclusão de raiz (EL-raiz).

Ao longo do tempo, o $\delta^{13}\text{CO}_2$ tornou-se menos enriquecido em ^{13}C , ou seja, com valor de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativo, para todas as posições e camadas amostradas, com exceção da camada 60-100 cm na EL_{+R} (Tabela 3, anexo). Para esta camada, não houve diferenças significativas no $\delta^{13}\text{CO}_2$ ao longo do tempo. Em Julho 2014, foram observados os valores mais negativos de $\delta^{13}\text{CO}_2$ para todas as camadas nas diferentes posições do talhão amostrado. Por sua vez, em Fevereiro os valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ tenderam a ser menos negativo, chegando a atingir os valores observados no início do experimento.

A diminuição dos valores do $\delta^{13}\text{CO}_2$ observada ao longo do tempo pode ser explicada pelo aumento da biomassa radicular do eucalipto e conseqüente incremento na contribuição da respiração radicular para o CO_2 total do solo. Similar padrão foi observado por outros autores (Rochette et al., 1999; Pausch and Kuzyakov, 2012), onde em áreas de substituição de plantas C_3 para C_4 os valores do $\delta^{13}\text{CO}_2$ do solo, até 70 cm de profundidade eram em média -16 ‰ durante a estação de crescimento, o que representava uma variação de 7 ‰ em relação ao observado no início do experimento.

Uma vez que os valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ do solo se relacionam com a respiração radicular, fatores que afetem a fisiologia das plantas de eucalipto, podem alterar os valores do $\delta^{13}\text{CO}_2$ observado. Altas temperaturas e baixos conteúdos de água nos tecidos da planta podem conduzir a uma diminuição na taxa fotossintética, na produção de novas raízes e na respiração associada ao crescimento das plantas (Pallardy 1997 b). Especialmente, em espécies de eucalipto, inúmeras estratégias podem ser adotadas para superar as baixas umidades do solo, entre elas alteração no acúmulo e alocação de matéria seca (Muell et al., 2003; Duursma et al., 2011), entre outras. Assim, os valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ menos negativo em Fevereiro 2014 podem estar relacionado a estratégia adaptativa das plantas de eucalipto, frente à baixa umidade do solo (Figura 5), diminuindo a taxa de respiração e a sua contribuição para o CO_2 total das camadas do solo (Figura 16).

Ao longo do tempo, pequenas diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ entre as camadas de solo foram observadas ao longo do tempo (Tabela 3, anexo). Por outro lado, os valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ entre as posições do talhão amostradas tenderam a ser diferentes a partir das coletas realizadas em Agosto 2014 ($P < 0,10$). De maneira geral, os valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ foram mais enriquecidos em ^{13}C para amostras coletas nos tratamentos com exclusão de raíz. Da mesma forma, este efeito foi mais constante para as camadas mais profundas do que as camadas superficiais (0-10 e 10-20 cm). Os maiores valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$ nos tratamentos com exclusão

de raízes, nas camadas mais profundas, estão associados à menor contribuição do C de plantas C3 para o CO₂ do solo, especialmente via deposição e crescimento radicular.

O aporte de C no solo, por meio da serapilheira, pode justificar o fato de não serem observadas diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{CO}_2$, das camadas 0-10 e 10-20 cm, entre tratamentos com exclusão de raiz e sem exclusão de serapilheira. Possivelmente, a contínua entrada no solo de material com taxa de decomposição mais rápida (C₃) que do C anteriormente formado (C₄), ou seja, o efeito priming positivo pode ter mascarado os efeitos do isolamento de raiz, especialmente para as camadas mais superficiais, causando uma diminuição nos valores do $\delta^{13}\text{CO}_2$.

3.4.4 Dinâmica da concentração de CO₂ nas camadas do solo

A concentração de CO₂ nas camadas do solo compreende a soma entre a respiração heterotrófica (Rh), devido a utilização da MOS pelos microorganismos, e a respiração autotrófica (Ra), proveniente da raízes e dos microorganismos presentes na rizosfera. A partir do particionamento da respiração do solo é possível entender processos que regulam a ciclagem da MOS. No perfil do solo, com particionamento é possível compreender como ocorre a distribuição da contribuição das diferentes fontes de C para o CO₂ do solo.

Poucas diferenças na contribuição da Ra para o CO₂ total da L ou EL foram observadas. A contribuição da Ra era maior para amostras na L do que na EL, nas coletas realizadas em Fevereiro, Julho e Dezembro 2013, para todas as camadas exceto nos primeiros 10 cm de profundidade (P<0,05).

A contribuição da Ra para a concentração de CO₂ do solo tendeu a aumentar ao longo do tempo, sendo observadas as maiores contribuições em Julho 2014. Para este período, a contribuição da Ra era 37% na camada 20-40 cm da L e até 28% na EL (Figura 16).

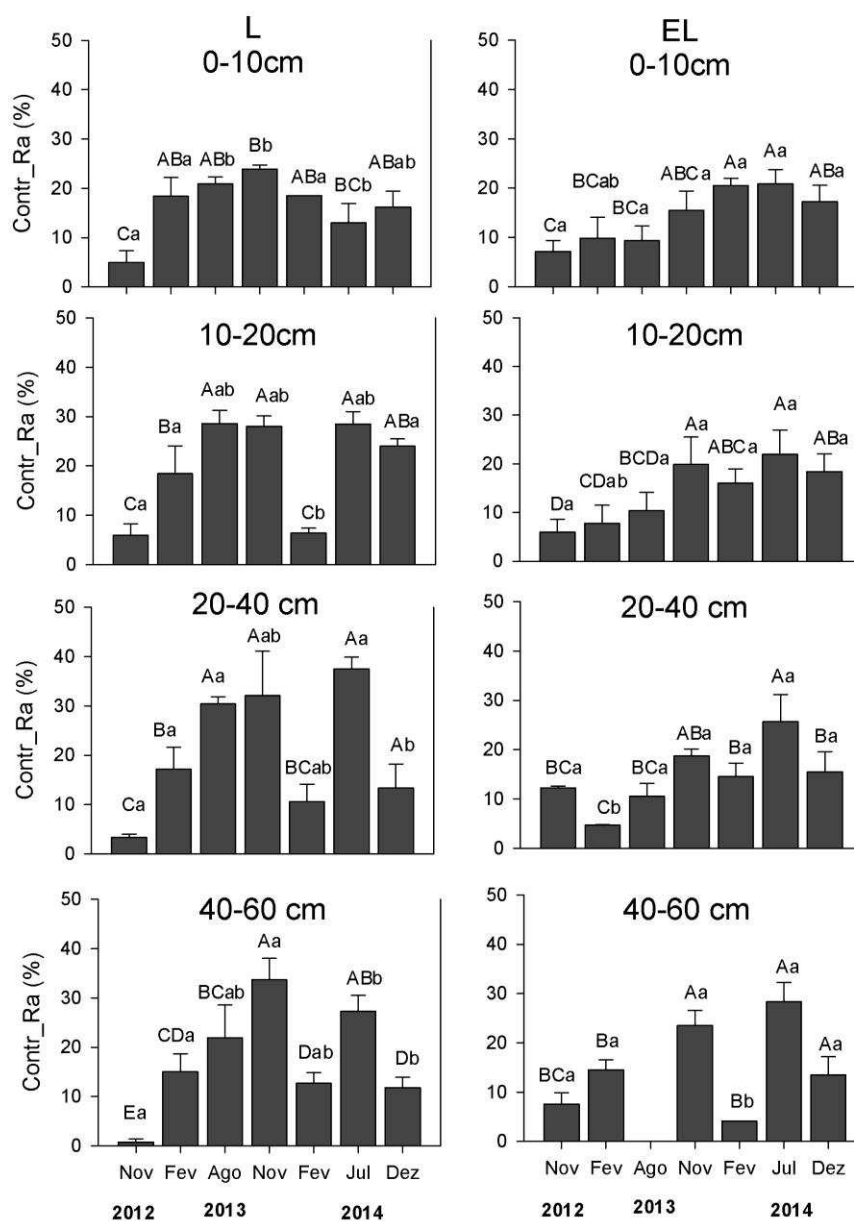


Figura 16. Contribuição da respiração autotrófica (Ra) para o CO₂ total das camadas 0-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm na linha (L) ou entrelinha (EL). Médias seguidas de mesma letra maiúscula dentro da posição no talhão e na mesma camada e minúscula dentro da mesma posição e período de avaliação, não diferem a 5% pelo teste t (LSD).

De maneira geral, a contribuição da Ra para o CO₂ das camadas de solo era significativamente diferente para amostras coletadas na L. A maior contribuição da Ra nas épocas mais frias foi observado na camada 20-40 cm. Por sua vez, em Fevereiro 2014, a maior contribuição foi observada na camada 0-10 cm. Era esperada uma menor contribuição

da Ra para as camadas mais profundas do solo em época de menor taxa crescimento, o que coincide com os meses de Agosto e Julho. Pausch & Kuzyakov (2012) avaliando o particionamento da respiração do solo, observaram uma maior contribuição da Ra para a camada entre 40-70 cm, coincidente com o período da maior taxa de crescimento do milho. Contudo, neste experimento, os meses de Agosto e Julho corresponderam ao período com maior conteúdo de água no perfil do solo, o que pode ter dificultado a difusividade do CO₂ para a superfície do solo, favorecendo sua concentração nestas camadas.

3.4.5 Concentração de CH₄

Diferenças entre as concentrações de CH₄ foram observadas, principalmente, ao longo do tempo ($P < 0,05$) (Figura 17). Entretanto, não houve um padrão temporal para a variação na concentração de CH₄ nas diferentes posições e camadas de solo avaliadas.

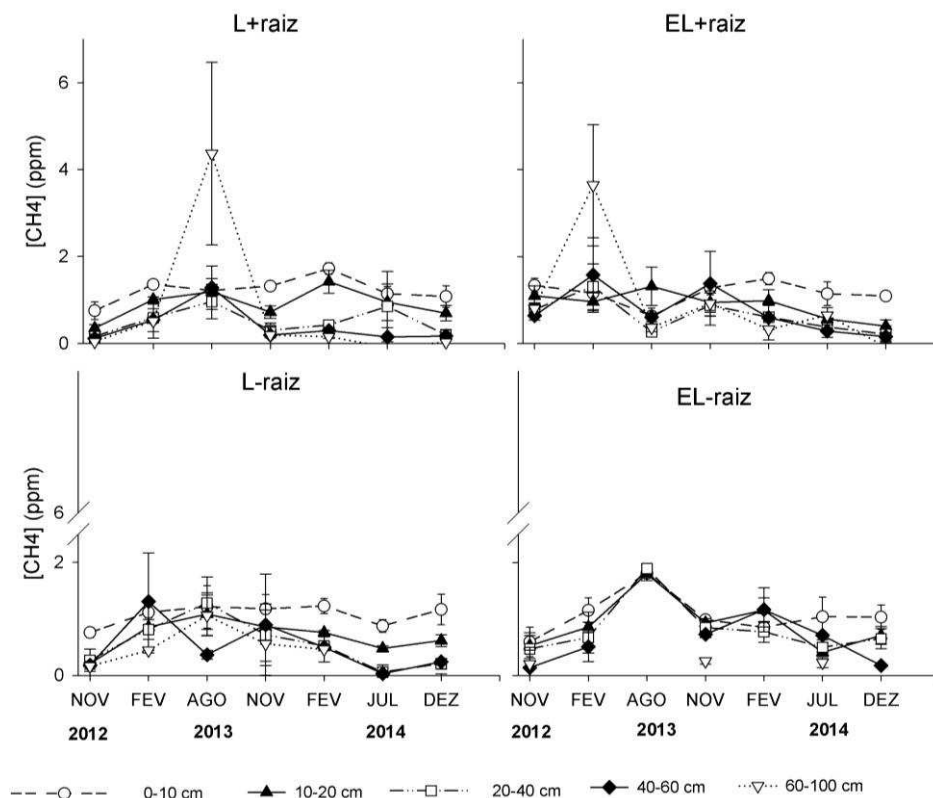


Figura 17. Concentração de CH₄ (média ± erro padrão, n=4) durante o período do experimento nas camadas de solo 0-10, 10-20, 20-40, 40-60 e 60-100 cm.

De maneira geral, a concentração de CH₄ não diferiu entre as camadas de solos nas diferentes posições do talhão amostradas, ao longo de todo o período de duração do

experimento ($P > 0,05$) (Tabela 4, anexo 4). Diferenças foram observadas na L_{+R+S} no período de Novembro 2013 à Dezembro 2014, onde a concentração de CH_4 das camadas mais superficiais (0-10 e 10-20 cm) era maior do que nas outras camadas. Ao mesmo tempo, a concentração de CH_4 foi significativamente maior na camada 60-100 cm em Agosto 2013 para amostras coletadas na L_{+R+S} ($4,37 \pm 2,06$ ppm) e em Fevereiro 2012 na EL_{+R+S} ($3,64 \pm 1,4$ ppm).

O CH_4 é produzido no solo pela quebra de compostos orgânicos, em condições anaeróbicas, sob baixíssimos potenciais redox. Outros estudos têm mostrado que o alto consumo de oxigênio (O_2) durante a mineralização de substratos favorece a formação de micro-ambientes anaeróbicos no solo (Flessa & Beese, 2000; Jäger et al., 2011). Não obstante, Reay et al., (2001), verificaram que em algumas florestas de Pinus a capacidade de oxidação do CH_4 aumentava com a profundidade do solo. Se associado ao crescimento da floresta, a maior produção de CH_4 nas camadas mais superficiais pode ter sido favorecida pelo aumento na entrada de serapilheira na área, expansão do sistema radicular e o desenvolvimento da rizosfera. Além da alta atividade microbiológica, que pode se associar ao maior consumo de O_2 e provável formação de ambientes anaeróbicos nesta camada. Neste sentido, Ma e Lu (2011) encontraram maior enriquecimento de metanogênicos hidrogenotróficos na região da rizosfera do que no solo, os quais podem estar favorecer incrementos na produção de CH_4 nas camadas mais superficiais .

A concentração de CH_4 diferiu entre as posições no talhão, até coletas realizadas em Fevereiro 2014 ($P < 0,05$) (Figura 17, Tabela 4 anexo). A partir de Fevereiro 2014, a concentração média de CH_4 no perfil do solo avaliado era em média $0,76 \pm 0,05$ ppm, similar ao encontrado em Julho 2014, mas significativamente superior ao encontrado em Dezembro 2014 ($0,45 \pm 0,02$ ppm). Hiltbrunner et al.(2012) constataram que o reflorestamento de áreas de pastagens aumenta a oxidação do CH_4 , sendo este efeito convergente mesmo entre áreas com grandes variações climáticas. Contudo, as condições edafoclimáticas da área experimento garantem condições peculiares para o processo de metanogênese e, portanto, aumentos progressivos na capacidade oxidativa dos solos no nosso experimento ocorrerá a uma taxa mais lenta do que observada por outros autores.

4. Conclusões

- A substituição de áreas do Pampa por florestas de eucalipto, após 29 meses de introdução da cultura, resulta na redução dos fluxos superficiais de CO₂ e da concentração de CO₂ nas camadas do solo, até 1 m de profundidade.
- O fluxo de CH₄ não é alterado em função da substituição do Bioma Pampa por florestas de eucalipto
- Até 29 meses de crescimento da floresta, o aporte de C ao solo via serapilheira não resulta em grandes diferenças nos fluxos de CO₂, em relação à remoção deste aporte.
- Por unidade de área, as emissões de CO₂ na linha são superiores às emissões na entrelinha, contudo ressalta-se que dentro de um talhão, área útil da linha corresponde em média à metade da área da entrelinha.
- A contribuição da respiração autotrófica para os fluxos de CO₂ observados aumenta progressivamente com o crescimento da floresta, contribuindo, ao final do experimento, com mais de 50% do fluxo observado. Entretanto, em condições de baixa umidade do solo, a contribuição autotrófica reduz-se fortemente. Como exemplo, essa contribuição na floresta com 19 meses de idade, no período de seca, é similar valores observados no início do experimento.

5. References

- Assmann, E. Principles of forest yield study. New York: Pergamon Press. 1970. 506p
- Borken W, Savage K, Davidson EA, Trumbore SE. Effects of experimental drought on soil respiration and radiocarbon efflux from a temperate forest soil. *Glob Chang Biol.* 2006;1:177–193.
- Brixner GF, Schöffel ER, Lago I, Radünz AL, Krüger AP. Risco de geada e duração dos subperíodos fenológicos da “ Cabernet Sauvignon ” na região da Campanha 1 R. *Rev Bras Eng Agrícola e Ambient.* 2014;18:217–224.
- Carlsson-Kanyama A, González AD. Potential contributions of food consumption patterns to climate change. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1704–1709.
- Cunningham SC, Metzeling KJ, Nally R Mac, Thomson JR, Cavagnaro TR. Changes in soil carbon of pastures after afforestation with mixed species : Sampling , heterogeneity and surrogates. *Agric Ecosyst Environ.* Elsevier B.V.; 2012;158:58–65.
- Don A, Schumacher J, Freibauer A. Impact of tropical land-use change on soil organic carbon stocks – a meta-analysis. *Glob Chang Biol.* 2011;17:1658–1670.
- Dungait JAJ, Hopkins DW, Gregory AS, Whitmore AP. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. *Glob Chang Biol.* 2012;18:1781–1796.
- Dutaur L, Verchot L V. A global inventory of the soil CH₄ sink. *Global Biogeochem Cycles.* 2007;21:1–9.
- Duursma RA, Barton CVM, Eamus D, Medlyn BE, Ellsworth DS, Forster MA, Tissue DT, Linder S, Mcmurtrie RE. Research paper : Part of a special issue on canopy processes in a

- changing climate Rooting depth explains [CO₂] × drought interaction in *Eucalyptus saligna*. *Tree Physiol.* 2011;31:922–931.
- Eswaran H, Van Den Berg E, Reich P. Organic carbon in soils of the world. *Soil Sci Soc Am J.* 1993;57:192–194.
- Fearnside PM, Righi CA, Graça PML de A, Keizer EWH, Cerri CC, Nogueira EM, Barbosa RI. Biomass and greenhouse-gas emissions from land-use change in Brazil's Amazonian "arc of deforestation": The states of Mato Grosso and Rondônia". *For Ecol Manage.* 2009;258:1968–1978.
- Fidelis A, Appezzato-da-Glória B, Pfadenhauer J. In: Patta Pilla V, Muller SC, Castilhos ZMS, Jacques AVA. *Campos sulinos: Conservação e Isso sustentável da biodiversidade.* Brasília: MMA, 2009. 403p.
- Flechard CR, Neftel A, Jocher M, Ammann C, Leifeld J, Fuhrer J. Temporal changes in soil pore space CO₂ concentration and storage under permanent grassland. *Agric For Meteorol.* 2007;142:66–84.
- Fontaine S, Bardoux G, Benest D, Verdier B, Mariotti A, Abbadie L. Mechanisms of the Priming Effect in a Savannah Soil Amended with Cellulose. *Soil Sci Soc Am J.* 2003a;68:125–131.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biol Biochem.* 2003b;35:837–843.
- Freschet T, Aerts R, Cornelissen JHC. Multiple mechanisms for trait effects on litter decomposition : moving beyond home-field advantage with a new hypothesis. *J Ecol.* 2012;100:619–630.
- Gatto A, Barros NF de, Novais RF, Silva IR Da, Leite HG, Villani EMA. Estoque de carbono na biomassa de plantações de eucalipto na região Centro-leste do Estado de Minas Gerais. *Rev Árvore.* 2011;35:895–905.
- Gatto A, de Barros NF, Novais RF, da Silva IR, Leite HG, Leite FP, Villani EM. Estoques de carbono no solo e na biomassa em plantações de eucalipto. *Rev Bras Cienc do Solo.* 2010;34:1069–1079.
- Goutal N, Parent F, Bonnaud P, Demaison J, Nourrisson G, Epron D, Ranger J. Soil CO₂ concentration and efflux as affected by heavy traffic in forest in northeast France. *Eur J Soil Sci.* 2012;63:261–271.
- Guo LB, Gifford RM. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Glob Chang Biol.* 2002;8:345–360.
- Hashimoto S, Tanaka N, Suzuki M, Ionue A, Takizawa H, Kosaka I, Tanaka K, Tantasirin C, Tangtham N. Soil respiration and soil CO₂ concentration in a tropical forest , Thailand. *J For Res.* 2004;9:75–79.
- Hérault A, Lin Y, Bourne A, Medlyn BE, Ellsworth DS. Optimal stomatal conductance in relation to photosynthesis in climatically contrasting *Eucalyptus*. 2013;262–274.
- Hiltbrunner D, Zimmermann S, Karbin S. Increasing soil methane sink along a 120-year afforestation chronosequence is driven by soil moisture. *Glob Chang Biol.* 2012;18:3664–3671.
- Hornibrook ERC, Bowes HL, Culbert A. Methanotrophy potential versus methane supply by pore water diffusion in peatlands. 2009;1491–1504.
- Houghton RA, House JI, Pongratz J, Werf GR Van Der, Defries RS, Hansen MC, Le Quére C, Ramankutty N. Carbon emissions from land use and land-cover change. *Biogeosciences.* 2012;4:5125–5142.
- Irvine J, Law BE, Martin JG, Vickers D. Interannual variation in soil CO₂ efflux and the

- response of root respiration to climate and canopy gas exchange in mature ponderosa pine. *Glob Chang Biol.* 2008;14:2848–2859.
- Jäger N, Stange CF, Ludwig B, Flessa H. Emission rates of N₂O and CO₂ from soils with different organic matter content from three long-term fertilization experiments — a laboratory study. *Biol Fertil Soils.* 2011;47:483–494.
- Jandl R, Lindner M, Vesterdal L, Bauwens B, Baritz R, Hagedorn F, Johnson DW, Minkinen K, Byrne KA. How strongly can forest management influence soil carbon sequestration? 2007;137:253–268.
- Janzen HH. Carbon cycling in earth systems - A soil science perspective. *Agric Ecosyst Environ.* 2004;104:399–417.
- Jose S, Meir P, Miranda HS, Grace J, Montes RA. Productivity and carbon fluxes of tropical savannas. *J Biogeogr.* 2006;33:387–400.
- Kayler ZE, Ganio L, Hauck M, Mix AC, Bond BJ. Bias and uncertainty of δ¹³C CO₂ isotopic mixing models. *Oecologia.* 2010;163:227–234.
- Kuzyakov Y. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biol Biochem.* 2006;38:425–448.
- Kuzyakov Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2010;42:1363–1371.
- Laclau J, Arnaud M, Bouillet J. Spatial distribution of Eucalyptus roots in a deep sandy soil in the Congo : relationships with the ability of the stand to take up water and nutrients †. *Tree Physiol.* 2001;21:129–136.
- Lützw M V., 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. *Eur J Soil Sci.* 2006;57:426–445.
- Ma K, Lu Y. Regulation of microbial methane production and oxidation by intermittent drainage in rice field soil. *Microb Ecol.* 2011;75:446–456.
- Millard P, Midwood AJ, Hunt JE, Whitehead D, Boutton TW. Partitioning soil surface CO₂ efflux into autotrophic and heterotrophic components , using natural gradients in soil δ¹³C in an undisturbed savannah soil. *Soil Biol Biochem.* 2008;40:1575–1582.
- Miller JB, Tans PP. Calculating isotopic fractionation from atmospheric measurements at various scales. *Tellus.* 2003;55B:207–214.
- Muell F, Li C, Wang K. Differences in drought responses of three contrasting Eucalyptus microtheca F. Muell. populations. *For Ecol Manage.* 2003;179:377–385.
- Neto ES, Carmo JB, Keller M, Martins SC, Alves LF, Vieira SA, Piccolo MC, Camargo P, Superior E, Luiz DA. Soil-atmosphere exchange of nitrous oxide , methane and carbon dioxide in a gradient of elevation in the coastal Brazilian Atlantic. *Biogeosciences.* 2011;8:733–742.
- Ojima DS, Valentine DW, Mosier AR, Parton WJ, Schimep DS. Effect of land use change on methane oxidation in temperate forest and grassland soil. *Chemosphere.* 1993;26:675–685.
- Oliveira DMDS. Matéria orgânica e fluxos de CO₂ e CH₄ em área minerada e fertilizada com cama de aviário e fosfato natural. Tese Mestado, Univ. Fed. Viçosa. 2013.
- Overbeck G, Muller S, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar V, Blanco C, Boldrini I, Both R, Forneck E. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspect Plant Ecol Evol Syst.* 2007;9:101–116.
- Pausch J, Kuzyakov Y. Soil organic carbon decomposition from recently added and older sources estimated by δ¹³C values of CO₂ and organic matter. *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2012;55:40–47.

- Plaza-Bonilla D, Cantero-martínez C, Bareche J, Arrúe JL, Álvaro-fuentes J. Soil carbon dioxide and methane fluxes as affected by tillage and N fertilization in dryland conditions. *Plant Soil*. 2014;
- Post WM, Knowlton KC. Soil carbon sequestration and land-use change : processes and potential. *Glob Chang Biol*. 2000;6:317–327.
- Raich JW, Tufekcioglu A. Vegetation and soil respiration : Correlations and controls. *Biogeochemistry*. 2000;48:71–90.
- Reay DS, Radajewski S, Murrell JC, McNamara N, Nedwell DB. Effects of land-use on the activity and diversity of methane oxidizing bacteria in forest soils. *Soil Biol Biochem*. 2001;33:1613–1623.
- Ruan L, Robertson PG. Initial nitrous oxide , carbon dioxide, and methane costs of converting conservation reserve program grassland to row crops under no-till vs . conventional tillage. *Glob Chang Biol*. 2013;19:2478–2489.
- Ruehr NK, Buchmann N. Soil respiration fluxes in a temperate mixed forest : seasonality and temperature sensitivities differ among microbial and root – rhizosphere respiration. 2009;165–176.
- Ruiz HA. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta de suspensão (silte+argila). *Rev Bras Cienc do Solo*. 2005;29:297–300.
- Schimel JP, Balser TC, Wallenstein MD. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*. 2007;88:1386–1394.
- Shvaleva AL, Silva FCE, Breia E, Jouve L, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues ML, Pereira JS, Chaves MM. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiol*. 2005;26:239–248.
- Silva SR, Barros NF De, Marciano L, Mendonça EDS, Leite FP. Alterações do solo influenciadas pelo tráfego e carga de um “forwarder” nas entrelinhas de uma floresta de eucalipto. *Rev. Bras. Cienc. do Solo*. 2007.
- Six J, Conant RT, Paul EA, Paustian K. Stabilization mechanisms of soil organic matter : Implications for C-saturation of soils. *Plant Soil*. 2002;241:155–176.
- Soares EMBS, Silva IR, Novais RF, Hu Y, Schmidt-Rohr K. Alterations in Molecular Composition of Humic Substances from Eucalypt Plantation Soils Assessed by ¹³C-NMR Spectroscopy. *Soil Sci Soc Am J*. 2011;77:293–306.
- Sulzman EW, Brant JB, Bowden RD, Lajtha K. Contribution of aboveground litter , belowground litter , and rhizosphere respiration to total soil CO₂ efflux in an old growth coniferous forest. 2005;231–256.
- Suseela V, Conant RT, Wallenstein M, Dukes JS. Effects of soil moisture on the temperature sensitivity of heterotrophic respiration vary seasonally in an old-field climate change experiment. *Glob Chang Biol*. 2012;18:336–348.
- Vargas R, Baldocchi DD, Allen MF, Bahn M, Andrew Black T, Collins SL, Curiel Yuste J, Hirano T, Jassal RP, Pumpanen J, Tang J. Looking deeper into the soil : biophysical controls and seasonal lags of soil CO₂ production and efflux. *Ecol Appl*. 2010;20:1569–1582.
- Wei W, Weile C, Shaopeng W. Forest soil respiration and its heterotrophic and autotrophic components : Global patterns and responses to temperature and precipitation. *Soil Biol Biochem*. Elsevier Ltd; 2010;42:1236–1244.
- Zhou X, Wan S, Luo Y. Source components and interannual variability of soil CO₂ efflux under experimental warming and clipping in a grassland ecosystem. *Glob Chang Biol*.

2007;13:761–775.

6. Anexo

Tabela 2. Fluxos de CO₂ (mg C-CO₂ m⁻² h⁻¹) e razão isotópica δ¹³C-CO₂ em áreas de eucalipto sob diferentes manejos e aporte de C no solo.

Posição no talhão	Entrada C	Período Amostrado													
		Nov 2012		Fev 2013		Ago 2013		Nov 2013		Fev 2014		Jul 2014		Dez 2014	
Fluxo de CO ₂ (mg C-CO ₂ m ⁻² h ⁻¹)															
L	+R+S	204	Ac	164	Bab	52	Dab	186	ABa	68	Db	114	Ca	72	Dcd
	+R-S	251	Ab	187	Ba	74	Da	138	Cb	82	Dab	97	Da	100	Dab
	-R+S	222	Ac	146	Bb	56	Fab	110	Bbc	65	DEb	33	Fc	90	Dbc
EL	+R+S	323	Aa	162	Bab	32	Fbc	126	Cab	70	DEb	61	Eb	89	Dbc
	+R-S	177	Ad	115	BCc	36	Dbc	89	Cc	100	BCa	58	Dbc	126	Ba
	-R+S	119	Be	139	Abc	24	Cc	106	Bbc	30	Cc	113	ABa	47	Cd
δ ¹³ CO ₂ (‰)															
L	+R+S ⁽¹⁾	-13	±0,9	-18	±0,3	-18	±	-22	±0,9	-19	±0,3	-26	±0,9	-25	±0,5
	-R+S ⁽²⁾	-13	±0,6	-13	±0,5	-13	±	-15	±0,9	-15	±1,1	-21	±1,9	-17	±0,7
EL	+R+S ⁽¹⁾	-16	±0,5	-17	±0,6	-21	±	-20	±0,6	-14	±0,9	-24	±0,5	-20	±0,7
	-R+S ⁽²⁾	-12	±0,5	-15	±1,8	-15	±	-14	±0,5	-11	±1,1	-18	±1,1	-15	±1,8

⁽¹⁾Razão isotópica do C-CO₂ calculada com base no proposto por (Miller e Tans, 2003); ⁽²⁾Razão isotópica do C-CO₂ na camada 0-10 cm do tratamentos com exclusão de razão. Sendo Linha (L) e entrelinha (EL) entrelinha; +R sem exclusão de raiz, -R com exclusão de raiz; +S sem exclusão da serapilheira e -S com exclusão da serapilheira. Média de CO₂ seguidos por mesma letra maiúscula dentro da linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t.

Tabela 3. Razão isotópica média do CO₂ nas camadas do solo

Camada do solo (cm)	Posição no talhão	Período de avaliação													
		Nov 2012		Fev 2013		Ago 2013		Nov 2013		Fev 2014		Jul 2014		Dez 2014	
0-10	L _{+R}	-13,2	Caa	-15,9	BCaa	-16,6	ABCaa	-17,2	ABCaa	-14,2	BCab	-19,9	Aaab	-17,7	ABaa
	EL _{+R}	-14,2	Baa	-14,5	Bba	-17	ABaa	-16,6	ABaa	-14,9	ABab	-19,1	Aab ab	-17,7	ABaa
	L _{-R}	-13,0	Caa	-12,9	Caa	-13,3	BCab	-14,6	BCaa	-15	BCab	-20,7	Aab	-17,5	ABaa
	EL _{-R}	-12,5	Bba	-15	ABaa	-15,8	ABaab	-14,2	ABaa	-11,3	Baa	-17,5	Aaa	-15,4	ABaa
10-20	L _{+R}	-13,6	Caa	-16,1	ABCaa	-17,9	ABaa	-17,4	ABCaa	-14,6	BCaa	-19,1	Aaa	-17,9	ABaa
	EL _{+R}	-13,6	Caa	-14,3	BCba	-16,1	BCaab	-17,3	ABCaa	-15,1	ABaa	-20,6	Aba	-17,9	Abaa
	L _{-R}	-13,2	Baa	-13,2	Baa	-13,4	Bab	-14,5	Baa	-14,6	Baa	-18,7	Aaa	-17	Aaa
	EL _{-R}	-12,6	Aba	-13,5	CDaa	-17,3	BCaa	-15	BCDaa	-12,5	Daa	-19	ABaa	-15,4	BCDaa
20-40	L _{+R}	-13,6	Caa	-16,1	BCaa	-18,2	ABaa	-18,2	ABaa	-15,7	BCaa	-21,9	Aaa	-18,9	ABaa
	EL _{+R}	-13,6	Baa	-14	Bba	-16,5	Baab	-16,2	Baab	-14,6	Baab	-22,1	Aba	-17,3	Baa
	L _{-R}	-13,3	Baa	-13,5	Baa	-13,4	Bab	-14,5	ABab	-14,1	Baab	-18,4	Aab	-17,3	ABaa
	EL _{-R}	-12,7	Bba	-13,6	Baa	-15	Bab	-13,9	Bab	-12,1	Bab	-19,7	Aaab	-16,2	ABaa
40-60	L _{+R}	-13,5	Caa	-15,6	BCab	-16,5	BCaa	-17,9	ABaa	-15,3	BCaa	-21,6	Aab	-18,9	ABaa
	EL _{+R}	-13,5	Baa	-20,1	Aaa	-16,1	ABaa	-16,3	ABaab	-13,7	Baa	-20,2	Abb	-17,4	ABaa
	L _{-R}	-13,1	Caa	-13,3	Cab	-12,8	Cab	-14,1	BCabc	-13,9	BCaa	-19,7	Aaab	-17,9	ABaa
	EL _{-R}	-12,7	ABba	-13,2	ABab			-12,4	Bac	-14,8	ABaa	-16,7	Aab	-16,3	ABaa
60-100	L _{+R}	-13,3	Dab	-15,1	BCDaa	-18,2	ABCaa	-18,4	ABCaa	-14,7	CDaa	-22	Aaa	-19,2	ABaa
	EL _{+R}	-13,3	Aab	-13,9	Aba	-16,5	Aaa	-16,2	Aaab	-13,5	Aaa	-16,7	Aab	-16,5	Aaa
	L _{-R}	-12,9	Bab	-13,1	Baa	-12,5	Bab	-13,9	ABab	-13,8	Baa			-18,1	Aaa
	EL _{-R}	-17,1	Aaa							-12,4	Baa			-17,2	Aaa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula dentro de cada camada e posição ou letra minúscula dentro do mesmo período e posição ou letra minúscula itálica dentro da mesma camada e período não diferem entre si à 5% pelo teste t. L=linha do talhão, EL= entrelinha do talhão, -R= tratamento com exclusão de raiz e +R= tratamento sem exclusão de raiz

Tabela 4. Média da concentração de CH₄ (ppm) nas camadas do solo em diferentes posições no talhão durante o experimento.

Camada do solo (cm)	Posição no talhão	Período de avaliação													
		Nov 2012	Fev 2013	Ago 2013	Nov 2013	Fev 2014	Jul 2014	Dez 2014							
0-10	L _{+R}	0,75	Baa	1,36	ABaa	1,21	ABbab	1,31	ABaa	1,72	Aaa	1,14	ABaa	1,08	Abaa
	EL _{+R}	1,34	Abaa	1,16	Abba	0,63	Babb	1,28	Abaa	1,50	Aba	1,14	ABaa	1,09	Abaa
	L _{-R}	0,76	Aaa	1,11	Aaa	1,21	Aaab	1,18	Aaa	1,23	Aaa	0,87	Aaa	1,17	Aaa
	EL _{-R}	0,60	Caa	1,15	ABaa	1,81	Aaa	0,99	BCaa	0,85	BCabb	1,04	BCaa	1,03	BCaa
10-20	L _{+R}	0,35	Baa	1,0	ABaa	1,19	Abba	0,71	ABaba	1,42	Aaa	0,98	ABaba	0,69	ABaba
	EL _{+R}	1,10	Abaa	0,96	Abba	1,31	Aba	0,94	Abaa	0,98	ABaba	0,56	ABaa	0,40	Baba
	L _{-R}	0,21	Baa	0,86	ABaa	1,09	Aaa	0,85	ABaa	0,76	ABaa	0,48	ABaa	0,62	ABaba
	EL _{-R}	0,53	Baa	0,86	Baa	1,80	Aaa	0,93	Baa	1,16	ABba	0,41	Baa	0,72	Baa
20-40	L _{+R}	0,16	Aaa	0,59	Aaa	0,96	Abab	0,30	Aba	0,42	Aba	0,85	Aabca	0,19	Aaba
	EL _{+R}	0,78	Abaa	1,31	Aba	0,72	ABabb	0,88	Abaa	0,60	ABaba	0,38	Aaa	0,21	Aaba
	L _{-R}	0,27	Baa	0,81	ABaa	1,28	Aaab	0,72	ABaa	0,52	ABaa	0,06	Baa	0,21	Bba
	EL _{-R}	0,47	Baa	0,67	Baa	1,89	Aaa	0,85	Baa	0,77	Baba	0,50	Baa	0,65	Baa
40-60	L _{+R}	0,12	Baa	0,54	ABab	1,28	Aba	0,19	Bbb	0,29	Bba	0,14	Bbca	0,19	Baba
	EL _{+R}	0,64	BCaa	1,58	Aba	0,60	BCaba	1,38	ABaa	0,60	BCaba	0,28	Caa	0,16	Caba
	L _{-R}	0,18	BCaa	1,31	Aaab	0,37	ABaa	0,90	BCaab	0,50	ABCaa	0,03	Caa	0,24	BCaba
	EL _{-R}	0,14	Aaa	0,51	ABab			0,73	ABaab	1,16	Aba	0,71	Abaa	0,17	Baa
60-100	L _{+R}	0,04	Baa	0,51	Bab	4,37	Aaa	0,19	Bba	0,15	Bba	-0,09	Bca	0,03	Bba
	EL _{+R}	0,80	Baa	3,64	Caa	0,36	ABbb	0,92	Baa	0,32	BCba	0,64	BCaa	-0,08	Cba
	L _{-R}	0,16	Aaa	0,44	ABaa	1,06	Bab	0,56	ABaa	0,46	ABaa			-0,02	Aba
	EL _{-R}	0,20	Aaa							0,25	Aaa			0,23	Aaa

L=linha do talhão, EL= entrelinha do talhão, -R= tratamento com exclusão de raiz. +R= tratamento sem exclusão de raiz. Médias seguidas por letra maiúscula dentro de cada camada e posição ou letra minúscula dentro do mesmo período e posição ou letra minúscula itálica dentro da mesma camada e período não diferem entre si à 5% pelo teste t.

III- CHAPTER 2

STABLE ISOTOPE TRACING OF CHANGES ON SOIL ORGANIC MATTER FRACTIONS AND MICROBIAL COMMUNITIES FOLLOWING THE SIMULATED MANAGEMENT OF EUCALYPT HARVEST RESIDUES

1. Introduction

Planted forests are the key of low-carbon emergent economics, reducing pressure over native forest and enhancing the forestry potential for mitigate climate change (Bonan, 2008). In this scenario, Eucalyptus sp. is the most widely planted tree genus in Brazil (4,8000.000 ha), mainly intended to supply pulp production. In production systems, short rotation (5-7 years) of a densely planted forest is usually adopted, which leads to a high soil nutrient demand. The potential for returning part of this nutrient requirement to soil relies on management practices. One of those practices is correlated with harvest residue management and its interactions with edaphoclimatic conditions (du Toit et al., 2010), which can result in negative soil-plant nutritional balance when nutrients exportation is higher than the nutrients input.

Hernández et al. (2009) founded that commercial logs exported accounts for 61% of the above-ground biomass and less than 50% of total nutrients in an Eucalyptus dunni plantation in Uruguay. These authors pointed out that specific compound can carry greater quantities of nutrient content in harvest residue, as in bark which has more than 50% of available calcium (Ca) or leaves with almost 30% of nitrogen (N) available on residue. Regardless of the specific composition of harvest compounds, decomposition of organic residues left on site at harvest can release large amounts of nutrients favoring forestry production (Paes et al., 2013; Versini et al., 2013). Moreover, harvest nutrient released may enhance the mechanisms of soil organic carbon (SOC) stabilization (Neff et al., 2002; Lützow et al., 2006; Huang et al., 2011).

The chemical composition and structural characteristics of residue determine the rate of biomass loss (Berg, 2000; Santo et al., 2009) and most of chemical indices of substrate quality used for describing the residue dynamic in soil considerate the N residue amount, for example, C:N, lignin:N and N:P ratios and the initial N content (Dijkstra et al., 2004; Manning et al., 2008; Cuchietti et al., 2014). Meanwhile, Puttaso et al. (2011) found that they can describe adequately residue decomposition, but just when applied on a time scale. For example, N amounts are positively correlated with the initial decomposition rate and the opposite behavior is observed

1 for lignin, lignin:N ratio, polyphenols in latter decomposition periods. Moreover,
2 long-term N additions may favors C stocks in soil specially in litter with high
3 content of lignin (Grandy e Neff, 2008).

4 One of the possible explanations for such behavior is the central role of soil
5 microbes on many processes. Microbial communities can be altered by warming, N
6 fertilization, pH, C:N ratio (Ros et al., 2006; Högberg et al., 2007; Lucas et al.,
7 2007), but consequences of these shifts for C dynamics are difficult to predict as a
8 consequence of microbial redundancy (Deacon et al., 2006). Specifically, metabolic
9 responses of microbial community to N enrichment are complex and highly variable.
10 For example, addition of mineral N on organic soil layer showed to shift microbial
11 enzymes production when C:N ratio were higher than 25 but could not alter it when
12 C:N ratio were lower than 20 (Michel e Matzner, 2003). In another study, N
13 availability was positively correlated with cellulose activity (Geisseler e Horwath,
14 2009), but this relation is more complex when production of extracellular enzymes
15 target to decomposition of recalcitrant C, as lignin and polyphenol (Sinsabaugh,
16 2010). Thus, microbial community and their enzymes activities regulate soil C
17 cycling, but the mechanisms involved are not well-understood (Treseder et al., 2012).

18 Soil organic matter (SOM) is an important source of nutrients for plants and
19 soil microbes, plays a central role on greenhouse gases mitigation and is considered
20 an indicator of soil quality. So, changing on soil C stocks can be a powerful tool to
21 evaluate the sustainability of forest management practices (Leifeld e Kögel-Knabner,
22 2005) and may be an important predictor of soil use change.

23 Land use change, specifically C₃ to C₄ vegetation or vice versa allows the use
24 of stable isotope tracing for analyzing change on C cycling under field conditions.
25 Moreover, the C-isotope signature of individual phospholipid fatty acids (PLFA) can
26 be a useful approach, on a temporal base, to investigate of microbial groups which
27 use a given C source (Glaser, 2005; Rubino et al., 2010). Using ¹³C isotope analyses
28 the aim of this work was to investigate alteration of microbial community
29 composition and soil C dynamics caused by different harvest residue management.

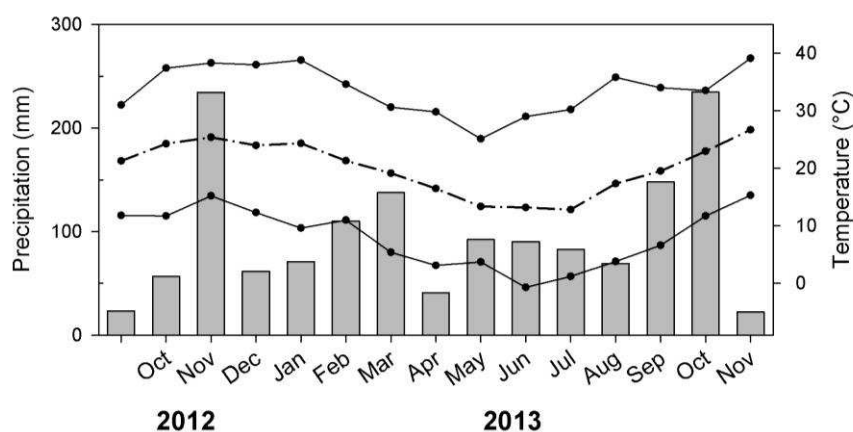
30 We hypothesized that residue incorporation accelerates decomposition rate
31 and reduces SOM accumulation, bark maintenance decreases the rate of residue
32 decomposition and this effect is stronger at higher N availability and fungi are the
33 main decomposer groups of harvest residues with bark and has proportionally more
34 residue-C in their biomass than the other microbial groups.

1 2. Material and methods

2

3 2.1 Study site and experimental design

4 The study site was located in southern Brazil (30°26'S; 54°31'W), near
5 Brazil-Uruguay border, under subtropical conditions and within the Pampa Biome
6 (native grasslands) domains. The Pampa Biome occupies an area of 176.500 km²
7 which represents 2% of the Brazilian territory (Ministry the Environment (MMA),
8 2007). Some floristic analyses had pointed out that a distinct characteristic of this
9 Biome is the coexistence of C₄ and C₃ species, which revealed a high degree of
10 similarity between Pampa and Cerrado biomes, and also with temperate grasslands
11 on Río de la Plata region (Overbeck et al., 2007). The favourable topography and
12 climate have attracted companies of forest sector and extensive areas of this unique
13 native vegetation are being rapidly converted to short-rotation eucalypt plantations.
14 Climatic conditions over the experimental period are shown in Figure 1.



15

16 Figure 1. Monthly average temperatures (dotted line), minimum and maximum
17 temperatures (continuous line) and precipitation (bars) in southern Brazil over the
18 experimental period.

19

20 The soil is a Humic Inceptsol (U.S. Soil Taxonomy). Selected soil properties
21 at the start of the experiment in the 0-10 cm layer were as follow: pH (H₂O, 1:2.5)
22 was 4.71; total organic carbon (Walkley & Black, 1934) was 2.32 dag kg⁻¹ c; cation
23 exchange capacity at pH 7 was 15.91 cmol_c dm⁻³; base saturation was 48%; sand, silt
24 and clay content (Ruiz, 2005) were 170, 550 and 280 g kg⁻¹, respectively. The natural
25 isotopic C composition ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) of soil was -13.3 ‰, which, indicates that native
26 SOM was mostly derived from C₄ photosynthetic type. Our experiment started 3
27 months after native Pampa plants elimination by non-selective herbicide (glyphosate)

1 spraying and seedlings establishment of *Eucalyptus dunnii*. As a consequence of the
 2 beginning of C₄ to C₃ vegetation change, we could ensure at least -13 ‰ on variation
 3 of ¹³C natural abundance between the former native soil C pool and the new added
 4 C₃ residue. Natural ¹³C abundance of eucalypt harvest residues averaged -26.2 and
 5 25.8 ‰, respectively, for residues without and with bark (more details below). Other
 6 harvest residue characteristics are presented in Table 1.

7 In the present study, we simulated three types of harvest residue
 8 management: all aboveground harvest residue and previous litter were removed (-R),
 9 only bark was removed from harvest residue (-B), which left on the soil surface 2,1
 10 kg m² of residue and all harvest residue was kept on soil surface (+B), which left on
 11 the soil surface 3,1 kg m² of residue; two soil management: maintenance of harvest
 12 residues on soil surface (SUP) and incorporation of harvest residues into the soil up
 13 to 5 cm deep (INC) and; two mineral N fertilization level: without N fertilization (-
 14 N) and 200 kg ha⁻¹ of fertilizer (200 kg ha⁻¹). The treatments were combined in a split
 15 plot design, with four replicated blocks.

16

17 Table 1. Residue characteristics in the beginning of this experiment

Residue	Compound Composition	C (dag kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)
-B	Leaves, Stem, Branch and Roots	44.9	6.3
+B	Leaves, Stem, Branch, Roots and Bark	44.2	5.2

18

19 The amount of residue applied simulated a harvest residue left on site by a
 20 forest stand with productivity of 50 m³ ha⁻¹ year⁻¹. Ammonium nitrate (¹⁴NH₄¹⁴NO₃),
 21 and ammonium sulfate ((¹⁵NH₄)₂SO₄), with 98‰ ¹⁵N atom percent excess (APE)
 22 were used as N sources. Both fertilizers were mixed together to provide a solution
 23 with 10% APE.

24 Our experimental units were microplots (based on Blumfield et al, 2004)
 25 consisted of by polyvinyl chloride (PVC) tubes with length and diameter of 15 cm
 26 (Figure 2). The tubes had six 10 mm side holes to avoid some limitations of
 27 decomposition studies, i.e. faunal exclusion (Bradford et al., 2002). Tubes were
 28 inserted 10 cm into the soil, with side holes leveled with the soil surface. Harvest
 29 residues were placed inside the microplots and either incorporated or left on the soil
 30 surface. For incorporated treatments, the soil (0-5 cm) from inside the microplot was

1 removed with a spoon and put apart on a plastic film, then a fine plastic mesh (60
2 mesh) was placed on the newly exposed soil surface to delimit the volume of soil
3 into which the residue incorporation would take place. The residues were mixed
4 manually with the soil taken from the microplots (0-5 cm deep) and saved apart and
5 then accommodated back inside the microplot. Care was taken to ensure the original
6 soil volume and bulk density was reached by hand pressing the soil + residue mix. In
7 +N treatments an amount of N equivalent to 200 kg ha⁻¹ was applied as a solution of
8 the above-mentioned sources. The solution (100 mL) was applied inside the
9 microplots on top of the residues in SUP treatments and for INC treatments it was
10 mixed with residue and soil before taking place on microplot.

11 Following, each PVC units was covered with a coarse plastic mesh to avoid
12 external litter deposition inside the experimental unit. The tubes containing the
13 treatments were kept on the field during 0, 3, 6 and 12 months. At each sampling
14 time, they were carefully excavated as intact soil cores, covered tightly with
15 styrofoam lids, involved in a plastic film and then immediately transported to the
16 laboratory for soil and residue analyses.

17 2.2 Soil CO₂ efflux measurements

18 Soon after arriving in the laboratory the whole experimental units (PVC tubes
19 containing soil and residues treatments) were placed into air-tight 3 L-plastic
20 container and incubated during 7 days. Respired carbon dioxide (CO₂) emitted was
21 captured with two CO₂ traps (1 mol L⁻¹NaOH; 30 mL each). For each incubation
22 batch there were a replicated control containers (no soil) in order to capture and
23 quantify the CO₂ and δ¹³C-CO₂ values of the ambient air in the containers headspace.

24 One of the trap vials was analyzed BaCl₂/HCL titration method to quantify
25 the respired CO₂. The other vial was used to determine δ¹³C of respired CO₂ (δ¹³C-
26 CO₂) using a method adapted from the Werth et al. (2006) protocol. Briefly, the CO₂
27 trapped as sodium carbonate (Na₂CO₃) was precipitated with BaCl₂ (1 mol L⁻¹). The
28 precipitate formed was centrifuged and washed with deionised water for four times at
29 3000 rpm for 10 min. After washing the precipitate, the remained water was removed
30 from the vials and the BaCO₃ was dried at 105 °C. Finally, the BaCO₃ was analyzed
31 in an Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS 20-20 ANCA-GLS, Sercon,
32 Crewe, UK) to determine δ¹³C-CO₂ values.

33

1 2.3 Residue and soil analyses

2 After the incubation period, residue was manually separated from the soil.
3 Soil adhering to residues, particularly in the incorporated treatments, was wiped off
4 with a small brush. Residues were oven-dried at 60 °C for 96 h, weighted and ground
5 (<0.212 mm) for IRMS analyses.

6 In superficial treatments, soil from the 0-1cm and 1-5 cm layer (0-5 cm in the
7 incorporated treatment) was removed with a spoon and segregated in two
8 subsamples: one was frozen at -80 °C, lyophilized, tightly packed and stored at -80
9 °C until PLFA analyses. The other soil subsample part at 0-1 cm soil layer and soil at
10 0-5 cm of INC treatments were air dried and sieved (<2mm) for SOM fractionation,
11 using Cambardella and Elliott (1992) protocol. Briefly, soil were dispersed with
12 sodium hexametaphosphate (5 g L⁻¹), 1:3 w/v, by shaking for 15h on a horizontal
13 shaker. SOM fractions were separated passing the dispersed soil through a 53 µm
14 sieve with water rinses. The material retained on the sieve is defined as Particulate
15 Organic matter (POM) and OM associated with soil minerals (MAOM) is the
16 fraction that passed through the sieve. These fractions were oven dried at 50 °C until
17 constant weight, than weighted and powdered in a ball mill (<0.150 mm) for
18 subsequent IRMS analyses.

19

20 2.4 PLFA analyses

21 Soil sub-samples in the 0-3 cm depth at 3, 6 and 12 months of this experiment
22 were frozen and lyophilized for PLFA analyzes. The soil sub-samples reserved were
23 thawed to room temperature. All visible plants debris was removed by handpicking
24 using tweezers and then soil was ground.

25 A modified Bligh Dyer extraction procedure (Dungait et al., 2013) was used
26 to extract PLFAs. Briefly, Bligh Dyer solvent [monopotassium phosphate (KH₂PO₄)
27 buffered water, chloroform (CHCl₃) and methanol (MeOH), 4:5:10, v/v/v at pH 7.3]
28 was added to soil in a 3:1 v/w ratio, ultrasonicated for 15 min and then centrifuged.
29 The organic phase obtained was fractionated using silica (Si) gel columns and the
30 differential lipids solubilities on CHCl₃, acetone and MeOH that resulted on neutral,
31 acidic and polar fractions. Nonadecane (0.1 mg mL⁻¹), used as an internal standard,
32 was added on polar fractions before its saponification and methylation.
33 Saponification was performed adding methanolic NaOH (0.5 mol L⁻¹; 1 h, 80 °C)
34 and methylation was performed with acidic MeOH (1 h, 70 °C) thus obtaining fatty

1 acid methyl esters (FAMES). FAMES were separated after addition of ultrapure water
2 extracted with and hexane. FAMES were quantified using a Thermo Finnigan Trace
3 GC/MS system (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK), separated using
4 an Agilent 50% Cyanopropylphenyl-dimethylpolysiloxane column (30 x 0.25 mm
5 i.d. x 0.25 µm film thickness) and He as carrier gas (pressure of 10 psi). The GC
6 temperature conditions were 80 °C for 1 min, to 180 °C at 15 °C min⁻¹, to 215 °C at 3
7 °C min⁻¹ (held for 3 min). The MS interface was held at the maximum oven
8 temperature, the ion source was held at 280 °C and the quadrupole mass analyzer
9 was operated in electron ionization (EI) mode and scanning over m/z 50–650 range at
10 1.7 scans s⁻¹. The current emission was maintained at 300 mA and the electron
11 energy was 70 eV.

12 Compound-specific stable isotope measurement of individual PLFA were
13 performed using a GC-C-IRMS system (Varian 3400 GC attached to a Finnigan
14 MAT Delta S isotope ratio MS) operating under the following conditions: electron
15 ionisation, 100 eV, 1 mA electron energy, 3 Faraday cup collectors m/z 44, 45 and
16 46, CuO/Pt Finnigan MAT Mark I combustion interface maintained at 940 °C). GC
17 conditions were similar as those described above. Samples were run in duplicate and
18 calibrated against a CO₂ reference, injected directly into the source in the beginning
19 and at the end of every run.

20 Taxonomic groups of microorganisms was interpreted according to PFLA
21 grouping proposed by Frostegård et al. (2011). Basically, branched-chained
22 iso/anteiso fatty acids represent gram positive bacteria, cyclic fatty acids – gram
23 negative bacteria, 10-Me-branched fatty acids – Actinobacteria, acid octadecadienoic
24 (18:2ω6) – Fungi, and saturated fatty acids (16:0, 18:0) as “general”, meaning
25 common among divergent taxa. δ¹³C of taxonomic groups was calculated by
26 weighted average based on the proportion of each specific PLFA in the taxonomic
27 group.

28

29 2.5 Isotopic calculations

30 The fraction of residue derived-C in any OM fraction (f_{OM}) was calculated by

31

$$32 f_{OM} = \frac{\delta^{13}C_f - \delta^{13}C_{ref}}{\delta^{13}C_{res} - \delta^{13}C_{ref}}$$

33

1 where $f = \delta^{13}\text{C}$ of OM fraction one year after beginning the experiment, $res =$
2 average of $\delta^{13}\text{C}$ harvest residue compounds. Specifically, we adopted ref for the
3 POM fraction as the initial $\delta^{13}\text{C}$ of POM (time 0) and for MAOM fraction, ref was
4 the $\delta^{13}\text{C}$ of the MAOM fraction itself from the treatment not amended with residues
5 (-R), in the end of this experiment. This calculation accounted for the transfers
6 occurring from POM to MAOM during the experimental period, which could hide
7 residue contributions.

8 The fraction of residue-derived C incorporated into PLFA of microbial group
9 (f_{MG}) was calculated by

10

$$11 \quad f_{MG} = \frac{\delta^{13}C_{fMB} - \delta^{13}C_{refMB}}{\delta^{13}C_{res} - \delta^{13}C_{refsoil}}$$

12

13 where $f_{MG} = \delta^{13}\text{C}$ of microbial group (PLFA), $ref_{MB} = \delta^{13}\text{C}$ of PLFA in the
14 treatment -R, $res =$ average of $\delta^{13}\text{C}$ harvest residue compounds and $ref_{soil} = \delta^{13}\text{C}$
15 of soil from the treatment -R, in each evaluated time.

16

17 2.6 ANOVA

18 Statistical analyses were performed with GenStat (2013, 16th edition). The
19 assumption of normal distribution of residuals was verified through quantile–quantile
20 plots and Shapiro–Wilk normality test. Box-Cox transformation (log or square root)
21 was applied, when the previous assumption was not met.

22 The turnover rate of residue over the experiment (g day^{-1}) was calculated
23 using the single negative exponential decay function (Olson, 1963):

24 $k = \log_e[\text{remaining mass}/\text{initial mass}]/t$, where t is the time of decomposition.

25 The time needed to lose 50 % of the residue mass (half-life; $t_{0.5}$) was derived
26 using the k constant found in the above equation.

27 A three-way ANOVA was used to test the effect of residue and soil
28 management and N fertilizations on C concentration and on fraction of residue
29 derived-C in each SOM fraction. Changes on C concentrations were assessed by the
30 difference on C in the beginning and at the end of the experiment. ANOVA of
31 differences (Δ) was interpreted according to the observed signal (+ meaning gains
32 and – losses).

1 A repeated measure on time approach was used for analysing the respired C-
 2 CO₂ and δ¹³C-CO₂ and PFLA abundance and δ¹³C-PLFA during the 3 evaluation
 3 periods (3, 6, 12 months).

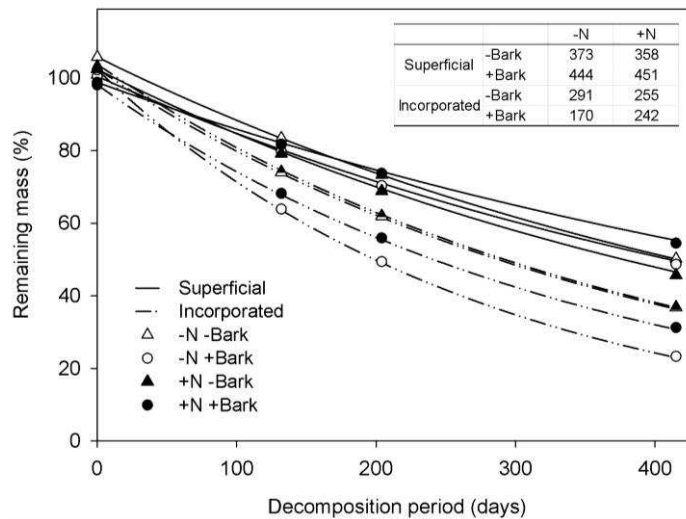
4 Means were compared using Least Significant differences with a confidence
 5 level of P<0.05.

6 3. Results

7 3.1 Residue decomposition

8 Overall, INC reduced for more than 5 months the residue half-life time (t_{0.5})
 9 (P<0.001) (Figure 2). +B slowed down residue decomposition and enhanced the t_{0.5}
 10 of SUP treatments in 81.7 days, but the reverse was found for residue in INC -N
 11 treatments. When +B were incorporated, N fertilization decreased its decomposition
 12 rate and led to increased t_{0.5} (P<0.05).

13



14

15 **Figure 2.** Eucalypt harvest residue decomposition along the decomposition period as
 16 affected by management (Residue left on soil surface or incorporated), bark removal
 17 (-Bark) or bark maintenance (+Bark) and N fertilization (+N) or none N fertilization
 18 (-N). Olson model's was adjusted for the remaining residue mass, and their estimated
 19 half-life time (days) are shown in the table. Least significant difference of means are
 20 18.97, 26.83 and 37.94 days for main factors, double interaction and triple
 21 interaction, respectively (P<0.05).

22

23 3.2 Labile carbon mineralization and δ¹³C-CO₂ efflux

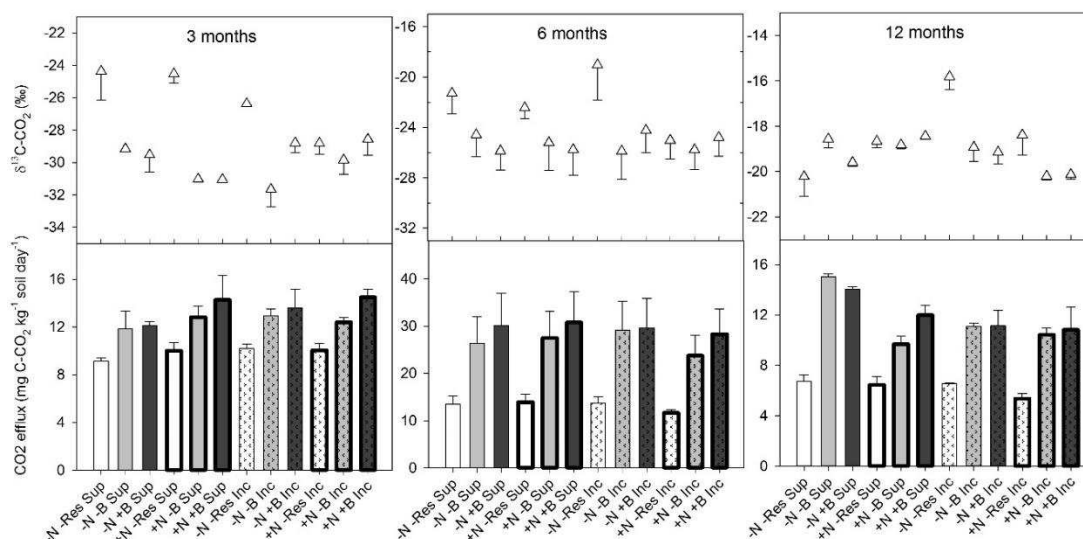
24 Soil incubation and quantification of C-CO₂ evolution was used as a
 25 measuring of soil biota's capacity to degrade the residue and the SOM pools. The
 26 average C-CO₂ respired was significantly greater after 6 months of decomposition
 27 (34.4 mg C-CO₂ kg⁻¹soil day⁻¹) than in the other periods assessed, which had an

1 average of 11 mg C-CO₂ kg⁻¹ soil day⁻¹ (Figure 3). Residue presence increased more
 2 than twofold the C-CO₂ efflux as compared to treatments without residue (9.98 mg
 3 C-CO₂ kg⁻¹soil day⁻¹).

4 +N reduced 15 % C-CO₂ respired of incorporated treatments at 6 months and
 5 20% C-CO₂ respired in superficial treatments at 12 months (P<0.05) (Figure 3). At 6
 6 months, treat +B had 10 % higher emission than -B (40.86 ± 1.14 mg C-CO₂ kg⁻¹
 7 soil day⁻¹). Incorporation effects on respired C-CO₂ were mainly significant at 6
 8 months of decomposition. Incorporation of residues (+B and -B) in +N microplots
 9 reduced C-CO₂ efflux.

10 Over time, δ¹³C-CO₂ became less negative as a result of evolved C-CO₂
 11 becoming significantly more ¹³C enriched (Figure 3). Residue addition on soil caused
 12 an efflux of CO₂ with δ¹³C-CO₂ values more ¹³C depleted. In soils where +B
 13 fertilized was incorporated (-22.2 ± 0.47 ‰) had lower δ¹³C-CO₂ values compared
 14 with superficial ones, at 6 months. On the other hand, incorporation of -B (-24.36 ±
 15 0.86 ‰) unfertilized at 3 months or fertilized at 6 months (-19.38 ± 0.14 ‰) had
 16 lowerδ¹³C-CO₂ values compared with superficial ones.

17



18

19 **Figure 3.** Efflux of respired C-CO₂ and its δ¹³C-CO₂ after 3, 6 and 12 months of
 20 eucalypt harvest residue decomposition. Errors bars represent standard deviation
 21 (n=4). Treatments are showed -N (0 kg ha⁻¹ N), +N (200 kg ha⁻¹N), -Res (without
 22 residue), -B (residue without bark), +B (residue with bark), Sup (residue kept on soil
 23 surface) and Inc (residue incorporated up to 5 cm soil depth).

24

25

1 3.3 PLFA abundance and C input from residue to PFLA

2 PLFA concentration of microbial groups on SUP treatments during the
3 sampling times (3, 6 and 12 months) varied substantially (Figure 4). Overall,
4 [M16:18] concentration was significantly lower in the beginning ($2.19 \pm 0.11 \mu\text{g C g}^{-1}$
5 soil) than on other sampling times.

6 At 3 months, residue addition on +N microplots fertilized plots reduced Gram
7 positive bacteria and Actinobacteria concentration compared with -R treatments
8 ($P < 0.05$). Likewise, Gram negative concentration was significantly lower on
9 treatments with residue ($1.246 \pm 0.529 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil) than on -R treatments ($2.064 \pm$
10 $0.168 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil), but just on unfertilized microplots. In the beginning of this
11 experiment (3 months sampling), no significant differences on microbial
12 concentration caused by bark management was found.

13 At 6 months, G negative bacteria ($1.54 \pm 0.66 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil) had the lowest
14 concentration. Fungi was in less quantity microbial group ($0.084 \pm 0.013 \mu\text{g C g}^{-1}$
15 soil), and Actinobacteria concentration averaged $1.302 \pm 0.36 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil and no
16 significant differences were observed during the experimental period.

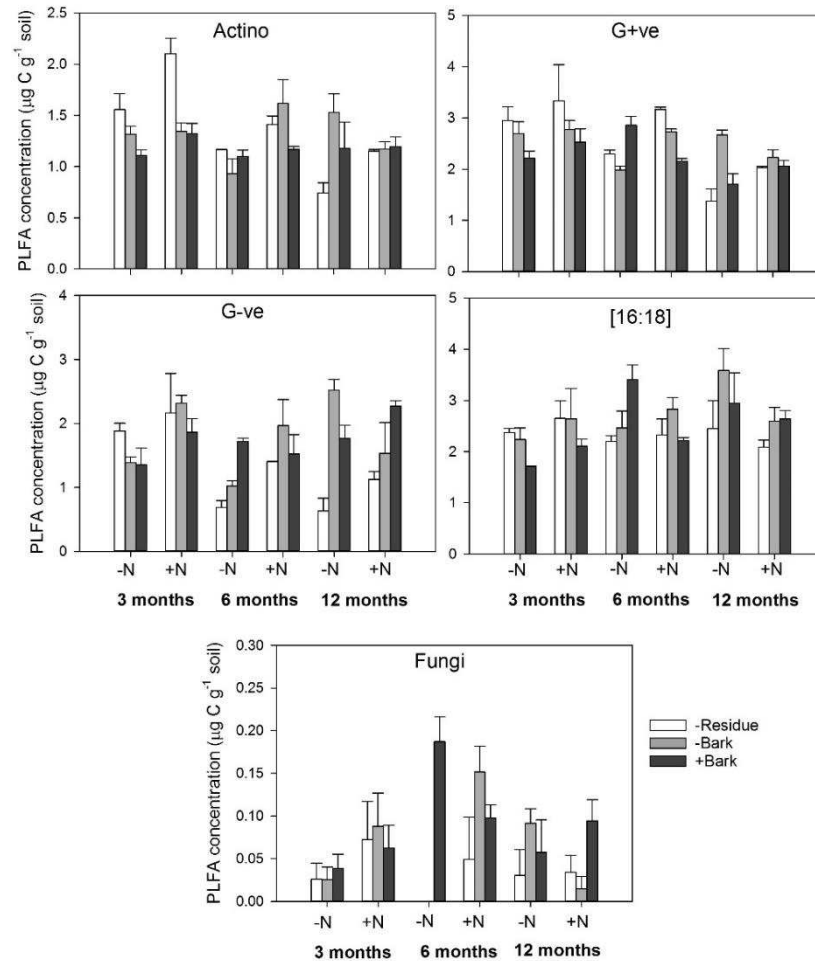
17 At 6 months, the effect of bark maintenance on residue was substantial;
18 Gram positive and Gram negative concentrations increased around 30 and 200 %,
19 respectively, compared with soil from -R treatments, specifically on unfertilized
20 microplots ($P < 0.05$). +B on N fertilized microplots significantly reduced Gram
21 negative, Actinobacteria, and [16:18] concentration in comparison to -B treatments
22 with ($P < 0.05$).

23 At the end of this experiment, nitrogen fertilization decreased 47, 30, 33 and
24 100 % Gram negative ($1.71 \pm 0.61 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil), Actinobacteria ($1.18 \pm 0.04 \mu\text{g C g}^{-1}$
25 soil), [16:18] ($2.49 \pm 0.34 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil) and Fungi concentration, respectively, in the
26 soil from -B treatments. -B treatments there was significantly greater Gram positive,
27 Actinobacteria, and Fungi concentration than those from -R, but this effect occurred
28 just on -N microplots. +B resulted in higher Gram positive ($2.34 \pm 0.09 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil),
29 Fungi ($0.11 \pm 0.03 \mu\text{g C g}^{-1}$ soil) concentrations on N fertilized plots as compared to
30 soil from treatments -R and also with -B. On the other hand, on unfertilized plots +B
31 decreased around 35 % Gram positive, Actinobacteria and [16:18] concentrations if
32 compared to soil from -B.

33 Fraction of C residue incorporated by Gram positive was on average $6.1 \pm$
34 0.32 % and there was a trend for this incorporation being reduced over time (Figure

1 5). The treatments effects in this microbial group were time dependent. +B increased
 2 approximately 4 fold recovered residue derived-C after 6 months of decomposition.
 3 Nitrogen addition resulted on lower C incorporation by Gram positive ($P<0.05$) at
 4 the end of the experimental period (12 months).

5 Incorporation of residue-C by Gram negative was on average 16.65 ± 0.64 %
 6 and did not differ significantly over time (Figure 5). At 6 months, independently of
 7 bark maintenance, N fertilization reduced residue derived-C incorporation by Gram
 8 negative ($P<0.05$). Although, at the end and at the beginning of the experiment, on N
 9 fertilized plots, +B enhanced residue derived C incorporation Gram negative
 10 ($P<0.05$). Soil receiving -B had lower residue derived-C incorporation by Gram
 11 negative on N fertilized microplots than the similar, but unfertilized ones ($P<0.05$).
 12



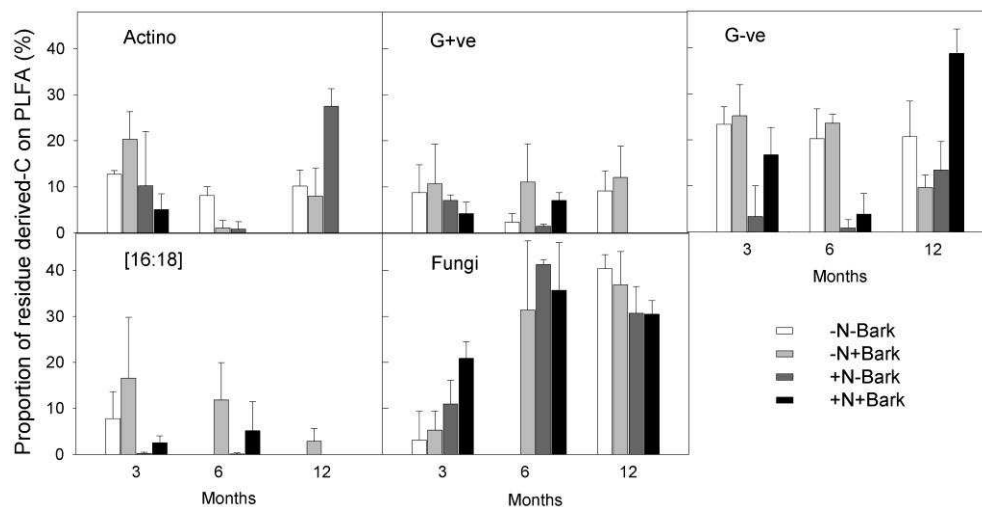
13
 14 **Figure 4.** PLFA concentrations of microbial groups along three distinct periods of
 15 eucalypt harvest residue decomposition. Error bars show the standard error of the
 16 mean (n=4). LSD of double interaction in each evaluated time for Actinobacteria
 17 (Actino) is 0.3506; Gram positive (G+ve) is 0.5660; Gram negative (G-ve) is 0.5943;
 18 [16:18] is 0.6026 and Fungi is 0.055.

1

2 Actinobacteria had the greater incorporation of residue derived-C at the beginning of
3 the experiment (12.09 ± 0.69 %), but the lowest incorporation of residue derived-C
4 after 6 months of decomposition ($P < 0.05$) (Figure 5). N fertilization on soils from +B
5 reduced residue derived-C recovered in the last sampling time period ($P < 0.05$). +B
6 reduced the residue derived-C recovery by Actinobacteria groups on unfertilized
7 plots at 6 months and on fertilized plots at the end of the experimental period.

8 Residue derived-C recovered by Fungi was higher at the end (34.58 ± 1.05
9 %) than at the beginning (10.05 ± 1.39 %) of the decomposition period (Figure 5).
10 +B increased residue derived-C incorporation by this microbial group, mainly at 3
11 and 6 months in soils from unfertilized plots ($P < 0.05$). +N increased residue derived-
12 C incorporation for -B, except at 12 months of decomposition.

13 Incorporation of residue derived-C by [16:18] decreased over time ($P < 0.05$)
14 (Figure 5). In +B (7.37 ± 0.38 %) the recovery was 5 fold that observed in the
15 soil that received -B (1.35 ± 0.15 %). No significant differences were noted between
16 soils from +N and -N microplots.



17

18 **Figure 5.** Proportion of residue derived- C on microbial groups PFLA along the
19 decomposition time (months). Error bars show the standard error of the mean (n=4).
20 LSD of double interaction in each evaluated time for Actinobacteria (Actino) is
21 4.051; Gram positive (G+ve) is 2.090; Gram negative (G-ve) is 2.091; [16:18] is
22 10.56 and Fungi is 2.318.

23

1 3.4 C and N on SOM fractions

2 Differences on C concentration between the end and the beginning of the
3 experiment are showed on Table 2. If the presented values are negative it means that
4 decreasing on C and N concentrations occurred over time.

5 Overall, soils with incorporated residue had higher losses of POM-C and
6 MAOM-C than those where residues were kept on soil surface, except for -B on
7 unfertilized plots (Table 2). The same pattern was observed for N concentration on
8 SOM fractions, although significant effects were mainly observed on +N microplots.

9 Increments on C concentrations with residue addition was greater on MAM
10 fraction and stronger for +B treatments (P<0.05).

11 Overall, soils from the + N microplots had smaller losses of C and N from
12 SOM fractions than - N ones (P<0.05)

13

14 Table 2. Changes on C (ΔC_{1-0}) and N (ΔN_{1-0}) of SOM fractions from the end to the
15 beginning to this experiment.

Treatments	Superficial				Incorporated			
	POM		MAOM		POM		MAOM	
	$\Delta C_{F-I}^{(1)}$	$\Delta N_{F-I}^{(2)}$	$\Delta C_{F-I}^{(3)}$	$\Delta N_{F-I}^{(4)}$	$\Delta C_{F-I}^{(1)}$	$\Delta N_{F-I}^{(2)}$	$\Delta C_{F-I}^{(3)}$	$\Delta N_{F-I}^{(4)}$
-Res	-1.28	-0.14	-7.20	-0.58	-4.39	-0.32	-8.74	-0.79
-N -Bark	-7.52	-0.27	-8.91	-0.55	2.13	0.16	-2.88	-0.28
+Bark	-1.42	-0.36	5.34	0.49	-3.48	-0.34	-7.23	-0.44
-Res	1.89	0.05	-1.26	0.19	-3.66	-0.22	-3.32	-0.52
+N -Bark	0.82	0.23	2.73	0.21	-3.07	-0.01	-2.53	-0.39
+Bark	1.67	0.09	7.34	0.26	3.05	0.10	2.86	-0.07

16 ⁽¹⁾LSD=1.98; ⁽²⁾LSD= 0.135; ⁽³⁾LSD= 2.651; ⁽⁴⁾LSD=0.349

17 3.5 C input from residue to SOM fractions.

18 Overall, $\delta^{13}C$ -MAOM was less ^{13}C depleted at the end of the experiment than
19 in the beginning, but the opposite occurred on POM fraction (Table 3).

20 As a consequence of changes on $\delta^{13}C$ we were able to estimate the
21 contribution of residue C to each SOM fractions. The results highlight the
22 importance of bark retention in the field with other residues. In soil receiving +B it
23 was observed higher residue contribution to POM on -N microplots (P>0.05). There
24 was a trend to enhance the residue derived-C with N fertilization, except when +B
25 was maintained on soil surface. The fraction of residue derived-C observed on

1 MAOM when bark was retained was similar to that in soil treated with -B ($P>0.05$).
 2 Incorporation resulted on greater residue contribution for MAOM on +N fertilized
 3 microplots when eucalyptus residue was kept on soil surface.

4

5 Table 3. Differences on $\delta^{13}\text{C}$ of SOM fractions observed between the end and the
 6 beginning of this experiment ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-I}}$) and the proportion of residue-derived C (f)
 7 presented in each SOM fraction.

	Treatments	Superficial				Incorporated			
		POM		MAOM		POM		MAOM	
		$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-I}(1)}$	f ₍₂₎	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-I}(3)}$	f ₍₄₎	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-I}(1)}$	f ₍₂₎	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-I}(3)}$	f ₍₂₎
-N	-Bark	-2.70	0.21	1.74	0.034	-1.42	0.124	-0.60	0.066
	+Bark	-5.06	0.40	-0.32	0.037	-2.44	0.22	-0.32	0.044
+N	-Bark	-3.99	0.33	1.51	0.002	-2.96	0.27	1.71	0.032
	+Bark	-1.871	0.16	1.07	0.027	-3.189	0.30	1.07	0.045

8 ⁽¹⁾LSD= 1.454; ⁽²⁾LSD= 0.5833 ;⁽³⁾LSD= 1.017; ⁽⁴⁾LSD= 2.750

9 4. Discussion

10 4.1 Residue mineralization

11 Soil management (incorporation or superficial) was the strongest predictor for
 12 the rate of eucalypt harvest residue decomposition, explaining 78 % of variability of
 13 $t_{0.5}$; Residue $t_{0.5}$ was sharply decreased by incorporation (Figure 2). We believe that
 14 such trend could be explained by changes on soil faunal activities, at first. An intense
 15 soil faunal activity, i.e. ants and beetle larvae, in the experimental units could be seen
 16 across decomposition period. Since the beginning of decomposition process,
 17 incorporation reduced the spatial accessibility of decomposers and degradable
 18 residue. As a consequence, incorporation possibly stimulated the soil faunal activity
 19 which accelerated residue fragmentation. Meyer et al. (2011), using a faunal
 20 exclusion approach, found an exceptionally slow decomposition rate (17 %) with
 21 macro-invertebrates exclusion, this effect was stronger for decomposition at 6-12
 22 months. Moreover, incorporation maintains humidity and minimizes water loss from
 23 residue overtime, critical factors for determining organisms of soil community. A
 24 higher humidity content was not only positively correlated with soil microfaunal
 25 abundance (Wu et al., 2014) but also with bacterial biomass concentration (Coulis et
 26 al., 2013). Despite of faunal collaboration to enhance the residue decomposition rate
 27 at the process start, the large biomass and broad range of microbial enzymatic

1 capabilities put bacteria and fungi as key actors on decomposition process. In a
2 faunal exclusion study, it was showed that exclusion of macrofaunal or macro and
3 mesofaunal on *Agrostis capillaris* litter decomposition caused a difference of 4 % on
4 litter mass remaining, at the first month of decomposition (Bradford et al., 2002)

5 Substrate quality index, i.e. C:N and lignin:N ratios, lignin and N content
6 have been used to explain variations on litter decomposition (McClaugherty et
7 al.1985; Bijayalaxmi Devi and Yadava, 2010; Prescott, 2010). Walela et al. (2014)
8 found strong negative correlation between mineralization of C slow pool and
9 lignin:N ratio ($r = -0,54$) and lignin + tannin ($r = -0,59$) of several *Eucalyptus* species
10 litter in a natural forest. In our experiment, the biochemical composition of residues
11 with bark differ substantially from that without bark because bark is characterized
12 by a higher proportion of tannins and polyphenolic compounds on soluble
13 extractives fraction and has higher lignin concentration as well (Lima et al., 2013).
14 This feature could explain the slower decomposition rates for residues kept on soil
15 surface (Figure 2). It is not clear why the same pattern was not observed for the same
16 residues when they were incorporated. Therefore, it is clear that some intrinsic litter
17 characteristics can drive decomposition process, but its persistence in the long term
18 in soils may depend on the interactions with the edaphic conditions. Our reasoning is
19 that surface residues are exposed to more rapid changes in temperature and moisture
20 loss in time in comparison to the incorporated residues. Under moister conditions,
21 the residue chemistry, higher content of secondary metabolites and phenolics found
22 in the bark, may be relatively less important than in drier sites, a hypothesis put
23 forward to explain the gains in SOC in more xeric environments afforested with
24 eucalypt as opposed to losses of SOC under wetter sites previously under grasslands
25 in South America (Berthrong et al., 2012).

26 Knorr et al. (2005) estimated the N effect on litter decomposition over a wide
27 range of climate conditions and vegetation types. This meta-analysis showed that the
28 N effect is positively correlated with mass loss in litter with low lignin content, while
29 negatively correlated with high-lignin litters. However, other factors have been
30 shown to interfere on decomposition patterns over N fertilization, for example, the N
31 level applied (Liu et al., 2010) or decomposition period assessed (Berg, 2014), which
32 leads to inconsistent N effects on litter decomposition rates. We believe that N level
33 in soil-plant system over our experimental period was not a limiting factor to

1 decomposition process given the relatively high SOM content in this soil, but it was
2 an important one on soil microbial dynamics (Figures 3 and 4).

3 4.2 Microbial dynamics over litter decomposition

4 Introduction of a new food web in the grassland fields was expected to
5 change soil microbial composition in the way that organisms physiologically better
6 adapted to the new conditions imposed had competitive advantage upon other
7 groups. But, differences on PLFA concentrations of treatments without residue and
8 with residue should be stronger in the beginning than at the end of the decomposition
9 period. Corroborating this hypothesis, it was found the lowest non-specific PLFA
10 ([16:18]) concentration in the beginning of this experiment (3 months), while at the
11 same time there was lower Gram positive, Actinobacteria and Gram negative
12 concentration in soil with residue addition (Figure 4). According to Veen et al.
13 (2015) soil decomposer communities are close specialized to decompose the litter of
14 a particular plant species and such association can be tightly affected by enhancing
15 the litter-site dissimilarity, for example, when forest-litter is transposed by grassland
16 litter. At the same time, no difference was observed on Fungi concentration with
17 residue addition at three months. Gram positive, Actinobacteria are classified as k-
18 strategists, microorganisms with slow growth rate due of its pattern of energy
19 allocation (Fontaine et al., 2003b). Although fungi delineation as k or r-strategists is
20 still controversial, this group has competitive advantages for using the new C input
21 into the soil, enabled by its enzymatic complex of lignin degradation, i.e. lignin and
22 manganese peroxidases (Singh e Chen, 2008) and laccases (Leonowicz et al., 1999).
23 In a recent study on the effects of land-use change on Pampa Biome, it was shown
24 that eucalypt afforestation had a greater impact on natural soil fungal community
25 (Lupatini et al., 2013). Despite the differences observed in the beginning of the
26 current study, microbial community has been shown to fast acclimate and adaptat to
27 shifts to new conditions (Freschet et al., 2012; Allison et al., 2013). Such capacity
28 can explain why soils with residue addition changed the scenario of lower microbial
29 abundance in the beginning of this experiment for greater concentration of most
30 microbial groups at the end of this experiment (Figure 4).

31 Besides the microbial differences caused by introduction of a new C source,
32 the eucalypt residue quality was also expected to affect soil microbial composition
33 and its dynamics. Although no significant differences on size and structure of the soil

1 microbial community were observed at 3 months (Figure 4), the residue quality
2 controlled microbial dynamic in soil in others periods afterwards.

3 At 6 months, on fertilized microplots bark maintenance decreased Gram
4 positive, Gram negative, [16:18] Actinobacteria concentration in the soil as
5 compared to that without bark. Moreover, in the same microplots the incorporation
6 of C residue by Gram negative, [16:18] and Actinobacteria on treatments with bark
7 was similar to treatments without bark and at the same time, the biggest CO₂
8 emissions were found in the soil with residue without bark. Such evidences pointed
9 out that bark maintenance on fertilized plots resulted in lower efficiency of C residue
10 utilization (CUE) at this time. Previous studies showed that enlarged C:N ratios
11 resulted in lower CUE of microbial decomposer (Manzoni et al., 2008) and
12 differences in stoichiometry of microbial biomass stoichiometry, C demand and CUE
13 are linked to define broader patterns of microbial distribution in the environment
14 (Keiblinger et al., 2010). Therefore, differences on C:N ratio on treatments with bark
15 that added on soil additional 10 Mg C ha⁻¹ than in treatment without bark, perhaps
16 help explaining the results founded for the soil of N fertilized microplots. However,
17 such effect only explains partially the results of our study because on unfertilized
18 plots we found higher CUE by Fungi and Gram negative in soils that received
19 residue with bark. Gram negative groups are classified as r-strategists, with faster
20 growth rate and higher N demand to support its energetic expenses of cycling rates.
21 Nevertheless, the greater CUE by Gram negative on treatments with lower N
22 availability can also be explained by changes on microbial turnover rates in order to
23 overcome imbalances on N resource and microbial biomass composition (Kaiser et
24 al. 2014).

25 At 12 months, bark maintenance on residue reduced CUE of [16:18],
26 Actinobacteria and Gram positive, but contrasting with the results at 6 months, such
27 reduction occurred on unfertilized plots. So, N seems to be a limiting nutrient on
28 decomposition of soils amended with residues without bark at 6 months. This was a
29 colder and more humid month. As a consequence of climatic conditions, probably
30 microorganism had the lowest activity at 6 months and higher N availability could
31 stimulate microbial growth rate. As decomposition process developed, more N could
32 be available for microorganism at 12 months. Therefore, differences on microbial
33 CUE among treatment with bark and without bark could be limited by the low
34 availability of nutrients other than N. In fact, Ferreira (2012) noted that eucalypt

1 residue decomposition in different sites in Brazil present significant rates of Calcium
2 (Ca) and Sulfur (S) net immobilization in the first years of harvest residue
3 decomposition. Taken together these findings seem to indicate that temporary Ca and
4 S deficiencies should also be a constraint for microbial activity by the end of our
5 experiment.

6 At the end of this experiment, Fungi and Gram negative had higher CUE in
7 treatments with bark than in those without bark and they were the most important
8 groups to decompose eucalypt residue (Figure 4). Surprisingly, treatments with bark
9 increased the proportion of residue derived-C by Gram negative over time. The
10 slower decomposition rate (Figure 1) and higher C and nutrients availability in soils
11 treated with eucalypt bark residue especially Ca (Hernández et al., 2009) could
12 support Gram negative activity and reduce competition for resources with other
13 microbial groups during longer periods of decomposition.

14 4.3 Soil C concentration and contribution of residue derived-C to SOM fractions

15 After one year of residue decomposition, the proportions of residue derived-C
16 on MAOM fraction were lower than found in other Eucalyptus plantation of Brazil
17 (Souza, 2012). Such proportions were up to 4 fold smaller in treatments without bark
18 than those found in soils from other eucalypt forest sites in Brazil.

19 Incorporation of eucalypt harvest residues emerges an apparent paradox, once
20 it had highest C residue recovery in the MAOM (Table 3) and lower C concentration
21 in this fraction (Table 2). The literature abounds with studies indicating that plowing
22 or other more intense soil tillage practices reduce SOM and increase the transfer of C
23 from soils to the atmosphere as CO₂ (Ruan and Robertson, 2013; Silva-Olaya et al.,
24 2013). The negative effect has been related with a consequence of soil aggregates
25 disruption and reduction on physical and chemical protection of organic compounds
26 (O'Brien e Jastrow, 2013). However, impact intensity of soil tillage on reducing the
27 soil C sequestration strongly depends on soil type and climate conditions (Powlson et
28 al., 2011). We must point out that our residue incorporation treatment differs from
29 soil tillage studies. Firstly, our incorporated treatment simulates a light residue
30 incorporation that occurs during mechanized log harvest and site preparation for new
31 rotation planting at every 5 to 7 years. Secondly, the soil disturbance was executed
32 manually and only once, so aggregate disruptions and destabilization of physically-

1 protected SOM is minimized in comparison to the more common for raising crops,
2 machine intensive soil tillage.

3 Maintenance of bark on residue raised C concentration of more stable fraction
4 of SOM (Table 3). In addition to the greater quantity of C added on soil in treatments
5 with bark than without bark, which might counteract carbon lost via decomposition,
6 leaching and to contribute for SOM improvement, residue quality could be an
7 important factor for soil C stabilization. According to Cotrufo et al. (2013) microbial
8 processing during residue decomposition forms more dissolved organic matter,
9 carbohydrates and peptides in litter with high quality than low-quality as a
10 consequence more stable organic matter can accumulate in soil under such
11 conditions. At the same time, previous studies had pointed to the importance of plant
12 residue biochemistry for promoting the sequestration of C in soil (Martens, 2000), at
13 least in the short-term (Gentile et al., 2011). Specifically for eucalypt residues, bark
14 is a Calcium-rich plant component (Viera et al., 2015) and it may slowly release Ca
15 to soil solution, which in turn improves soil aggregation and formation of bridges
16 between organic compounds and soil mineral to form more stable and less accessible
17 SOM-mineral complexes (Muneer and Oades, 1989). Besides, the residue quality
18 being a main factor for C stabilization on soil in the current study, bark provided a
19 greater incorporation of C residue by Fungi and G-ve than in other microbial groups.
20 Whether the source of microbial C has large effects on soil organic matter stabilization
21 on eucalyptus forests remains to be determined and should be further evaluated.

22 SOM accumulation was noted mainly on treatments with bark and N
23 fertilization (Table 3). However, $\delta^{13}\text{C}$ of SOM (Table 4) in these treatments showed
24 higher proportion of C from C4 plants on stable MAOM fraction. Nitrogen additions
25 on forest and grassland site has been shown to stimulate C and P acquiring enzymes
26 (Keeler et al., 2009). In our experiment, no change on litter decomposition was
27 caused by N fertilization (Figure 1) which implies that it is unlikely that N
28 fertilization altered enzymes activities. As C transformations among POM and
29 MAOM was possible to occur during the experimental period and N might be
30 incorporated on aromatic structures through abiotic reaction, increasing C residence
31 time (Olk et al., 2006; Gillespie et al., 2014). Indeed, conditions with greater plant-
32 derived phenolic C availability and N fertilization have been shown to be more
33 effective in soil C stabilization (Dijkstra et al., 2004) and such interactions may
34 explain the effects of N in our experiment. Additionally, our experimental site is

1 located on a silt-clay-loam soil, where the interaction of organic compounds with
2 mineral surfaces may be potentially favorable to C stabilization (Sausen et al., 2014).
3 The stabilization is more effective in soils where short-range low crystallinity
4 mineral offer more reactive surfaces for plant or microbial derived compounds to
5 react with (Tahymuang et al., 2013; Sanderman et al., 2014). The existence of such
6 minerals in less weathered soils cultivated with eucalypt in Southern Brazil (Melo et
7 al. 2002) opens the possibility for such interactions and stabilization mechanisms
8 take place and minimize SOM losses.

9 5. Conclusions

10 Given the importance of eucalypt harvest residue for supplying nutrients and
11 to sustain tree growth, our results provide data to understand how microbial
12 communities respond to residue addition in varying residue and soil management and
13 N fertilization, and how such answers may alter soil C cycling. Our results suggest
14 that adoption of incorporation accelerate residue decomposition rate and soil C
15 losses. On the other hand, residue maintenance on soil surface decrease mass loss
16 rate and its effects on soil C cycling are dependent on residue quality. Low quality
17 residue, through bark maintenance on field, reduces by 20% residue decomposition
18 rate, enhances concentration and proportion of residue-derived C incorporation by G-
19 ve and Fungal communities' over time and increases C concentration on a more
20 stable fraction of SOM.

21 Furthermore our data suggest that association of N fertilizations and bark
22 maintenance does not alter residue decomposition rate, but tightly enhance positive
23 scenario of C stabilization and it enables to offset the negative effects of
24 incorporation on more stable fraction of SOM. Until one year of decomposition,
25 Fungi and Gram negative were the main microbial group decomposer, especially in
26 treatments with bark maintenance on residue.

27

28 6. References

- 29 Allison SD, Lu Y, Weihe C, Goulden ML, Martiny AC, Treseder KK, Martiny JBH.
30 Microbial abundance and composition influence litter decomposition response to
31 environmental change. *Ecology*. 2013;94:714–725.
32 Berg B. Decomposition patterns for foliar litter - A theory for influencing factors.
33 *Soil Biol Biochem*. 2014;78:222–232.
34 Berg B. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils.
35 *2000;133:13–22*.

- 1 Berthrong ST, Piñeiro G, Jobbágy EG, Jackson RB. Soil C and N changes with
2 afforestation of grasslands across gradients of precipitation and plantation age.
3 *Ecol Appl.* 2012;22:76–86.
- 4 Bijayalaxmi Devi N, Yadava PS. Influence of climate and litter quality on litter
5 decomposition and nutrient release in sub-tropical forest of Northeast India. *J For*
6 *Res.* 2010;21:143–150.
- 7 Bonan GB. Forests and Climate Change : Climate Benefits of Forests. *Science* (80-).
8 2008;320:1444–1450.
- 9 Bradford M a., Tordoff GM, Eggers T, Jones TH, Newington JE. Microbiota, fauna,
10 and mesh size interactions in litter decomposition. *Oikos.* 2002;99:317–323.
- 11 Cambardella C a., Elliott ET. Particulate Soil Organic-Matter Changes across a
12 Grassland Cultivation Sequence. *Soil Sci Soc Am J.* 1992;56:777.
- 13 Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E. The Microbial Efficiency-
14 Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition
15 with soil organic matter stabilization: Do labile plant inputs form stable soil
16 organic matter? *Glob Chang Biol.* 2013;19:988–995.
- 17 Coulis M, Hättenschwiler S, Fromin N, David JF. Macroarthropod-microorganism
18 interactions during the decomposition of Mediterranean shrub litter at different
19 moisture levels. *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2013;64:114–121.
- 20 Cuchietti A, Marcotti E, Gurvich DE, Cingolani a. M, Pérez Harguindeguy N. Leaf
21 litter mixtures and neighbour effects: Low-nitrogen and high-lignin species
22 increase decomposition rate of high-nitrogen and low-lignin neighbours. *Appl*
23 *Soil Ecol.* Elsevier B.V.; 2014;82:44–51.
- 24 Deacon LJ, Janie Pryce-Miller E, Frankland JC, Bainbridge BW, Moore PD,
25 Robinson CH. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil.
26 *Soil Biol Biochem.* 2006;38:7–20.
- 27 Dijkstra F a., Hobbie SE, Knops JMH, Reich PB. Nitrogen deposition and plant
28 species interact to influence soil carbon stabilization. *Ecol Lett.* 2004;7:1192–
29 1198.
- 30 du Toit B, Smith CW, Little KM, Boreham G, Pallett RN. Intensive, site-specific
31 silviculture: Manipulating resource availability at establishment for improved
32 stand productivity. A review of South African research. *For Ecol Manage.*
33 Elsevier B.V.; 2010;259:1836–1845.
- 34 Dungait JAJ, Kemmitt SJ, Michallon L, Guo S, Wen Q, Brookes PC, Evershed RP.
35 The variable response of soil microorganisms to trace concentrations of low
36 molecular weight organic substrates of increasing complexity. *Soil Biol Biochem.*
37 Elsevier Ltd; 2013;64:57–64.
- 38 Ferreira G. Resíduos da colheita de Eucalipto: ciclagem de nutrientes e uso da
39 espectroscopia do infravermelho próximo para a predição da composição química.
40 Tese Mestado, Univ. Fed. Viçosa. 2012.
- 41 Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L. The priming effect of organic matter: a question
42 of microbial competition? *Soil Biol Biochem.* 2003;35:837–843.

- 1 Freschet T, Aerts R, Cornelissen JHC. Multiple mechanisms for trait effects on litter
2 decomposition : moving beyond home-field advantage with a new hypothesis. *J*
3 *Ecol.* 2012;100:619–630.
- 4 Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Use and misuse of PLFA measurements in soils.
5 *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2011;43:1621–1625.
- 6 Geisseler D, Horwath WR. Relationship between carbon and nitrogen availability
7 and extracellular enzyme activities in soil. *Pedobiologia (Jena).* Elsevier;
8 2009;53:87–98.
- 9 Gentile R, Vanlauwe B, Six J. Litter quality impacts short- but not long-term soil
10 carbon dynamics in soil aggregate fractions. *Ecol Appl.* 2011;21:695–703.
- 11 Gillespie AW, Diochon A, Ma BL, Morrison MJ, Kellman L, Walley FL, Regier TZ,
12 Chevrier D, Dynes JJ, Gregorich EG. Nitrogen input quality changes the
13 biochemical composition of soil organic matter stabilized in the fine fraction: A
14 long-term study. *Biogeochemistry.* 2014;117:337–350.
- 15 Glaser B. Compound-specific stable-isotope (¹³C) analysis in soil science. *J Plant*
16 *Nutr Soil Sci.* 2005;168:633–648.
- 17 Grandy AS, Neff JC. Molecular C dynamics downstream: The biochemical
18 decomposition sequence and its impact on soil organic matter structure and
19 function. *Sci Total Environ.* 2008;404:297–307.
- 20 Hernández J, Pino A del, Salvo L, Arrarte G. Nutrient export and harvest residue
21 decomposition patterns of a *Eucalyptus dunnii* Maiden plantation in temperate
22 climate of Uruguay. *For Ecol Manage.* 2009;258:92–99.
- 23 Högberg MN, Högberg P, Myrold DD. Is microbial community composition in
24 boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three?
25 *Oecologia.* 2007;150:590–601.
- 26 Huang Z, Clinton PW, Baisden WT, Davis MR. Long-term nitrogen additions
27 increased surface soil carbon concentration in a forest plantation despite elevated
28 decomposition. *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2011;43:302–307.
- 29 Kaiser C, Franklin O, Dieckmann U, Richter A. Microbial community dynamics
30 alleviate stoichiometric constraints during litter decay. *Ecol Lett.* 2014;17:680–
31 690.
- 32 Keeler BL, Hobbie SE, Kellogg LE. Effects of long-term nitrogen addition on
33 microbial enzyme activity in eight forested and grassland sites: implications for
34 litter and soil organic matter decomposition. *Ecosystems.* 2009;12:1–15.
- 35 Keiblinger KM, Hall EK, Wanek W, Szukics U, Hämmerle I, Ellersdorfer G, Böck
36 S, Strauss J, Sterflinger K, Richter A, Zechmeister-Boltenstern S. The effect of
37 resource quantity and resource stoichiometry on microbial carbon-use-efficiency.
38 *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;73:430–440.
- 39 Knorr M, Frey SDS, Curtis PS. Nitrogen additions and litter decomposition: A meta-
40 analysis. *Ecology.* 2005;86:3252–3257.
- 41 Leifeld J, Kögel-Knabner I. Soil organic matter fractions as early indicators for
42 carbon stock changes under different land-use? *Geoderma.* 2005;124:143–155.

1 Leonowicz a, Matuszewska a, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtaś-Wasilewska M,
2 Cho NS, Hofrichter M, Rogalski J. Biodegradation of lignin by white rot fungi.
3 *Fungal Genet Biol.* 1999;27:175–185.

4 Lima M a, Lavorente GB, da Silva HK, Bragatto J, Rezende C a, Bernardinelli OD,
5 Deazevedo ER, Gomez LD, McQueen-Mason SJ, Labate C a, Polikarpov I.
6 Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic
7 digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable
8 sugars for biofuel production - part 1. *Biotechnol Biofuels.* 2013;6:75.

9 Liu P, Huang J, Sun OJ, Han X. Litter decomposition and nutrient release as affected
10 by soil nitrogen availability and litter quality in a semiarid grassland ecosystem.
11 *Oecologia.* 2010;162:771–80.

12 Lucas RW, Casper BB, Jackson JK, Balsler TC. Soil microbial communities and
13 extracellular enzyme activity in the New Jersey Pinelands. *Soil Biol Biochem.*
14 2007;39:2508–2519.

15 Lupatini M, Jacques RJS, Antonioli ZI, Suleiman AKA, Fulthorpe RR, Roesch
16 LFW. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal
17 communities in the Pampa biome. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29:223–
18 33.

19 Lützw M V., Kögel-Knabner I, Ekschmitt K, Matzner E, Guggenberger G,
20 Marschner B, Flessa H. Stabilization of organic matter in temperate soils:
21 Mechanisms and their relevance under different soil conditions - A review. *Eur J*
22 *Soil Sci.* 2006;57:426–445.

23 Manning P, Saunders M, Bardgett RD, Bonkowski M, Bradford A, Ellis RJ,
24 Kandeler E, Marhan S, Tscherko D. Direct and indirect effects of nitrogen
25 deposition on litter decomposition. *Soil Biol Biochem.* 2008;40:688–698.

26 Manzoni S, Jackson RB, Trofymow J a, Porporato A. The global stoichiometry of
27 litter nitrogen mineralization. *Science.* 2008;321:684–686.

28 Martens D a. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon
29 sequestration. *Soil Biol Biochem.* 2000;32:361–369.

30 McLaugherty C. A., Pastor J, Aber J. D. Forest Litter Decomposition in Relation to
31 Soil Nitrogen Dynamics and Litter Quality. *Ecol Soc Am.* 1985;66:266–275.

32 Meyer WM, Ostertag R, Cowie RH. Macro-invertebrates accelerate litter
33 decomposition and nutrient release in a Hawaiian rainforest. *Soil Biol Biochem.*
34 Elsevier Ltd; 2011;43:206–211.

35 Michel K, Matzner E. Response of enzyme activities to nitrogen addition in forest
36 floors of different C-to-N ratios. *Biol Fertil Soils.* 2003;38:102–109.

37 Neff JC, Townsend AR, Gleixner G, Lehman SJ, Turnbull J, Bowman WD. Variable
38 effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature.*
39 2002;419:915–917.

40 O'Brien SL, Jastrow JD. Physical and chemical protection in hierarchical soil
41 aggregates regulates soil carbon and nitrogen recovery in restored perennial
42 grasslands. *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2013;61:1–13.

- 1 Olk DC, Cassman KG, Schmidt-Rohr K, Anders MM, Mao JD, Deenik JL. Chemical
2 stabilization of soil organic nitrogen by phenolic lignin residues in anaerobic
3 agroecosystems. *Soil Biol Biochem.* 2006;38:3303–3312.
- 4 Overbeck G, Muller S, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar V, Blanco C, Boldrini I, Both
5 R, Forneck E. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspect*
6 *Plant Ecol Evol Syst.* 2007;9:101–116.
- 7 Paes FA, Lima AMN, Hakamada RE, Barros NF De. Impacto do manejo dos
8 resíduos da colheita, do preparo do solo e da adubação na produtividade de
9 eucalipto. *Rev Bras Cienc do Solo.* 2013;37:1081–1090.
- 10 Powlson DS, Whitmore AP, Goulding KWT. Soil carbon sequestration to mitigate
11 climate change : a critical re-examination to identify the true and the false. *Eur J*
12 *Soil Sci.* 2011;62:42–55.
- 13 Prescott CE. Litter decomposition: what controls it and how can we alter it to
14 sequester more carbon in forest soils? *Biogeochemistry.* 2010;101:133–149.
- 15 Puttaso A, Vityakon P, Saenjan P, Trelo-ges V, Cadisch G. Relationship between
16 residue quality, decomposition patterns, and soil organic matter accumulation in a
17 tropical sandy soil after 13 years. *Nutr Cycl Agroecosystems.* 2011;89:159–174.
- 18 Ros M, Klammer S, Knapp B, Aichberger K, Insam H. Long-term effects of compost
19 amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity.
20 *Soil Use Manag.* 2006;22:209–218.
- 21 Ruan L, Robertson PG. Initial nitrous oxide , carbon dioxide, and methane costs of
22 converting conservation reserve program grassland to row crops under no-till vs .
23 conventional tillage. *Glob Chang Biol.* 2013;19:2478–2489.
- 24 Rubino M, Dungait J a J, Evershed RP, Bertolini T, De Angelis P, D'Onofrio a.,
25 Lagomarsino a., Lubritto C, Merola a., Terrasi F, Cotrufo MF. Carbon input
26 belowground is the major C flux contributing to leaf litter mass loss: Evidences
27 from a ¹³C labelled-leaf litter experiment. *Soil Biol Biochem.* 2010;42:1009–
28 1016.
- 29 Ruiz HA. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da
30 coleta de suspensão (silte+argila). *Rev Bras Cienc do Solo.* 2005;29:297–300.
- 31 Sanderman J, Maddern T, Baldock J. Similar composition but differential stability of
32 mineral retained organic matter across four classes of clay minerals.
33 *Biogeochemistry.* 2014;121:409–424.
- 34 Santo AV De, Marco A De, Fierro A, Berg B, Rutigliano FA. Factors regulating
35 litter mass loss and lignin degradation in late decomposition stages. *Plant Soil.*
36 2009;318:217–228.
- 37 Sausen TL, Schaefer GFDP, Tomazi M, Santos LS dos, Bayer C, Rosa LMG. Clay
38 content drives carbon stocks in soils under a plantation of *Eucalyptus saligna*
39 Labill . in southern Brazil. *Acta Bot Brasilica.* 2014;28:266–273.
- 40 Silva-Olaya A., Cerri CEP, La SJN, Dias CTS, Cerri CC. Carbon dioxide emissions
41 under different soil tillage systems in mechanically harvested sugarcane. *Environ*
42 *Res Lett.* 2013;8:1–8.

- 1 Singh D, Chen S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions
2 for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.*
3 2008;81:399–417.
- 4 Sinsabaugh RL. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil.
5 *Soil Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2010;42:391–404.
- 6 Souza IF. Decomposição de resíduos da colheita e transferência de carbono para o
7 solo em plantações de eucalipto. Tese Mestrado, Univ. Fed. Viçosa. 2012. p. 70p.
- 8 Treseder KK, Balser TC, Bradford M a., Brodie EL, Dubinsky E a., Eviner VT,
9 Hofmockel KS, Lennon JT, Levine UY, MacGregor BJ, Pett-Ridge J, Waldrop
10 MP. Integrating microbial ecology into ecosystem models: Challenges and
11 priorities. *Biogeochemistry.* 2012;109:7–18.
- 12 Versini A, Zeller B, Derrien D, Mazoumbou JC, Mareschal L, Saint-André L,
13 Ranger J, Laclau JP. The role of harvest residues to sustain tree growth and soil
14 nitrogen stocks in a tropical Eucalyptus plantation. *Plant Soil.* 2013;376:245–260.
- 15 Viera M, Schumacher MV, Trüby P, Araújo EF. Implicações nutricionais com base
16 em diferentes intensidades de colheita da biomassa de *Eucalyptus urophylla* x
17 *Eucalyptus globulus*. *Ciência Rural.* 2015;45:432–439.
- 18 Walela C, Daniel H, Wilson B, Lockwood P, Cowie A, Harden S. The initial lignin:
19 Nitrogen ratio of litter from above and below ground sources strongly and
20 negatively influenced decay rates of slowly decomposing litter carbon pools. *Soil*
21 *Biol Biochem.* Elsevier Ltd; 2014;77:268–275.
- 22 Walkley A, Black IA. An examination of Degtjareff method for determining soil
23 organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method.
24 *Soil Sci.* 1934;37:29-38.
- 25 Werth M, Subbotina I, Kuzyakov Y. Three-source partitioning of CO₂ efflux from
26 soil planted with maize by ¹³C natural abundance fails due to inactive microbial
27 biomass. *Soil Biol Biochem.* 2006;38:2772–2781.
- 28 Wu P, Liu X, Liu S, Wang J, Wang Y. Composition and spatio-temporal variation of
29 soil microarthropods in the biodiversity hotspot of northern Hengduan Mountains
30 , China. *Eur J Soil Biol.* Elsevier Masson SAS; 2014;62:30–38.
- 31
32
33
34
35
36
37
38
39

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de uma floresta de implantação, espera-se que os dados observados neste trabalho possam direcionar práticas de manejo a fim de obter uma maior sustentabilidade deste sistema de produção.

A introdução de plantios de eucalipto no Bioma Pampa mostrou grande potencial para redução da emissão de CO₂ do solo, pelo menos até 29 meses de idade do plantio. A determinação da concentração de CO₂ nas camadas do solo permitiu entender a participação de cada camada para os fluxos observados. Se esta concentração for avaliada conjuntamente com dados da biomassa radicular deste experimento, poderá indicar as alterações na dinâmica do CO₂ em decorrência da substituição da vegetação. Ao mesmo tempo, a quantificação dos teores de C nas frações da MOS também dará um maior suporte para entender as variações dos fluxos de CO₂ observadas.

Em relação às emissões de CH₄, embora não tenham sido observadas diferenças em consequência da substituição do Pampa para florestas de eucalipto, essa dinâmica pode ser alterada ao longo do crescimento do plantio, em função do maior aporte de serapilheira ao solo. Portanto, é primordial a avaliação destes fluxos ao longo do crescimento da floresta.

Os estoques de C do solo no plantio de eucalipto tende a ser aumentado com a manutenção na área dos resíduos da colheita, especialmente quando a casca é mantida em campo e acompanhada de adubação nitrogenada. Independentemente do manejo do resíduo adotado, práticas de revolvimento e incorporação dos resíduos ao solo reduzem os estoques da MOS e aumentam a taxa de mineralização dos resíduos. Possivelmente, a adoção desta prática reduz o potencial de mitigação dos GEE destes solos.