



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**BIOCARVÃO COMO CONDICIONADOR DA
FERTILIDADE E DA MICROBIOTA DE SOLO DE
CERRADO CULTIVADO COM SOJA**

JANNE LOUIZE SOUSA SANTOS

Orientadora:
Dr^a. Beáta Emöke Madari

Novembro - 2013

JANNE LOUIZE SOUSA SANTOS

**BIOCARVÃO COMO CONDICIONADOR DA FERTILIDADE E DA
MICROBIOTA DE SOLO DE CERRADO CULTIVADO COM SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia, área de concentração: Solo e Água.

Orientadora:

Dr^a. Beata Eموke Madari

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

Goiânia, GO - Brasil
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Santos, Janne Louize Sousa.
S237b Biocarvão como condicionador da fertilidade e da microbiota de solo de Cerrado cultivado com soja [manuscrito] / Janne Louize Sousa Santos. - 2013.
102 f. : figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beáta Emöke Madari;
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai.

Tese (Doutorado) ã Universidade Federal de Goiás,
Escola de Agronomia, 2013.
Bibliografia.

1. Diversidade microbiana ã Cerrado. 2. Solo rizosférico ã Cerrado. 3. Solo ã Matéria orgânica. I.

CDU: 579.24(213.57)

JANNE LOUIZE SOUSA SANTOS

Biocarvão como Condicionador da Fertilidade e da Microbiota de Solo de Cerrado Cultivado com Soja.

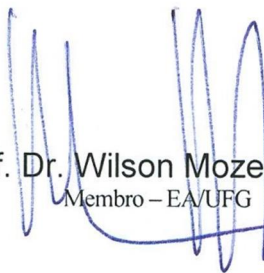
Tese DEFENDIDA em 11 de novembro de 2013, e APROVADA pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Dr^a. Beáta Emoke Madari
Presidente da Banca – Embrapa Arroz e Feijão



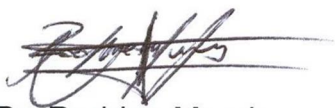
Prof^a. Dr^a. Sui Mui Tsai
Membro – CENA/USP



Prof. Dr. Wilson Mozena Leandro
Membro – EA/UFG



Prof. Dr. Cícero Célio de Figueiredo
Membro - UnB



Dr. Rodrigo Mendes
Membro – Embrapa Meio Ambiente



Dr. Enderson Petrólio de Brito Ferreira
Membro – Embrapa Arroz e Feijão

Aos meus pais,

Caracilio Almeida Santos e

Antônia de Sousa Santos,

À minha irmã

Claudia Sousa Santos

Dedico

Àos meus avós paternos (*In Memoriam*)

Zenóbia de Almeida Santos

Luiz de Oliveira Santos

Àos meus avós maternos (*In Memoriam*)

Virgilina Pereira de Sousa

João Brigído de Argôlo

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar e conduzir meu caminho frente ao desafio de concluir esse trabalho. Por me inspirar nos momentos difíceis e manter minhas forças na caminhada.

Ao meu pai Caracilio Almeida Santos e minha mãe Antônia de Sousa Santos, por todo amor, compreensão e apoio durante toda a minha vida acadêmica.

Ao Valdemar Onofre, Marcilene Pereira, Hiugo Onofre e Daniel Santos pelo auxílio, companhia e paciência na finalização da Tese.

À minha coorientadora, Prof.^a e Dr.^a. Siu Mui Tsai por todo o apoio, incentivo, confiança e ajuda no desenvolvimento da pesquisa. À minha orientadora Dr.^a. Beáta Emokë Madari, pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento da Tese.

Ao Welinton, secretário da Pós-Graduação, pela atenção e auxílio em todos os momentos que foram precisos. Aos professores que complementaram meus conhecimentos a fim de concluir essa Tese.

A todos que me ajudaram e me apoiaram no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear em Agricultura, USP: Acássio Navarrete, Andressa Venturini, Bianca Furlan, Caio Augusto Yoshiura, Danielle Caldas, Enéas Kozen, Fabiana Cannavan, Felipe Campana, Fernanda Mandro, Fernanda Nakamura, Gustavo Henrique Recchia, Helena Suleiman, Lilian Foltran, Lina Wong, Lucas Willian Mendes, Maju Brossi, Marcela Arnaldo, Marília Reichert, Naissa Silvestre e Rosineide Souza. Aos técnicos: Wagner Piccinini, no imprescindível apoio da coleta de campo e no laboratório; ao Francisco Carlos Montrazi (*In memoriam*), que iremos guardar na memória sua dedicação; ao José Elias Gomes e ao Fábio Duarte com o auxílio imprescindível nos procedimentos de laboratório.

À Ana Camila Pereira Messetti, do Laboratório de Biologia Molecular, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Unicamp), pelo auxílio e ajuda nas análises.

Aos grandes amigos que ganhei durante a condução desse trabalho: Bia Ferrari, Clovis Daniel Borges, Fernanda Appel Miller e à amiga de sempre Adriana Rodolfo da Costa.

Ao Fabiano Petter que iniciou este experimento ao qual pude dar continuidade. Ao Dr. Murillo Lobo Junior que também auxiliou a condução dos estudos.

Ao meu orientador no Doutorado Sanduiche na Universidade de Wageningen, Holanda, Prof. Dr. Jos Raaijmakers, Laboratório de Fitopatologia (Ecologia e Genômica Bacteriana) e à Viviane Cordovez, pela imprescindível oportunidade, apoio, auxílio e recepção na condução dos trabalhos. Ao Victor Carryon, Chunchu Song, Ruth Gomes Exposito, Christine, Emilie Chapelle e Xu Cheng pela recepção e auxílio nos trabalhos dentro do laboratório. Ao Rodrigo Mendes, pelo auxílio e ajuda nas análises e no estágio de doutorado sanduiche.

À Vanja Viana, Kássia, Watanabe, à Marcia Thais e ao José pelos inesquecíveis momentos que compartilhamos em Wageningen. Ao pessoal do apoio e aos estagiários da Embrapa Arroz e Feijão.

Ao CNPq e à CAPES pela bolsa de estudos concedida, à Universidade Federal de Goiás, pelo Programa de Pós-Graduação e à Embrapa Arroz e Feijão, por me possibilitarem o desenvolvimento desse trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos e à aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO.....	13
2.2 BIOCARVÃO COMO CONDICIONADOR DO SOLO.....	16
2.3 FERTILIDADE DO SOLO COM BIOCARVÃO.....	19
2.4 DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO COM BIOCARVÃO.....	21
2.5 COMUNIDADES DE BACTERIA EM SOLO COM BIOCARVÃO.....	22
2.6 COMUNIDADES DE ARCHAEA NO SOLO COM BIOCARVÃO.....	24
2.7 COMUNIDADES DE FUNGO EM SOLO COM BIOCARVÃO.....	25
2.8 REFERÊNCIAS.....	27
2.9 HIPÓTESES FORMULADAS.....	33
 3 FERTILIDADE E MICROBIOLOGIA DE UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO DO CERRADO TRATADO COM BIOCARVÃO E SUA IMPLICAÇÃO PARA A PRODUTIVIDADE	
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	34
3.1 INTRODUÇÃO.....	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.2.1 Condições experimentais.....	37
3.2.2 Fertilidade do solo.....	40
3.2.3 Biomassa microbiana do solo.....	40
3.2.4 Análises físicas do solo.....	40
3.2.5 Produtividade	41
3.2.6 Análises Estatísticas.....	41
3.2.6.1 Análise de correlações canônicas.....	41
3.2.6.2 Regressão linear múltipla.....	42
3.2.6.3 Análise de variância.....	42
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
3.3.1 Análise de correlação canônica.....	42
3.3.1.1 Fertilidade do solo.....	44

3.3.1.2	Biomassa microbiana do solo.....	49
3.3.2	Regressão linear múltipla para produtividade.....	51
3.4	CONCLUSÕES.....	54
3.5	REFERÊNCIAS.....	54
4	COMUNIDADES DE BACTERIA, ARCHAEA E FUNGO EM UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO DO CERRADO TRATADO COM BIOCARVÃO E CULTIVADO COM SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	
	RESUMO.....	58
	ABSTRACT.....	58
4.1	INTRODUÇÃO.....	59
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.2.1	Condições Experimentais.....	61
4.2.2	Amostragem de solo.....	64
4.2.3	Extração de DNA.....	64
4.2.4	Análise de PCR quantitativo (qPCR)	64
4.2.5	Análise de T-RFLP.....	66
4.2.5.1	Análise dos resultados de T-RFLP.....	68
4.3	RESULTADOS.....	69
4.3.1	Abundância dos genes.....	69
4.3.2	Estrutura da comunidade de bactéria.....	72
4.3.3	Estrutura da comunidade de archaea.....	77
4.3.4	Estrutura da comunidade de fungo.....	82
4.4	DISCUSSÕES.....	91
4.4.1	Biocarvão nas comunidades de bactéria, archaea e fungo do solo.....	91
4.4.2	Comunidades de bactéria, archaea e fungo no biocarvão.....	92
4.4	CONCLUSÕES.....	93
4.5	REFERÊNCIAS.....	94
5	CONCLUSÕES FINAIS.....	102

RESUMO GERAL

SANTOS, J. L. S. **Biocarvão como condicionador da fertilidade e da microbiota de solo de cerrado cultivado com soja**. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Solo e Água) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.¹

Biocarvão é a nova palavra para descrever o material de granulação fina, rico em carbono orgânico e altamente poroso, produzido de material biológico (biomassa) por processo de pirólise. De acordo com sua formação, o biocarvão reage com outros componentes do solo, contribuindo para um melhor condicionamento das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do biocarvão em diferentes doses (0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹) num Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, textura Franco Argilo Arenosa, cultivado com soja (*Glycine max* (L.) Merrill), localizado no Bioma Cerrado. O experimento foi instalado em 2006 no município de Nova Xavantina, MT e os anos avaliados foram de 2007 a 2012. O Experimento foi implantado em 2006, incorporando-se biocarvão na profundidade de 0,15 cm. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro doses de biocarvão nas doses 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ e a testemunha. As amostragens de solo foram feitas em fevereiro dos anos de 2006 a 2012, na profundidade de 0-10 cm. Foram avaliados: a fertilidade do solo; a biomassa microbiana do solo; a produtividade da soja em kg ha⁻¹; e a diversidade da comunidade de archaea, bactéria e fungo nas diferentes doses e no biocarvão antes e após ser utilizado no solo. A composição elementar do biocarvão influenciou, após aplicação, na neutralização e na manutenção da fertilidade do solo. No entanto, com o tempo, altos teores de Al disponível, e baixo pH no solo, reduzem os efeitos das diferentes doses sobre a produtividade da soja. A biomassa microbiana do solo apresentou resultados quando os níveis de material orgânico foram significativos para as diferentes doses de biocarvão. A diversidade de comunidades microbianas no solo foi influenciada pelas diferentes doses de biocarvão no solo. O biocarvão após condicionar o solo por algum tempo, apresentou diversidade microbiana semelhante ao solo. Estudos devem levar em consideração o efeito de doses menores de biocarvão sobre as propriedades do solo.

Palavras-chave: diversidade microbiana, solo rizosférico, matéria orgânica do solo.

¹ Orientadora: Dr^a. Beáta Emőke Madari. Embrapa ã CNPAF.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai. CENA ã USP.

GENERAL ABSTRACT

SANTOS, J. L. S. **Biochar as soil conditioner of soil fertility and microbiota cultivated with soybean in Brazilian savanna.** 2013. 102 f. Thesis (Doutorate in Agronomy: Soil and Water) ã Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.¹

Biochar is a new word to describe fine-grained, highly porous charcoal made from biological material (biomass), high in organic carbon. According to its formation, biochar has reactions with other components of the soil, contributing for the better conditioners physical, chemical and biological soil properties. The aim of this work was to evaluate of different rates of biochar (0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹) in the long term experiment with soybean (*Glycine Max* (L) Merrill) in Haplustox soil, Savanna Biome. Experimental design was field experiment with randomized blocks, 4 repetitions (blocks) and 5 treatments (charcoal doses: 0, 2, 4, 8 and 16 Mg ha⁻¹), plot design 10 x 4 m. In 2006, charcoal was ground and incorporated in soil at 0-15 cm, when the experiment was installed. Soil samples were collected during February of 2007 to 2012, at the soybean flowering. Soil fertility, soil microbial biomass and soybean productivity (kg ha⁻¹) were estimated. Diversity of archaeal, bacterial and fungal community were estimated in different rates of biochar, and in biochar before and after amended in soil. Elemental composition of biochar had liming effect on soil fertility; high content of aluminum and pH, did not effect soybean productivity. Soil microbial biomass showed results due to organic matter content in the last year of experimental. Different rates of biocarvão influenced soil microbial diversity. Biocarvão, after conditioning the soil showed microbial diversity similar to soil. Little biochar rates should be tested in soil.

Key words: microbial diversity, rizhospheric soil, soil organic matter.

¹Adviser: Dr^a. Beáta Emöke Madari. Embrapa ã CNPAF.
Co-adviser: Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai. CENA ã USP.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, depois da Amazônia, e é também a formação vegetal mais rica do mundo em biodiversidade. O Cerrado possui um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundiais (Faleiro et al., 2008). A transformação de ambientes naturais, como o Cerrado, em sistemas agrícolas tem provocado a degradação de extensas áreas, em consequência de sua exploração inadequada (Fonseca et al., 2007). Novos sistemas e novas tecnologias de produção, que sejam adequadas para as diferentes condições ambientais, aliando a produção de alimentos com a preservação da biodiversidade do solo e da água e ainda contribuindo para o sequestro do excesso de carbono na atmosfera, podem contribuir para a redução das perdas de matéria orgânica do solo. Uma proposta é o sequestro de carbono no solo com a utilização de biocarvão (biomassa carbonizada), que pode ser produto ou subproduto de diferentes processos de pirólise (Maia et al., 2011).

O biocarvão é um produto rico em carbono, obtido de diferentes tipos de resíduos de biomassa, quando é aquecido em ambiente com baixa concentração ou ausência de oxigênio e presença de calor (Lehmann & Joseph, 2009; Sohi et al., 2010b). Compreende a biomassa derivada do carvão destinada especificamente para aplicação ao solo, isto é, de acordo com a sua finalidade. O biocarvão compreende, essencialmente, formas estáveis aromáticas de carbono orgânico, e, em comparação com o carbono de uma matéria-prima de pirólise, não pode ser prontamente devolvido à atmosfera como CO₂, mesmo sob condições ambientais e biológicas favoráveis, tais como aqueles que podem prevalecer no solo (Sohi et al., 2010b).

O uso do biocarvão como um aditivo do solo tem sido proposto como um meio para atenuar as alterações climáticas antropogênicas e simultaneamente, melhorar a fertilidade do solo agrícola (Woolf, 2008). No entanto, a quantidade de biocarvão que pode ser adicionado ao solo, antes que ele deixe de funcionar como um condicionador benéfico e passe a apresentar efeito negativo, é o fator limitante na utilização de biocarvão como um aditivo no solo. Contudo, evidências benéficas têm sido verificadas em solos de Terra Preta de Índio que possuem altas concentrações de biocarvão (Glaser, 2007).

O carvão pode apresentar diferente composição química dependendo da temperatura, tempo de carbonização (Trompowsky et al., 2005) e do tipo material utilizado. Diversos resíduos de biomassas vegetais podem ser utilizados e transformados em biocarvão, como por exemplo, palhas de milho, lascas de madeira de pinho, cascas de amendoim, pellets de madeira, resíduos de fino de carvão (Spokas & Reicosky, 2009), entre outros. As respostas iniciais das plantas ao biocarvão variam de acordo com os componentes (principalmente nutrientes do biocarvão), com o tipo de solo e estado nutricional da espécie de planta utilizada, assim como do tipo de resíduo utilizado para a produção do biocarvão (Van Zwieten et al., 2010). Muitos estudos avaliam o efeito de curto prazo do biocarvão no solo (Graber et al., 2010; Anderson et al., 2011; Kolton et al., 2011). Nesses estudos é possível verificar o potencial de uso de biocarvão no solo. No entanto, os estudos em experimentos de campo demonstram melhor os efeitos do biocarvão sobre as propriedades do solo (Major et al., 2010; Jones et al., 2012; Quilliam et al., 2012a; Chen et al., 2013).

As relações entre as propriedades químicas e físicas do biocarvão e seus efeitos sobre a biota no solo e o concomitante efeito potencial sobre os processos biológicos ainda estão pouco entendidos (Lehmann et al., 2011). Após a pirólise, o biocarvão pode possuir potencial de poder de neutralização da acidez do solo, por apresentar altos teores de carbonato de cálcio e de magnésio (Van Zwieten et al., 2010), além de outros nutrientes essenciais às plantas, como o K e P, e micronutrientes como o Mn, Fe, Cu, Zn, Mo (Novak et al., 2009; Graber et al., 2010). O aumento nas adições de carbono orgânico melhora a retenção de nutrientes que se tornam acessíveis aos microrganismos na superfície da partícula (Lehmann et al., 2011).

Quando adicionado ao solo, a estrutura porosa do biocarvão pode oferecer microsítios favoráveis ao abrigo de microrganismos, contra predadores da fauna do solo (Pietikäinen et al., 2000). No entanto, o conhecimento sobre a microbiologia do biocarvão no solo ainda é pouco conhecida (Navarrete et al., 2010). Análises de solo com biocarvão verificaram que as mudanças na atividade microbiana do solo foram indiretas, e sugere que o biocarvão estimula o crescimento das plantas por meio da indução de efeitos na rizosfera, com efeitos diretos e indiretos na qualidade e quantidade de exsudatos radiculares (Graber et al., 2010; Jones et al., 2012). Os exsudatos de raízes de diferentes plantas afetam a atividade microbiana e, diferentemente, a composição de bactérias no solo. (Anderson et al., 2011).

Conhecimentos sobre as relações de diversidade microbiana nos solos com biocarvão também foram pouco abordados (Navarrete et al., 2010). Estudos recentes têm utilizado ambas as técnicas tradicionais de isolamento de microrganismos do solo, como também técnicas moleculares independentes de cultivo, que possibilitam o melhor acesso a diversidade microbiana no solo (Kolton et al., 2011). Alguns experimentos de campo já indicaram a predominância do crescimento bacteriano sobre o crescimento de fungo no solo avaliado (Chen et al., 2013). Jones et al. (2012) avaliando biocarvão, verificaram que o raio de crescimento de fungo para bactéria foi de 30 %. Maiores conhecimentos sobre a relação desses microrganismos no solo podem ajudar a indicar o melhor manejo de uso do biocarvão no solo.

Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do biocarvão em diferentes doses (0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹) num Latossolo Vermelho Amarelo cultivado com de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), localizado no Bioma Cerrado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO

Os diferentes tipos de manejo e uso do solo influenciam nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Por décadas, a pesquisa científica na área de solos se concentrou mais nas propriedades físicas e químicas, e menos atenção se deu às propriedades biológicas do solo que são afetadas pelos diferentes manejos e uso que se utilizam na agricultura (Grossman et al., 2010).

Os microrganismos possuem um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos do meio ambiente. São responsáveis pelo ciclo dos compostos orgânicos e influenciam o ecossistema do solo, como a nutrição, a saúde das plantas e, também, a estrutura e a fertilidade do solo. São agentes de transformação da matéria orgânica do solo, de nutrientes e a chave para os diferentes processos que ocorrem no solo. Suas atividades são muito influenciadas pelas interações ecológicas e físico-químicas no solo (Powlson et al., 2001).

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, sendo que os procariotos (domínios *Bacteria* e *Archaea*) representam a maior parte dessa biota (Pace, 1999). Bactérias são os microrganismos com maior diversidade sobre a Terra, possuindo uma grande importância sobre os processos biogeoquímicos do solo. *Archaea* foram primeiramente consideradas como microrganismos de ambientes extremos. No entanto, elas têm sido encontradas em numerosos habitats, como por exemplo, solos agrícolas. Os fungos possuem um papel importante nos processos de decomposição no ambiente, principalmente no solo (Coleman & Whitman, 2005). Em virtude da sua longa história evolutiva e da necessidade de adaptação aos mais distintos ambientes, os microrganismos acumularam uma impressionante diversidade genética, que excede, em muito, a diversidade dos organismos superiores (Hunter-Cevera, 1998). Portanto, compreender como a comunidade microbiana é estruturada em determinado ambiente é a chave para a melhor gestão deste recurso (Taketani & Tsai, 2010).

De acordo com Ranjard et al. (2003), os poucos conhecimentos sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais deve-se, principalmente, à utilização de métodos tradicionais para o isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório. Amann et al. (1995) sugerem que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza, ao redor de 0,1 % ou no máximo 10% do total da população, é cultivável através do uso de técnicas microbiológicas tradicionais, deixando uma vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada.

A diversidade estrutural de microrganismos pode ser estudada por métodos que se baseiam na investigação de partes de sequências do DNA, notadamente o gene 16S rRNA, em *Bacteria* e *Archaea*, e 18S rRNA, para *Fungi*. As regiões 16S rRNA, 18S rRNA ou ITS são regiões alvo de *primers*, para estudo de diversidade porque esses genes/fragmentos estão presentes em todos os microrganismos e são regiões bem definidas para classificações taxionômicas, por não estarem sujeitas a transferência horizontal (Kirk et al., 2004).

Diversas técnicas podem ser empregadas para avaliar a diversidade de microrganismos no solo, que se diferenciam pela capacidade de resolução em identificação de membros da comunidade, podendo ser utilizadas isoladamente ou em conjunto (Tiedje et al., 1999). Técnicas de *fingerprinting* (óimpressão digital) são aquelas que fornecem um perfil ou assinatura característica dos microrganismos ou comunidade de interesse, fazendo alusão à ideia de assinatura característica e específica de um micro-organismo, seja no nível de estirpe, espécie ou categoria taxonômica superior. Elas permitem um acesso rápido à estrutura e composição de comunidades de microrganismos, de modo que várias amostras podem ser avaliadas e comparadas rapidamente (Moreira et al., 2008). Técnicas de *fingerprinting* são: a análise do poliformismo de fragmentos de restrições terminais (T-RFLP), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), análise do espaçador intergênico do RNA ribossomal (ARISA) (Okubo & Sugiyama, 2009). Os resultados com essas técnicas podem ser melhor analisadas, quando associadas à análise de biblioteca genômica ou pirosequenciamento (Metzker, 2005).

As técnicas de *fingerprinting* também podem ser associadas à técnica de PCR quantitativo (qPCR), ou PCR em tempo real, que permite a quantificação de sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras ambientais. Na análise de qPCR, a quantidade de produto de amplificação é monitorada durante os ciclos da PCR com a utilização de reagentes fluorescentes que se ligam ao produto de amplificação, sem danificá-lo, ao final

de cada ciclo (Moreira et al., 2008). É uma recente ferramenta molecular para quantificar microrganismos em amostras ambientais diretamente do DNA extraído da amostra, e se caracteriza por ser um método altamente sensível, potente e preciso (Smith & Osborn, 2009). A adoção de ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para quantificar a biomassa de microrganismos tem se mostrado um promissor método para quantificar a população microbiana no solo (He et al., 2007; Chen et al., 2013).

A medida da biomassa microbiana do solo também é uma forma de quantificar a população microbiana do solo. A medida da biomassa microbiana (BMS) do solo não é uma estimativa da atividade dos microrganismos, mas da massa microbiana viva total, com base na concentração de algum elemento ou de alguma substância celular. As atividades de algumas enzimas podem ser relacionadas com a BMS e são auxiliares na interpretação da condição funcional da biomassa microbiana do solo total ou de algum compartimento. Em termos de atividade da microbiota do solo, vários parâmetros podem ser usados, como a respiração basal, atividade de microrganismos celulolíticos, atividades de enzimas como a desidrogenase, urease, fosfatase, etc., (De-Polli & Guerra, 1997). Assim, a biomassa microbiana do solo é definida, conceitualmente, como a parte viva e funcional da matéria orgânica do solo excluindo-se as raízes e animais maiores do que aproximadamente $5 \times 10^3 \mu\text{m}$ (Jenkinson & Ladd, 1981). A BMS engloba principalmente organismos de *Archaea*, *Bacteria*, *Fungi* e *Protoctista*, mas também alguns do Reino Animalia, como os nematóides e é geralmente expressa como microgramas (μg) de carbono por grama de solo seco, sendo avaliada por diversos métodos. Há dois métodos principais empregados para avaliar a biomassa microbiana do solo, que são a fumigação-incubação e a fumigação-extração (Moreira & Siqueira, 2006).

As quantidades de nutrientes imobilizadas na biomassa microbiana podem atingir valores bastante elevados (acima de 100 kg ha^{-1} , no caso do N), e esses estão em equilíbrio dinâmico com os nutrientes da solução do solo (Anderson & Domsch, 1980). Os nutrientes retidos na biomassa são liberados para a solução do solo à medida que os microrganismos morrem e são mineralizados, de modo que a biomassa microbiana atua como um reservatório de nutrientes no solo, controlando sua disponibilidade por meio dos processos de mineralização e imobilização (Vargas & Scholes, 1998).

Assim, para o entendimento das populações microbianas do solo, Grossman et al. (2010) relata que é importante primeiro entender a maneira como as propriedades do solo, influenciam um tipo de manejo, e influenciam nas populações microbianas do solo e

no controle dos processos biogeoquímicos, para posteriormente obter o máximo proveito do uso do solo.

2.2 BIOCARVÃO COMO CONDICIONADOR DO SOLO

O uso inadequado do solo pela produção agrícola representa um dos direcionadores do aquecimento global, devido a aumentar o poder da mineralização do carbono que foi previamente estabilizado na matriz do solo. Dessa forma, há um aumento no interesse do estudo do teor do carbono dos solos agrícolas, no sentido de diminuir as emissões de carbono e criar um equilíbrio positivo de carbono nos solos. Uma opção é o sequestro de carbono pela adição da biomassa carbonizada (biocarvão) (Lehmann, 2007b). Com a adição de biocarvão no solo tem-se observado aumento no estoque de carbono pela redução de suas emissões (Steiner et al., 2007).

O biocarvão é um produto rico em carbono, obtido de diferentes tipos de resíduos de biomassa, quando é aquecido em ambiente com baixo teor ou ausência de oxigênio, e em baixas temperaturas ($< 700\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Lehmann & Joseph, 2009; Sohi et al., 2010b). É geralmente considerada como a biomassa derivada do carvão destinada especificamente para aplicação ao solo, isto é, de acordo com a sua finalidade. Como tal, ele estende-se a materiais relacionados produzidos sob condições mais e menos controladas com a exclusão parcial ou total de oxigênio, tal como o carvão convencional. Uma característica de biocarvão que é comum para o carvão em geral é que ele compreende, essencialmente, formas estáveis aromáticos de carbono orgânico, e, em comparação com o carbono de uma matéria-prima de pirólise, não pode ser prontamente devolvido à atmosfera como CO_2 , mesmo sob as condições ambientais e biológicas favoráveis, tais como aqueles que podem prevalecer no solo (Sohi et al., 2010b).

Entretanto, a reatividade e hidrofobicidade dos carvões, bem como sua estrutura, dependem do material de origem e das condições de formação, tais como: temperatura e tempo de queima, umidade do material vegetal, disponibilidade de oxigênio entre outros. Embora eles possam ser considerados estáveis no sistema solo, se comparados a outras formas da matéria orgânica, também sofrem biodegradação e transformação (Madari et al., 2009).

O biocarvão pode atuar com a redução das emissões de CO_2 para a atmosfera. Primeiramente o dióxido de carbono é assimilado pelas plantas através da fotossíntese. No processo de pirólise produz-se biocarvão. Aplicando-se o biocarvão no solo, pode-se

considerar sequestro de C (sumidouro líquido). Esse processo tem o potencial de ser carbono negativa, que significa que, para cada unidade de energia produzida, ou possivelmente menos consumida, gases de efeito estufa seriam removidos da atmosfera (Lehmann, 2007a).

Durante o processo de carbonização da madeira, por exemplo, o carvão é apenas uma fração dos produtos que podem ser obtidos. Caso sejam utilizados sistemas apropriados para a carbonização podem ser aproveitados os condensados pirolenhos (alcatrão vegetal) e os gases não condensáveis. A prática mais completa e eficiente é quando além do carvão vegetal (resíduo) são aproveitados os condensados e os gases não condensáveis da madeira, denomina-se ódestilação seca, que pode ser implantada a partir da utilização de fornos especiais com recuperadores de fumaça. Em termos de rendimento, a carbonização vegetal bem conduzida pode gerar até 40 kg de carvão vegetal a partir de 100 kg de madeira seca; ou seja, um rendimento de 40%. Neste mesmo processo, são gerados cerca de 60 kg de água incluindo uma umidade inicial de 30% e 13 kg de óleo. Parte deste óleo apresenta-se solúvel em água formando o ácido pirolenhoso. Também podem ser recuperados ou utilizados como fonte de energia no processo 16 kg de gases não condensáveis (CH, CO, CO e H) (Benites et al., 2009).

O carvão pode apresentar diferente composição dependendo da temperatura de carbonização (Trompowsky et al., 2005), e do material utilizado. Diversos resíduos de biomassas vegetais podem ser utilizados e transformados em biocarvão, como por exemplo, palhas de milho, lascas de madeira de pinho, cascas de amendoim, pellets de madeira, resíduos de fino de carvão (Spokas & Reicosky, 2009), entre outros. Após pirolise, o carvão apresenta uma estrutura porosa, uma vez que a água e os compostos voláteis contidos na madeira foram eliminados, deixando espaços vazios. Cerca de 70 a 80% do volume do carvão vegetal é formado por poros. Logo, o carvão apresenta baixa densidade, variando de 0,3 a 0,4 kg dm⁻³. Quimicamente, logo após a sua formação, o carvão possui uma estrutura policíclica aromática com alto grau de condensação. (Lehmann, 2007a). Em proporções menores, contém também grupos funcionais lábeis ou quimicamente ativos.

Os solos de Terra Preta de Índio da Amazônia são um dos solos mais férteis do mundo, (Glaser et al., 2000) e um dos fatores chave para a persistência do material orgânico nesses solos são fragmentos de carvão de combustão incompleta de material orgânico, que possuem estrutura aromática policíclica que permite sua persistência no

ambiente por vários anos (Glaser et al., 2001). Grossman et al. (2010) propuseram que a recalcitrância do biocarvão no solo de Terra Preta de Índio sugere que o biocarvão não é utilizado como uma fonte de nutrientes para os microrganismos, o que diminui a pressão seletiva dentro das partículas de biocarvão.

A matéria orgânica dos solos antrópicos da Amazônia tem um papel chave devido às suas propriedades e funções sobre diversos processos que compõem o sistema solo-planta. Por possuir matéria orgânica mais estável do que a matéria orgânica de solos não antrópicos, nas Terras Pretas de Índio, predominam os processos que favorecem o acúmulo de carbono. Entretanto, é ainda desconhecido o efeito direto do carvão e das frações da matéria orgânica que herdaram algumas propriedades do carvão nos processos biológicos de acúmulo de carbono no solo. São também desconhecidos os mecanismos de ação do biocarvão sobre os processos do solo e sobre o crescimento das plantas (Madari et al., 2009).

O biocarvão pode possuir potencial de poder de neutralização do solo, por apresentar altos teores de carbonato de cálcio e de magnésio (Van Zwieten et al., 2010), além de outros nutrientes essenciais às plantas, como o K e P, e micronutrientes como o Mn, Fe, Cu, Zn, Mo (Novak et al., 2009; Graber et al., 2010). De acordo com Lehmann (2007a), a retenção de cátions de biocarvão fresco é relativamente baixo quando comparado com biocarvão com algum tempo no solo, e não está claro em que condições e em que período de tempo, o biocarvão desenvolve suas propriedades adsorventes. Jones et al. (2012), descreveram que o biocarvão, inicialmente, quando fresco, possui pouco potencial biológico. No entanto, após ser condicionado ao solo, por algum tempo, esse potencial biológico é adquirido.

Quando adicionado ao solo, a estrutura porosa do biocarvão pode oferecer micrositios favoráveis ao abrigo de microrganismos, contra predadores da fauna do solo (Pietikäinen et al., 2000). Essa estrutura porosa possui alta superfície interna com a habilidade de adsorver matéria orgânica solúvel, gases e nutrientes inorgânicos, tornando-o um habitat sustentável para colonização, crescimento e reprodução, particularmente para bactérias, actinomicetos e fungos micorrízicos arbusculares (Thies & Rillig, 2009).

No entanto, o conhecimento sobre a microbiota do biocarvão no solo é recente (Navarrete et al., 2010). Taketani et al. (2013) investigaram a comunidade de bactérias em solo de Terras Preta de Índio (TPI), solo adjacente e no biocarvão selecionado do solo. Foi observado que a estrutura de comunidades de bactérias do biocarvão foi similar à do solo

de TPI, no entanto com distintas características. Os filos *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Actinobactéria* foram semelhantes no biocarvão e no solo de TPI, embora uma diferença na composição de bactérias fosse esperada. Dessa forma, a semelhança entre o biocarvão e o solo de TPI, de onde foi extraído, não mostrou uma comunidade específica diferente para o biocarvão (apenas para o solo adjacente), o que indicou que forças de seleção dos microrganismos agem de forma semelhante no solo e no biocarvão. É provável que, se os microrganismos no biocarvão são responsáveis por características que o diferenciam do solo que o deu origem (Terra Preta de Índio), essas devem ser relacionadas a populações raras, cujo papel no solo ainda é pouco conhecido.

Navarrete et al. (2010) também analisaram o solo de TPI e o biocarvão extraído desse solo, com relação à composição de comunidades de bactérias. Eles encontraram composição semelhante entre o solo e o biocarvão, e ainda verificaram clara diferença, para os Filos *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*. De acordo com Chen et al. (2013), mudanças na estrutura da comunidade de microrganismos em solo condicionado com biocarvão demonstram o potencial do biocarvão em atuar nos processos biogeoquímicos. No entanto, nem o mecanismo, nem o impacto potencial dessas mudanças no funcionamento do ecossistema estão bem compreendidos.

2.3 FERTILIDADE DO SOLO APÓS APLICAÇÃO DE BIOCARVÃO

A possível conexão entre as propriedades do biocarvão e a biota do solo e suas implicações para as propriedades do solo ainda não estão sistematicamente descritas (Lehmann et al., 2011). Nas avaliações sobre os solos de TPI Taketani et al. (2013) avaliaram a fertilidade do solo de TPI comparado ao solo adjacente. De acordo com a caracterização que eles obtiveram, o solo adjacente apresentou alta acidez e altos teores de Al e Fe, e baixos teores de matéria orgânica do solo, P, Ca, Mg, Zn e Mn em relação ao solo de TPI.

Semelhantes aos resultados de TPI, quando se aplica o biocarvão no solo, são observados aumento nos teores de matéria orgânica do solo, na produtividade (Graber et al., 2010), na retenção de nutrientes, diminuição das emissões de N_2O e CH_4 , adsorção de metais pesados no solo (Sohi et al., 2010a; Spokas, 2012), e aumento do pH e da capacidade de retenção de água (Anderson et al., 2011). O aumento no pH indica que o biocarvão possui efeitos agronômicos na neutralização do solo, em solos ácidos (Chan et al., 2008; Major et al., 2010).

De acordo com Van Zwieten et al. (2010) o biocarvão possui potencial de poder de neutralização da acidez, após processo de pirólise, por apresentar altos teores de carbonato de cálcio e de magnésio. Eles avaliaram o efeito do biocarvão de resíduo de fábrica de papel em um solo ácido (Latossolo) e em um solo naturalmente alcalino, em experimento em vasos, com o equivalente a 10 Mg ha⁻¹ de biocarvão, durante três meses, cultivando soja e trigo. No solo ácido foi verificado aumento no pH com e sem a aplicação de fertilizantes, reduzindo o Al disponível no solo, assim como elevação nos níveis de capacidade de troca de cátions, o que sugere a interação entre as características do biocarvão. No solo alcalino pela ausência de Al, também não se verificou resposta do Ca.

Major et al. (2010) avaliaram o efeito do biocarvão na retenção de cátions de reação básica em solo ácido e na produtividade de soja e milho. Utilizando experimento de campo em Latossolo Vermelho Amarelo de Savanna, nas doses 0, 8 e 20 Mg ha⁻¹ de biocarvão de madeira comercial. Soja e milho foram cultivados no experimento, em rotação, e análises de solo e produtividades das culturas foram obtidas durante quatro anos. Aumento na produtividade foi verificado a partir do segundo ano, sendo que a melhor diferença entre as doses de biocarvão e o controle foi verificada no quarto ano. Para as propriedades do solo, o biocarvão foi mais significativo para as variáveis Ca e Mg. O biocarvão ajudou a minimizar as perdas de Ca e Mg aplicadas na zona de enraizamento, pelo calcário. E as melhorias de produtividade foram atribuídas principalmente ao aumento do pH e da retenção de nutrientes no solo.

Petter (2010), avaliou o efeito de biocarvão de árvores nativas e comerciais em solos do Bioma Cerrado em Latossolo Vermelho Amarelo argilo-arenoso e Plintossolo Háplico arenoso, nas doses 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ e 0, 8, 16 e 32 Mg ha⁻¹, respectivamente, por três anos e um ano. Foram verificados resposta fisiológica de soja e arroz, observando aumento nos níveis de P, K, Ca e Mg disponíveis e redução do potencial de acidez do solo, com baixos teores de Al e aumento da eficiência de uso de nutrientes do solo.

Jones et al. (2012) verificaram, em experimento de campo em Cambissolo Arenoso de textura franco argilosa, cultivado com milho por três anos, a adição de biocarvão derivado de lascas de troncos e ramos de árvores, nas doses 0, 25 e 50 Mg.ha⁻¹ de biocarvão. Após três anos na área, a alcalinidade associada ao biocarvão foi totalmente neutralizada e o biocarvão perdeu a maior parte de seus cátions (K, Na, Ca), construindo uma comunidade microbiana associada a ele.

Farrell et al. (2013) avaliaram em experimento de campo o efeito do biocarvão e do P em campos de trigo. O experimento foi implantado em solo alcalino, com histórico de plantio direto por seis anos. O biocarvão foi aplicado com as doses 0, 35 e 175 kg.ha⁻¹, e avaliado por dois anos. A menor dose de biocarvão não foi significativa para a produtividade do trigo. No entanto, fertilizações altas de P aumentaram a produtividade do trigo nas duas doses de biocarvão avaliadas.

De acordo com Glaser et al. (2001), a maior disponibilidade e retenção de nutrientes foi encontrada após a adição de biocarvão no solo, relacionadas à maior capacidade de troca catiônica, área superficial, e adição de nutrientes diretos. Temperaturas mais elevadas na sua formação melhoram as propriedades da superfície do carvão.

2.4 DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO COM BIOCARVÃO

Por ser sensível a mudanças ambientais, a abundância e estrutura da comunidade microbiana do solo tem sido muito usada como indicador de mudanças no solo (Sohi et al., 2010a). As mudanças nos atributos do solo com a adição do biocarvão alteram a estrutura e atividade dos microrganismos no solo (Lehmann et al., 2011).

O aumento da comunidade microbiana do solo com biocarvão pode ser o resultado da mudança nas propriedades do solo. Os aumentos nas adições de carbono orgânico melhoram a retenção de nutrientes que se tornam acessíveis aos microrganismos na superfície da partícula (Lehmann et al., 2011). Kolton et al. (2011), avaliaram o efeito da aplicação do biocarvão no solo sobre a estrutura e composição de comunidades bacterianas em solo não rizosférico e rizosférico com plantas de pimentão de três meses de idade, indicando uma maior interação microbiana na planta com os microrganismos associados às raízes. Para isso foram utilizadas análise de *fingerprinting* de T-RFLP, DGGE e pirosequenciamento. Essas análises indicam que o aumento do crescimento das plantas e indução à resistência sistêmica às doenças, pode estar atribuído à proliferação de elicitores microbianos em resultado do estímulo do biocarvão na comunidade microbiana da rizosfera.

De acordo com Zhang et al. (2012), não é esperado que a fração inerte do carbono do próprio biocarvão tenha impacto sobre a diversidade das populações microbianas do solo. Graber et al. (2010), sugerem que as mudanças observadas no crescimento da composição microbiológica foram estimuladas pelos alcatrões orgânicos que são residuais do biocarvão. Muito desses compostos são conhecidos por afetar

negativamente o crescimento microbiano quando presentes em concentrações elevadas. Em baixas concentrações, contudo, é possível que esses compostos do alcatrão promovam o crescimento de populações de microrganismos nativos. Os compostos orgânicos do biocarvão podem suprimir componentes sensíveis da microbiota do solo, assim resultando na proliferação de comunidades microbianas resistentes.

Durenkamp et al. (2010) avaliaram a eficiência do método de fumigação extração sobre a determinação do C e N da biomassa microbiana do solo em três diferentes solos (pastagem e solo cultivado do Reino Unido e solo cultivado da China), condicionados com biocarvão (biocarvão ou carvão ativado). O carvão ativado adicionado ao solo resultou em significativo decréscimo no C e N da biomassa microbiana nos três solos, mas não foram observados resultados para o biocarvão. A conclusão foi que a eficiência de extração do C da biomassa microbiana foi mais afetada em relação à extração do N da biomassa microbiana do solo. Além disso, o impacto do biocarvão na eficiência de extração da biomassa microbiana do solo dependeu do tipo de biocarvão que foi adicionado ao solo e o tipo de solo. Para isso os autores recomendam que cada tipo de biocarvão antes de ser utilizado no solo deve ser testado quanto ao impacto na biomassa microbiana pelo método de fumigação-extração.

Chen et al. (2013) ao avaliaram o efeito do biocarvão na atividade de microrganismos do solo em experimento de campo (0, 20, 40 Mg ha⁻¹ de biocarvão) observaram que a biomassa microbiana do solo não diferiu significativamente entre os tratamentos. No entanto, através da utilização de métodos moleculares como o qPCR, TRFLP e DGGE foi possível distinguir a diferença na comunidade microbiana para bactéria e fungo no solo. De acordo com Lehmann et al. (2011), a ausência de efeitos da biomassa microbiana no solo, quando o biocarvão é adicionado, seriam devido à alta sorção de células lisadas pelo processo de fumigação, nas partículas de biocarvão.

2.5 COMUNIDADES DE BACTÉRIA EM SOLO COM BIOCARVÃO

As práticas agrícolas modificam as propriedades do solo e consequentemente modificam a composição e estrutura da comunidade de bactérias no solo (Anderson et al., 2011). Tratamentos com retenção de resíduos agrícolas possuem alto número de bactérias no solo, quando comparados com tratamentos onde esse resíduo é removido. Isso é facilmente explicado pelo fato da contínua entrada de material orgânico no solo, devido à

deposição de resíduos, que servem como fonte de carbono para obtenção de energia e síntese celular (Navarro-Noya et al., 2013).

Diferentes tipos de biocarvões tem sido considerados no estudo da microbiologia do solo (Spokas & Reicosky, 2009). Muitos dos estudos são realizados dentro de condições de laboratório ou casa de vegetação. De acordo com Khodadad et al. (2011), as adições de biocarvão no solo em longo prazo e em curto prazo tem mostrado diferenças na comunidade de bactérias. Verificando-se a importância de se ter estudos em longo prazo, no sentido de se obter melhores resultados com relação ao potencial agrônomo do biocarvão no solo, muitos estudos ainda verificam o efeito do biocarvão em períodos curtos de tempo. De acordo com Hu et al. (2013), o efeito de curto prazo do biocarvão no solo ainda não está bem entendido. É bem provável que substâncias presentes no biocarvão sejam usualmente mineralizadas em um curto período de tempo.

Kolton et al. (2011), utilizaram biocarvão de madeira de citrus, em experimento em vasos com zero e 3% do volume de biocarvão no solo, e avaliaram o solo rizosférico e solo não rizosférico após três meses de implantação do experimento. Verificaram o efeito da aplicação do biocarvão na composição de comunidades de bactérias de solo rizosférico e solo não rizosférico, focando nas comunidades que foram associadas às interações planta-microrganismo. Pelas análises moleculares de *fingerprinting*, T-RFLP e DGGE, foi possível verificar efeito na composição da comunidade de bactérias entre o solo rizosférico e o solo não rizosférico, com e sem biocarvão, demonstrando eficiência das técnicas utilizadas.

Anderson et al. (2011), avaliaram em experimento de vasos, com solo franco argiloso, com 10% de biocarvão de *Pinus radiata*. As amostras foram avaliadas por 12 semanas, para o solo rizosférico e o solo não rizosférico utilizando análise de *ófingerprinting* T-RFLP. O estudo foi focado em entender como o biocarvão aplicado ao solo influenciou na função biogeoquímica da estrutura de comunidade de bactérias. Os resultados sugeriram que a estrutura e função da comunidade microbiana de bactérias foram mais estáveis no solo com biocarvão. De acordo com Graber et al. (2010) pesquisas são necessárias para verificar a atuação do biocarvão nos solos, principalmente, quanto a influencia de grupos de microrganismos alvos com especiais funções no solo.

Jones et al. (2012) avaliaram experimentos de campo com biocarvão em Cambissolo de textura argiloso arenosa, por três anos. Foram utilizados biocarvão de lascas de troncos de árvores, com doses 0, 25 e 50 Mg ha⁻¹. Foi observado, no segundo ano do seu

experimento, o aumento de crescimento bacteriano e a prevalência da comunidade microbiana bacteriana no solo condicionado com biocarvão.

Chen et al. (2013), avaliaram a diversidade microbiana em experimento de campo em solo arenoso com 0, 20 e 40 Mg ha⁻¹ de biocarvão de palha de trigo. As avaliações foram feitas no ano da aplicação do biocarvão e no ano posterior. De acordo com os resultados, não foi possível verificar efeito das doses sobre a biomassa microbiana do solo. Entretanto, ao realizarem análise de fingerprints de TRFLP de 16 S rRNA de *Bacteria*, foram verificadas mudanças na abundância de T-RFs do solo com biocarvão, quando comparado ao solo controle. As mudanças verificadas indicaram um estímulo no crescimento de certas populações de bactérias dentro das doses adicionadas (índice de Shannon de 2,80 para solo controle e 3,03 para solo com 40 Mg ha⁻¹ de biocarvão). Também foi observado que os tratamentos exerceram um significativo aumento na atividade das enzimas desidrogenase e fosfatase alcalina e diminuição da atividade da α -glicosidase.

De acordo com O'Neill et al. (2009), em solos antropogênicos de Terra Preta de Índio do Amazonas, que possuem alto níveis de carbono pirogênico, apresentaram mudança na comunidade microbiana do solo de TPI em relação ao solo adjacente. Através do uso de utilização de métodos de cultivo dependente e cultivo independente de microrganismos (PLFA). C Jesus et al. (2009), quando avaliaram diferentes formas de manejo do solo em TPI do Amazonas por TRFLP, verificaram que as comunidades de bactérias diferiu em sua estrutura devido a mudanças em vários atributos do solo, mas, principalmente, aqueles relacionados à acidez do solo, como pH e Al³⁺. Essas mudanças foram verificadas devido a esses solos serem caracterizados como solos ácidos e a acidez do solo ser importante fator determinante da comunidade bacteriana no solo.

2.6 COMUNIDADES DE ARCHAEA NO SOLO COM BIOCARVÃO

Archaea foi primeiramente relacionada como microrganismos de ambientes extremos. No entanto, recentes estudos mostram que estão presentes em diversas amostras ambientais (Coleman & Whitman, 2005).

Na maioria dos ambientes, a archaea possui a tendência de ter baixa diversidade em relação à diversidade de bactérias no mesmo ambiente. Diferenças em sua diversidade sugerem possíveis diferenças no papel ecológico de archaea e bactéria. No entanto, há necessidade de informações sobre a relativa abundância e atividade de

metabólitos em diferentes ambientes. Archaea pode estar atuando em ambientes de maneira mais restritiva que as bactérias. Provavelmente archaea vivem em micronichos mais restritos, enquanto bactérias vivem em micronichos mais abrangentes dentro do mesmo ambiente (Aller & Kemp, 2008).

Grossman et al. (2010), analisando *fingerprints* de TRFLP, observaram que a comunidade microbiana do solo de TPI era diferente do solo adjacente. O solo de TPI apresentou menor diversidade de archaea quando comparado à diversidade de bactérias. Taketani & Tsai (2010) avaliando diferentes solos de Terra Preta de Índio do Amazonas, verificaram diferenças significativas quando compararam a diversidade de archaea com o solo adjacente (Shannon 1,29 e 2,60 em solo de TPI comparados a 1,32 e 2,64 em solo adjacente). A análise de similaridade (ANOSIM) não mostrou diferença entre a estrutura de comunidades de solo de Terra Preta de Índio e solo adjacente. O que explicou a diferente diversidade entre os dois solos foram os atributos do solo S, Ca, pH, Mg, e matéria orgânica do solo.

Feng et al. (2012) ao avaliarem o crescimento de archaea metanogênicas em solo de plantio inundado com arroz, com 24 Mg ha⁻¹ de biocarvão, em experimentos de microcosmos. Verificaram aumento no crescimento de archaea, no solo com biocarvão. Através de análise de *fingerprint* de 16S rRNA DGGE, foi observado que o biocarvão estimulou o crescimento de archaea metagenômicas no solo avaliado.

2.7 COMUNIDADES DE FUNGO EM SOLO COM BIOCARVÃO

O biocarvão adicionado ao solo possui efeito na biomassa de fungos micorrízicos arbusculares que colonizam as raízes de plantas. De acordo com Warnock et al. (2007) há quatro mecanismos que poderiam explicar o efeito do biocarvão na atividade de fungos micorrízicos arbusculares: (1) mudanças na quantidade de nutrientes disponíveis no solo; (2) mudanças na comunidade microbiana do solo como, por exemplo, bactérias solubilizadoras de fosfato; (3) alterações na sinalização entre a planta e o fungo; e (4) o biocarvão ser apto como habitat para a colonização de hifas de fungos.

No entanto, Warnock et al. (2010), ao analisar experimentos de campo e em casa de vegetação, verificaram resultados diferentes. Avaliando após 30 dias, em casa de vegetação, biocarvão de *Pinus contorta* misturados ao solo nas proporções de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 4,0% partes por volume. Em experimento de campo, em Latossolo de Savanna, avaliaram por um ano biocarvão de *Mangifera indica* nas doses 0, 11,6; 23,2; e 116,1 t C

ha⁻¹. Como o pH o solo aumentou em função do aumento das doses adicionadas ao solo, era esperado que fungos micorrízicos arbusculares (FMA) também aumentassem o crescimento. No entanto eles verificaram decréscimo no crescimento de FMA nos solos condicionados com as maiores doses de biocarvão. Os autores sugeriram que esse decréscimo no crescimento foi devido a compostos fenólicos ou poliaromáticos, adicionados pelo biocarvão no solo.

Chen et al. (2013), em experimento de campo de longa duração em solo arenoso com 0, 20 e 40 Mg ha⁻¹ de biocarvão de palha de trigo utilizando experimentos de longa duração, avaliaram o número de cópias por qPCR do gene 16S rRNA e 18S rRNA. Verificaram que a comunidade de bactérias aumentaram em 28% e 64% nos solos condicionados com 20 e 40 Mg ha⁻¹ de biocarvão, enquanto a comunidade de fungos diminuíram 35% e 46% com as doses de biocarvão adicionadas no solo. Esses resultados indicaram a predominância do crescimento bacteriano sobre o crescimento de fungos no solo avaliado. Quando avaliaram o perfil de comunidades de fungos por DGGE não foram observadas mudanças entre os tratamentos. Jones et al. (2012), avaliando biocarvão de diferentes árvores em Cambissolo de textura franco argilo arenosa verificaram que o raio de crescimento de fungos para bactérias foi de 30 %.

Hu et al. (2013) avaliaram o efeito de curto prazo do biocarvão nas estruturas de comunidades de bactérias e fungos em um Latossolo Vermelho franco de floresta subtropical. Foi utilizado biochar de serapilheira, coletado da superfície do solo, e foi adicionado ao solo 5% (v/v) em seu volume de biocarvão, com experimento conduzido por três meses. Observou-se que o biocarvão, em curto prazo no solo afetou de maneira diferente as comunidades de fungos e bactérias. O valor do índice de Shannon-Wiener para bactéria foi diferente no solo condicionado com biocarvão em comparação ao solo não condicionado (2,96 e 3,36 respectivamente). No entanto, não se obteve diferença na diversidade de fungo entre o solo condicionado e o solo não condicionado com biocarvão (2,66 e 2,22 respectivamente). Este fato demonstrou uma maior diversidade de bactérias em relação à diversidade de fungos, quando o biocarvão é adicionado ao solo. A diversidade de fungos diminuiu no solo condicionado com biocarvão, e isso provavelmente indica que bactérias estariam mais adaptadas às mudanças no solo induzidas pelo biocarvão, principalmente na utilização de nutrientes minerais adicionados pelo biocarvão.

2.8 REFERÊNCIAS

- ABREU, C. D.; LOPES, A.; SANTOS, G.; NOVAIS, R.; ALVAREZ V, V.; BARROS, N.; FONTES, R.; CANTARUTTI, R.; NEVES, J. Micronutrientes. **NOVAIS, RF et al. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS**, p. 724-736, 2007.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, 1995.
- ALLER, J. Y.; KEMP, P. F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 1, p. 74-87, 2008.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-69, 1995.
- ANDERSON, C. R.; CONDRON, L. M.; CLOUGH, T. J.; FIERS, M.; STEWART, A.; HILL, R. A.; SHERLOCK, R. R. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. **Pedobiologia**, v. 54, n. 5, p. 309-320, 2011.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. **Soil science**, v. 130, n. 1, p. 211-216, 1980.
- ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, A.; KH. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.
- ANDRADE, E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; OLIVEIRA, E. L. D. Effect of organic matter on manganese solubility. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 17-20, 2002.
- BENITES, V. D. M.; TEIXEIRA, W.; REZENDE, M.; PIMENTA, A. Utilização de carvão e subprodutos da carbonização vegetal na agricultura: aprendendo com as Terras Pretas de Índio. **TEIXEIRA, WG; KERN, DC; MADARI, BE; LIMA, HN**, p. 285-296, 2009.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 1-13, 2004.
- BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 837-842, 1985.
- C JESUS, E.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; DE S MOREIRA, F. M. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME J**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.
- CASTALDI, S.; RIONDINO, M.; BARONTI, S.; ESPOSITO, F. R.; MARZAIOLI, R.; RUTIGLIANO, F. A.; VACCARI, F. P.; MIGLIETTA, F. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes. **Chemosphere**, v. 85, n. 9, p. 1464-1471, 2011.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; DE F. GUIMARÃES, M.; FONSECA, I. C. B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the state of Parana, Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2002.

- CHAN, K.; VAN ZWIETEN, L.; MESZAROS, I.; DOWNIE, A.; JOSEPH, S. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. **Soil Research**, v. 45, n. 8, p. 629-634, 2008.
- CHELIUS, M.; TRIPLETT, E. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbial ecology**, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.
- CHEN, J.; LIU, X.; ZHENG, J.; ZHANG, B.; LU, H.; CHI, Z.; PAN, G.; LI, L.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; WANG, J.; YU, X. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. **Applied Soil Ecology**, v. 71, n. 0, p. 33-44, 2013.
- CLARKE, K.; GORLEY, R. User manual/tutorial. **Primer-E Ltd., Plymouth**, p. 93, 2006.
- COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 479-497, 2005.
- DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: Método da fumigação-extração. **EMBRAPA-CNPAB. Documentos**, p. 34, 1997.
- DURENKAMP, M.; LUO, Y.; BROOKES, P. C. Impact of black carbon addition to soil on the determination of soil microbial biomass by fumigation extraction. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 2026-2029, 2010.
- ELAD, Y.; DAVID, D. R.; HAREL, Y. M.; BORENSHTEIN, M.; KALIFA, H. B.; SILBER, A.; GRABER, E. R. Induction of Systemic Resistance in Plants by Biochar, a Soil-Applied Carbon Sequestering Agent. **Phytopathology**, v. 100, n. 9, p. 913-921, 2010.
- EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. **Rio de Janeiro: Embrapa Solos**, 1997.
- FARRELL, M.; MACDONALD, L.; BUTLER, G.; CHIRINO-VALLE, I.; CONDRON, L. Biochar and fertiliser applications influence phosphorus fractionation and wheat yield. **Biology and fertility of soils**, p. 1-10, 2013.
- FENG, Y.; XU, Y.; YU, Y.; XIE, Z.; LIN, X. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, n. 0, p. 80-88, 2012.
- FONSECA, G. C.; CARNEIRO, M. A. C.; COSTA, A. R.; OLIVEIRA, G. C.; BALBINO, L. C. Atributos físicos, químicos e biológicos de Latossolo Vermelho distrófico de cerrado sob duas rotações de cultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 1, p. 22-30, 2007.
- FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. D. A.; DOS SANTOS, H. P.; SILVA, C. A.; FADIGAS, F. D. S. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 64, n. 3ñ4, p. 221-230, 2002.
- GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1478, p. 187-196, 2007.
- GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. 190ñ194. **Sustainable management of soil organic matter. CAB International, Wallingford, UK**, 2000.
- GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The Terra Preta phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 1, p. 37-41, 2001.

- GRABER, E. R.; MELLER HAREL, Y.; KOLTON, M.; CYTRYN, E.; SILBER, A.; RAV DAVID, D.; TSECHANSKY, L.; BORENSHTEIN, M.; ELAD, Y. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. **Plant and soil**, p. 1-16, 2010.
- GROSSMAN, J. M.; O'NEILL, B. E.; TSAI, S. M.; LIANG, B.; NEVES, E.; LEHMANN, J.; THIES, J. E. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial ecology**, v. 60, n. 1, p. 192-205, 2010.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. Grupo A, 2007.
- HE, J.-Z.; SHEN, J.-P.; ZHANG, L.-M.; ZHU, Y.-G.; ZHENG, Y.-M.; XU, M.-G.; DI, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2364-2374, 2007.
- HU, L.; CAO, L.; ZHANG, R. Bacterial and fungal taxon changes in soil microbial community composition induced by short-term biochar amendment in red oxidized loam soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-8, 2013.
- HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278 - 285, 1998.
- INDA, A. V.; TORRENT, J.; BARRÓN, V.; BAYER, C. Aluminum hydroxy-interlayered minerals and chemical properties of a subtropical Brazilian Oxisol under no-tillage and conventional tillage. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2010.
- JONES, D.; ROUSK, J.; EDWARDS-JONES, G.; DELUCA, T.; MURPHY, D. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 113-124, 2012.
- KHODADAD, C. L.; ZIMMERMAN, A. R.; GREEN, S. J.; UTHANDI, S.; FOSTER, J. S. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 385-392, 2011.
- KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 3, p. 372-382, 2008.
- KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- KOLTON, M.; HAREL, Y. M.; PASTERNAK, Z.; GRABER, E. R.; ELAD, Y.; CYTRYN, E. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4924-4930, 2011.
- LEHMANN, J. Bio-energy in the black. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 7, p. 381-387, 2007a.
- LEHMANN, J. A handful of carbon. **Nature**, v. 447, n. 7141, p. 143-144, 2007b.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. **Biochar for environmental management: science and technology**. Earthscan, 2009.

- LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011.
- LUPATINI, M.; JACQUES, R. J. S.; ANTONIOLLI, Z. I.; SULEIMAN, A. K. A.; FULTHORPE, R. R.; ROESCH, L. F. W. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 223-233, 2013.
- MADARI, B. E.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D.; MARTIN-NETO, L.; BENITES, V.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. Matéria Orgânica dos Solos Antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): suas características e papel na sustentabilidade da Fertilidade do Solo. Teixeira, W. G.; Kern, D. C.; Madari, B. E.; Lima, E. N.; Woods, W. I. **As terras Pretas de Índio da Amazônia: Sua Caracterização e Uso deste Conhecimento na Criação de Novas áreas**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil, 2009.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton university press Princeton, v. 179, 1988.
- MAIA, C. M. B. F.; MADARI, B. E.; NOVOTNY, E. H. **Advances in Biochar Research in Brazil**. v. 5, 2011. Acesso em: 2011.
- MAJOR, J.; RONDON, M.; MOLINA, D.; RIHA, S.; LEHMANN, J. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and soil**, v. 333, n. 1-2, p. 117-128, 2010.
- MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 323-327, 1999.
- METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome research**, v. 15, n. 12, p. 1767-1776, 2005.
- MEURER, E. J. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. **NOVAIS, RF et al. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS**, p. 65-90, 2007.
- MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006, 729 p.
- MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA, 2008.
- NAVARRETE, A. A.; CANNAVAN, F. S.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. A Molecular Survey of the Diversity of Microbial Communities in Different Amazonian Agricultural Model Systems. **Diversity**, v. 2, n. 5, p. 787-809, 2010.
- NAVARRO-NOYA, Y. E.; SUÁREZ-ARRIAGA, M. C.; ROJAS-VALDES, A.; MONTAYA-CIRIACO, N. M.; GÓMEZ-ACATA, S.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; DENDOOVEN, L. Pyrosequencing analysis of the bacterial community in drinking water wells. **Microbial ecology**, v. 66, n. 1, p. 19-29, 2013.
- NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E.; SPARKS, D.; PAGE, A.; HELMKE, P.; LOEPPERT, R.; SOLTANPOUR, P.; TABATABAI, M.; JOHNSTON, C.; SUMNER, M. Total carbon, organic carbon, and organic matter. **Methods of soil analysis. Part 3-chemical methods**, p. 961-1010, 1996.
- NOVAK, J. M.; LIMA, I.; XING, B.; GASKIN, J. W.; STEINER, C.; DAS, K.; AHMEDNA, M.; REHRAH, D.; WATTS, D. W.; BUSSCHER, W. J. Characterization of designer biochar

produced at different temperatures and their effects on a loamy sand. **Annals of Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 2, 2009.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, M.; GOMES, J.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial ecology**, v. 58, n. 1, p. 23-35, 2009.

OKUBO, A.; SUGIYAMA, S.-I. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. **Ecological Research**, v. 24, n. 6, p. 1399-1405, 2009.

PACE, N. R. Microbial ecology and diversity. **American Society of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 328 - 333, 1999.

PACHECO, L. P.; LEANDRO, W. M.; MACHADO, P. D. A.; ASSIS, R. D.; COBUCCI, T.; MADARI, B. E.; PETTER, F. A. Produção de fitomassa e acúmulo e liberação de nutrientes por plantas de cobertura na safrinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 17-25, 2011.

PETTER, F. A. **Biomassa carbonizada como condicionador de solo: aspectos agrônômicos e ambientais de seu uso em solos de Cerrado**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PIETIKÄINEN, J.; KIIKKILÄ, O.; FRITZE, H. Charcoal as a Habitat for Microbes and Its Effect on the Microbial Community of the Underlying Humus. **Oikos**, v. 89, n. 2, p. 231-242, 2000.

POWLSON, D.; HIRSCH, P.; BROOKES, P. The role of soil microorganisms in soil organic matter conservation in the tropics. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 61, n. 1-2, p. 41-51, 2001.

QUILLIAM, R. S.; MARSDEN, K. A.; GERTLER, C.; ROUSK, J.; DELUCA, T. H.; JONES, D. L. Nutrient dynamics, microbial growth and weed emergence in biochar amended soil are influenced by time since application and reapplication rate. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 158, p. 192-199, 2012a.

QUILLIAM, R. S.; RANGE-CROFT, S.; EMMETT, B. A.; DELUCA, T. H.; JONES, D. L. Is biochar a source or sink for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds in agricultural soils? **GCB Bioenergy**, 2012b.

RANJARD, L.; LEJON, D. P. H.; MOUGEL, C.; SCHEHRER, L.; MERDINOGLU, D.; CHAUSSOD, R. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1111-1120, 2003.

REATTO, A.; DA SILVA, E. M.; BRUAND, A.; MARTINS, E. S.; LIMA, J. E. F. W. Validity of the centrifuge method for determining the water retention properties of tropical soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, n. 6, p. 1547-1553, 2008.

RITZ, K.; YOUNG, I. M. Interactions between soil structure and fungi. **Mycologist**, v. 18, n. 2, p. 52-59, 2004.

RUGMINI, P.; BALAGOPALAN, M.; JAYARAMAN, K. Modelling the growth of teak in relation to soil conditions in the Kerala part of the Western Ghats. 2007.

SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, I. P. D.; MORAIS, R. F. D.; URQUIAGA, S. C.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Componentes da parte aérea e raízes de pastagens de *Brachiaria* spp. em diferentes idades após a reforma, como indicadores de produtividade em ambiente de Cerrado.

Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics), v. 37, n. 2, p. 119-124, 2007.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.

SOHI, S.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. A review of biochar and its use and function in soil. **Advances in Agronomy**, v. 105, p. 47-82, 2010a.

SOHI, S. P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. Chapter 2 - A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. In: DONALD, L. S. (Ed.). **Advances in Agronomy**. Academic Press, v. Volume 105, 2010b.

SPARLING, G. P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Soil Research**, v. 30, n. 2, p. 195-207, 1992.

SPOKAS, K. A. Impact of biochar field aging on laboratory greenhouse gas production potentials. **GCB Bioenergy**, 2012.

SPOKAS, K. A.; REICOSKY, D. C. Impacts of sixteen different biochars on soil greenhouse gas production. **Annals of Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 4, 2009.

STEINER, C.; TEIXEIRA, W. G.; LEHMANN, J.; NEHLS, T.; DE MACÊDO, J. L. V.; BLUM, W. E.; ZECH, W. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. **Plant and soil**, v. 291, n. 1-2, p. 275-290, 2007.

TAKETANI, R.; LIMA, A.; CONCEIÇÃO JESUS, E.; TEIXEIRA, W.; TIEDJE, J.; TSAI, S. Bacterial community composition of anthropogenic biochar and Amazonian anthrosols assessed by 16S rRNA gene 454 pyrosequencing. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 2, p. 233-242, 2013.

TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial ecology**, v. 59, n. 4, p. 734-743, 2010.

THIES, J. E.; RILLIG, M. C. Characteristics of biochar: biological properties. **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**, p. 85-105, 2009.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 109-122, 1999.

TÓTOLA, M.; CHAER, G. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 2, p. 195-276, 2002.

TROMPOWSKY, P. M.; BENITES, V. D. M.; MADARI, B. E.; PIMENTA, A. S.; HOCKADAY, W. C. Characterization of humic like substances obtained by chemical oxidation of eucalyptus charcoal. **Organic Geochemistry**, v. 36, n. 3, p. 1480 - 1489, 2005.

VAN ZWIETEN, L.; KIMBER, S.; MORRIS, S.; CHAN, K.; DOWNIE, A.; RUST, J.; JOSEPH, S.; COWIE, A. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. **Plant and soil**, v. 327, n. 1-2, p. 235-246, 2010.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Nitrogênio da biomassa microbiana, em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por métodos de fumigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 4, p. 411-417, 1998.

WARNOCK, D. D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T. W.; RILLIG, M. C. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and soil**, v. 300, n. 1, p. 9-20, 2007.

WARNOCK, D. D.; MUMMEY, D. L.; MCBRIDE, B.; MAJOR, J.; LEHMANN, J.; RILLIG, M. C. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: Results from growth-chamber and field experiments. **Applied Soil Ecology**, 2010.

WOOLF, D. Biochar as a soil amendment: A review of the environmental implications. 2008.

ZANÃO JÚNIOR, L. A.; LANA, R. M. Q.; GUIMARÃES, E. C. Variabilidade espacial do pH, teores de matéria orgânica e micronutrientes em profundidades de amostragem num Latossolo Vermelho sob semeadura direta. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1000-1007, 2007.

ZHANG, A.; BIAN, R.; PAN, G.; CUI, L.; HUSSAIN, Q.; LI, L.; ZHENG, J.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; HAN, X.; YU, X. Effects of biochar amendment on soil quality, crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: A field study of 2 consecutive rice growing cycles. **Field Crops Research**, v. 127, n. 0, p. 153-160, 2012.

ZHANG, A.; CUI, L.; PAN, G.; LI, L.; HUSSAIN, Q.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; CROWLEY, D. Effect of biochar amendment on yield and methane and nitrous oxide emissions from a rice paddy from Tai Lake plain, China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 139, n. 4, p. 469-475, 2010.

2.9 HIPÓTESES FORMULADAS:

- O aumento da produtividade da soja, em função das diferentes doses de biocarvão, pode ser explicado pelos microrganismos do solo e sua interação com a fertilidade;
- A diversidade microbiana do solo pode ser modificada pelas diferentes doses de biocarvão adicionadas ao solo;
- O biocarvão possui potencial de abrigar diversidades diferentes de microrganismos em relação ao solo;

3 FERTILIDADE E MICROBIOTA DE UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO DO CERRADO TRATADO COM BIOCARVÃO E SUA IMPLICAÇÃO PARA A PRODUTIVIDADE DE SOJA

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre a fertilidade do solo e os microrganismos do solo em experimento de longa duração, a partir do terceiro ano de instalação, com diferentes doses de biocarvão, conduzido com soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Também se avaliou o efeito das diferentes doses de biocarvão sobre a produtividade da soja, em função das variáveis de fertilidade, de microrganismos e físicas do solo mensuradas nos anos de 2007 a 2012, utilizando análise de regressões lineares múltiplas. O experimento foi instalado em 2006 no município de Nova Xavantina, MT. O Experimento, localizado na região do bioma Cerrado, em Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, textura Franco Argilo Arenosa foi implantado em 2006, incorporando biocarvão de árvores nativas na profundidade de 0 - 15 cm. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com 200 kg.ha⁻¹ da fórmula 00-18-18 adubação de base e quatro doses de carvão vegetal nas doses 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹. O solo foi cultivado de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). As amostragens de solo foram feitas em fevereiro dos anos de 2006 a 2012, na profundidade de 0-10 cm, sendo principalmente avaliado nos anos de 2010, 2011 e 2012. Foi avaliada a fertilidade do solo: pH, cálcio, magnésio, potássio, acidez potencial, alumínio, manganês, ferro, zinco e matéria orgânica do solo. Foram avaliados o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana do solo, a respiração basal, o quociente metabólico e o quociente microbiano. Também foi avaliada a produtividade da soja em kg ha⁻¹. O efeito da adição de biocarvão foi reduzido pela aplicação de calcário no solo. Os três primeiros anos após a aplicação do biocarvão permitiu produtividades com níveis significativos com relação ao solo controle, devido principalmente aos nutrientes presentes no biocarvão. O efeito do biocarvão sobre biomassa microbiana do solo ocorreu no quinto ano de condução do experimento, principalmente devido ao aumento da matéria orgânica do solo.

Palavras-Chave: biomassa microbiana do solo, respiração basal, matéria orgânica do solo.

FERTILITY AND MICROBIOTA HAPLUSTOX SOIL BIOCHAR AMENDED AND IT IMPLICATIONS FOR SOYBEAN PRODUCTIVITY

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate soil fertility and soil microbial biomass interaction in long term experiment in third, fourth and fifth year of experiment installation, with soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill). The effect of different rates of biochar on soybean productivity was evaluated using soil fertility, soil microbial biomass and soil physical variables measures in 2007 to 2012, using multiple linear regressions.

repetitions (blocks) and 5 treatments (charcoal doses: 0, 2, 4, 8 and 16 Mg ha⁻¹), plot design 10 x 4 m. In 2006, charcoal was ground and incorporated in soil at 0-15 cm, when the experiment was installed. Soil samples were collected during February of 2007 to 2012, at the soybean flowering. Soil fertility were estimated: pH, calcium, magnesium, potassium, potential acidity, aluminum, iron, zinc, manganese and organic matter. Soil microbial biomass estimated were: basal respiration, biomass carbon and nitrogen, metabolic quotient and microbial quotient. Soybean productivity (kg ha⁻¹) was too estimated. The lime application in the soil reduced soil biochar effects. Therefore, aluminum and pH increase in soil amended, and productivity level was significant than soil control. Carbon microbial biomass was significant only in 2012, due organic matter increase in zero-tillage system.

Key words: basal respiration, soil organic matter, zero tillage, soil microbial biomass.

3.1 INTRODUÇÃO

O biocarvão é uma forma de carbono orgânico de alta estabilidade, produzido através do processo de pirólise (Andrade et al., 2002). A palavra biocarvão é utilizada especificamente para a biomassa carbonizada produzido com o objetivo de aplicar no solo para o efeito de sequestro de carbono e/ou aumento do potencial produtivo do mesmo (Maia et al., 2011). Após aplicação no solo, ele interage com outros componentes, mostrando longa persistência no ambiente devido às propriedades diferentes das do material orgânico que lhe deu origem (Lehmann, 2007a). Esse comportamento faz dele um bom condicionador de solo, pois não é facilmente degradado e não pode ser devolvido prontamente para a atmosfera como CO₂, mesmo sob condições ambientais e biológicas favoráveis, tais como aquelas que podem prevalecer no solo (Sohi et al., 2010b).

De acordo com Kolton et al. (2011), o biocarvão no solo induz a abundância de grupos de bactérias associados à degradação de compostos aromáticos e que são os responsáveis pelo efeito benéfico do biocarvão no solo. Dentre outras propriedades no solo, o biocarvão também pode atuar na resistência de plantas à patógenos (Elad et al., 2010), na produtividade das culturas, na melhoria da fertilidade do solo (Farrell et al., 2013), na diminuição das emissões de gases de efeito estufa no solo (Zhang et al., 2010) e na melhora da biomassa vegetal de culturas (Van Zwieten et al., 2010). C Jesus et al. (2009) encontraram efeitos para o pH e Al³⁺, quando avaliaram solo de Terra Preta de Índio do Amazonas e indicaram o solo ácido como importante fator determinante da comunidade bacteriana no solo.

Até o momento, muitos dos efeitos de curto prazo que o biocarvão apresenta sobre o crescimento de plantas e o comportamento no solo, revelados em estudos sob condições ambientais controladas (laboratório ou casa de vegetação), não são observados em estudos em condições de campo, o que enfatiza a necessidade de experimentos de campo de longa duração para auxiliarem a obtenção de informações que ajudem na gestão agrônômica que envolva o biocarvão no solo (Jones et al., 2012). Pouco é conhecido sobre as condições de campo em que o biocarvão pode ser efetivamente adicionado ao solo, doses a serem utilizadas e, principalmente, quando se relaciona os solos em condições de plantio direto ou plantio convencional, e seu efeito nas diferentes culturas, principalmente nos solos do Cerrado brasileiro. Confirmando essa diferença entre o efeito em curto prazo de aplicação e o efeito em longo prazo, Castaldi et al. (2011) observaram o efeito do biocarvão na atividade de microrganismos aos 3 meses e após 14 meses da sua aplicação resultando que aos três meses o aumento na respiração basal foi devido ao aumento transitório do pH no solo, não sendo verificado esse efeito aos 14 meses.

Para Jones et al. (2012), o biocarvão fresco quando é aplicado no solo possui pouco potencial biológico e que após algum tempo no solo, esse potencial biológico é acrescentado pelos microrganismos existentes no solo. Mas além do potencial biológico no solo o biocarvão também possui potencial como fertilizante. De acordo com Lehmann (2007a), a retenção de cátions de biocarvão fresco é relativamente baixo quando comparado com biocarvão com algum tempo no solo e não está claro em que condições e em que período de tempo o biocarvão desenvolve suas propriedades adsorventes. Dessa forma, é importante considerar a composição elementar do biocarvão antes de esse ser aplicado no solo. Logo depois de sua formação, o biocarvão pode possuir poder de calagem, por apresentar altos teores de carbonato de cálcio e de magnésio (Van Zwieten et al., 2010), além de outros nutrientes essenciais às plantas, como o K e P, além de micronutrientes como o Mn, Fe, Cu, Zn e Mo (Novak et al., 2009; Graber et al., 2010).

As respostas iniciais das plantas ao biocarvão variam de acordo com os componentes (principalmente nutrientes) do biocarvão, com o tipo de solo e com a espécie da planta utilizada, assim como com o tipo de resíduo utilizado para a produção do biocarvão. Van Zwieten et al. (2010), verificaram diferenças no efeito do biocarvão com relação ao tipo de solo. Os efeitos foram positivos para a correção de Al e acréscimo na fertilidade em solos ácidos. Além disso, sobre os parâmetros os efeitos sobre os parâmetros

microbiológicos puderam ser verificados em solos ácidos e em solos calcários, dependendo da planta utilizada.

Nesse contexto, o primeiro objetivo desse estudo foi avaliar, a interação entre a fertilidade e os microrganismos do solo em experimento de longa duração, a partir do terceiro ano de instalação, com diferentes doses de biocarvão (2, 4, 8, 16 Mg ha⁻¹ e o controle), conduzido com soja (*Glycine max* (L.) Merrill. Os dados foram mensurados nos anos de 2010 a 2012 e a relação entre eles analisadas por correlações canônicas. O segundo objetivo foi verificar o efeito dos parâmetros do solo que foram mensurados nos resultados de produtividade da soja, obtidos desde o início de implantação do experimento. Para isso, avaliou-se o efeito das diferentes doses de biocarvão (2, 4, 8, 16 Mg ha⁻¹ e a testemunha) sobre a produtividade da soja, em função das variáveis de fertilidade, de microrganismos e físicas do solo que foram mensuradas, nos anos de 2007 a 2012. Para essas análises foram feitas regressões lineares múltiplas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Condições Experimentais

O experimento em campo foi instalado em Nova Xavantina, Mato Grosso, no bioma Cerrado, em setembro de 2006 (14° 35' 36" de latitude e 52° 24' 04" de longitude e altitude de 310 m). O solo no local é um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico (LAd, Embrapa, 2006), textura Franco Argilo Arenosa. Antes da implantação a área do experimento foi utilizada para produção de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) seguindo sucessão soja ã pousio, adotando práticas de manejo com mínimo revolvimento do solo. Antes da instalação do experimento, o solo apresentava as seguintes características: pH (H₂O): 5,6; P: 6,7 mg/dm³ (método de Mehlich); K⁺: 61,5 mg/dm³; Ca⁺²: 1,4 cmol_c/dm³; Mg⁺²: 0,4 cmol_c/dm³; Al⁺³: 0,13 cmol_c/dm³; H+Al: 4,98 cmol_c/dm³; V%: 27; CTC: 6,93 cmol_c/dm³; M.O.: 12,6 g/dm³; Fe: 75,0 mg/dm³; Mn: 49 mg/dm³; Zn: 45 mg/dm³; Cu: 1,7 mg/dm³; Argila: 307 g kg⁻¹; Silte: 73 g kg⁻¹; e Areia: 620 g kg⁻¹. Maiores detalhes sobre esse estudo, no início de sua implantação podem ser verificados em Petter (2010). Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições e quatro doses de carvão vegetal como fonte de biocarvão (2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹) e a testemunha (0 Mg ha⁻¹). Cada parcela foi composta por nove linhas da cultura com 10 m de comprimento, totalizando 40,50 m², sendo a área útil para as avaliações de 25,20 m². O

biocarvão foi aplicado ao solo uma única vez (safra 2006/2007), sendo incorporado a uma profundidade de 0-15 cm, dois meses antes da semeadura da cultura da soja, utilizando-se enxada rotativa. Antes da incorporação ao solo, o mesmo foi moído e passado na peneira de 2 mm.

Na composição elementar (química) do biocarvão, é possível verificar que as maiores proporções de macronutrientes são do Ca e K e entre os micronutrientes, Fe e Mn (49%), além de N total (0,66%) e C total (49,06%) (Petter, 2010). Assim, conforme a composição elementar, apresentou-se os teores de: nitrogênio total (N): 6,6 g kg⁻¹; Fósforo (P₂O₅ ácido cítrico): 0,3 g kg⁻¹; Fósforo (P₂O₅ total): 1,0 g kg⁻¹; K₂O: 3,3 g kg⁻¹; CaO: 5,7 g kg⁻¹; MgO: 1,1 g kg⁻¹; Enxofre (S): 0,4 g kg⁻¹; Cobre (Cu): 7,0 mg kg⁻¹; Ferro (Fe): 6.150,0 mg kg⁻¹; Manganês (Mn): 194 mg kg⁻¹; Zinco (Zn): 13,0 mg kg⁻¹; Molibdênio (Mo): 2,0 mg kg⁻¹; Cobalto (Co): 1,0 mg kg⁻¹; Boro (B): 5,0 mg kg⁻¹; Carbono total (C): 490,6 g kg⁻¹; Umidade: 50 g kg⁻¹; Material mineral total: 280 g kg⁻¹; Relação C:N: 87 g kg⁻¹. Na Tabela 3.1 é possível verificar a magnitude da composição química dos teores de nutrientes no biocarvão com base em sua composição elementar e em função de cada dose aplicada.

Tabela 3.1. Magnitudes dos teores de nutrientes das diferentes doses de biocarvão quando adicionados ao solo e os teores desses nutrientes no solo antes da instalação do experimento.

Experimento:					
Nutrientes	Teor no solo ¹	Teores nas doses de biocarvão (Mg ha ⁻¹)			
		2	4	8	16
----- cmol _c dm ⁻³ -----					
Ca	1,40	0,03	0,05	0,11	0,22
Mg	0,40	0,01	0,01	0,03	0,06
----- mg kg ⁻¹ -----					
K	61,50	3,65	7,30	14,60	29,21
P	6,70	0,17	0,35	0,70	1,40
N	---	8,80	17,60	35,20	70,40
S	---	0,53	1,07	2,13	4,27
Cu	1,70	0,01	0,02	0,04	0,07
Fe	75,00	8,20	16,40	32,80	65,60
Mn	49,00	0,26	0,52	1,03	2,07
Zn	45,00	0,02	0,03	0,07	0,14
Mo	---	0,00	0,01	0,01	0,02
Co	---	0,00	0,00	0,01	0,01
B	---	0,01	0,01	0,03	0,05
----- g kg ⁻¹ -----					
C	7,31	0,65	1,31	2,62	5,23

¹ Teor de nutrientes no solo antes da instalação do experimento.

Antes da implantação do experimento, em setembro de 2006, o calcário (2 Mg ha^{-1}) foi aplicado e incorporado na área. Posteriormente foi semeado milheto (*Pennisetum glaucum*) na área experimental, visando à formação de palhada. Dois dias antes da semeadura da soja foi realizada dessecação de manejo na área experimental. A semeadura da soja (cultivar TMG 108 RR®) foi realizada com o mínimo revolvimento do solo, sempre durante os primeiros dez dias do mês de dezembro, sendo distribuídas 12 sementes por metro, observando-se espaçamento de 0,45 m entre linhas e profundidade de semeadura de 2-3 cm, sendo nessa mesma operação realizada a adubação de base de 200 kg ha^{-1} da fórmula 00-18-18.

Na Figura 3.1, podem-se observar dados meteorológicos para precipitação e temperatura nas épocas em que as safras de soja foram conduzidas.

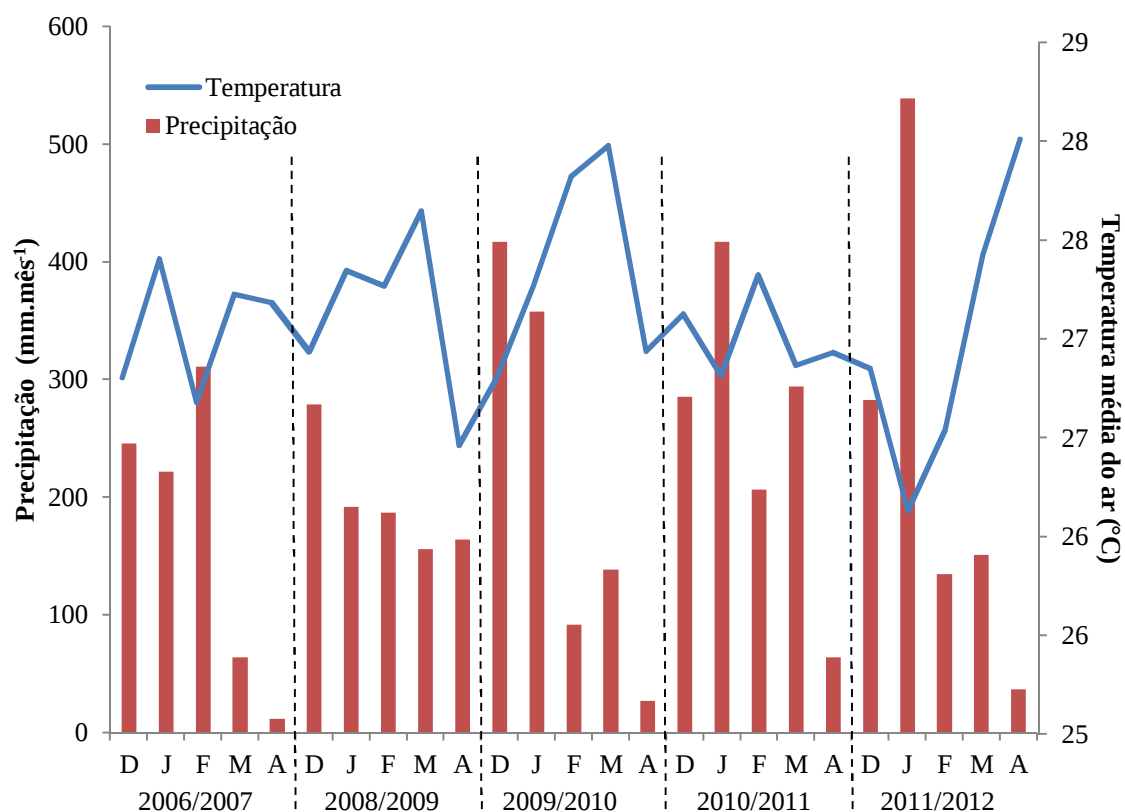


Figura 3.1. Precipitação (mm.mês^{-1}) e temperatura média do ar ($^{\circ}\text{C}$) para as épocas de safra de plantio da soja no experimento instalado com diferentes doses de biocarvão ($2, 4, 8, 16 \text{ Mg ha}^{-1}$ e testemunha) em Nova Xavantina, Mato Grosso. O plantio sempre foi realizado no início de Dezembro e as coletas de solo no início de Fevereiro.

Durante o desenvolvimento da cultura foram realizados tratamentos fitossanitários, com a aplicação do herbicida glifosato visando o controle de plantas daninhas, do inseticida metamidofos para o controle de pragas e duas aplicações de fungicidas, sendo a

primeira de trifloxistrobina + ciproconazol e a segunda com o fungicida tebuconazole visando o controle de doenças. Em 2009, a área do experimento foi conduzida com braquiária (*Urochloa brizantha*) como planta de cobertura no período entre safra. Antes do plantio da soja em 2010, a braquiária foi dessecada para formação de palhada no solo.

3.2.2 Fertilidade do solo

Em Fevereiro dos anos de 2007, 2009 (Petter, 2009), 2010, 2011 e 2012, durante a época de florescimento da soja foram coletadas amostras de solo (três repetições por parcela, para obter uma amostra composta), na profundidade de 0-10 cm para avaliação da fertilidade do solo. Foram avaliados o pH em H₂O; Ca e Mg trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; K e P extraídos pelo método Mehlich 1 e analisados por fotometria de chama e colorimetria, respectivamente; H⁺Al determinada com acetato de cálcio a pH 7,0; Mn, Zn, Fe, por leitura no espectrofotometro de absorção atômica (Embrapa, 1997). A matéria orgânica do solo (MO) foi mensurada usando o método Walkey-Black modificado (Nelson et al., 1996) sem aquecimento externo.

3.2.3 Biomassa microbiana do solo

Nos anos de 2010, 2011 e 2012, na época do florescimento da soja, foram obtidas amostras para análise da biomassa microbiana do solo na profundidade de 0-10 cm (três amostras simples para obter uma amostra composta). Após coletadas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas para a câmara fria a 4 °C.

Foram determinados o carbono da biomassa microbiana (CBM) pelo método de fumigação-extração (Vance et al., 1987); o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) de acordo com Brookes et al. (1985); respiração basal (RESP) estimado pelo CO₂ liberado e capturado em frascos com KOH (Alef & Nannipieri, 1995); quociente metabólico (qCO₂) determinado pela razão entre a taxa de respiração basal e o carbono da biomassa microbiana (Anderson et al., 1993); quociente microbiano (qMic) calculado pela relação entre o carbono da biomassa microbiana e o carbono orgânico total (Sparling, 1992).

3.2.4 Análises físicas do solo

Para as análises físicas foram coletadas amostras de solo com estrutura indeformada, por meio de um anel de aço de bordas cortantes e volume interno de 50 cm³. As amostras foram coletadas nos anos de 2009, 2010 e 2012, durante o desenvolvimento

da soja. As amostras foram conduzidas ao laboratório para a determinação da densidade do solo (DS), porosidade total (Ptotal), macroporosidade (Ma), microporosidade (Mi) de acordo com metodologia descrita em Embrapa (1997). A obtenção dos valores de microporosidade do solo foi obtido a partir dos dados da curva de retenção de água (Reatto et al., 2008).

3.2.5 Produtividade

A produtividade de grãos foi avaliada no final do ciclo da cultura na área útil da parcela, nos anos 2007, 2009 (Peter, 2010), 2010, 2011 e 2012. Os resultados foram corrigidos para 14% de umidade de grão, obtendo-se valores em kg ha⁻¹.

3.2.6 Análises Estatística

3.2.6.1 Análise de correlações canônicas

A relação entre as variáveis microbiológicas do solo e as variáveis de fertilidade do solo foi estudada através de análise de correlação canônica para os anos de 2010, 2011 e 2012. A análise de correlações canônicas é um procedimento, que encontra uma combinação linear das variáveis originais de cada conjunto de dados, chamada variável canônica, de forma que a correlação entre as duas primeiras variáveis canônicas é maximizada. A correlação entre duas variáveis canônicas é chamada de primeira correlação canônica. O procedimento continua até encontrar um segundo conjunto de variáveis canônicas não correlacionadas com o primeiro par que produz o segundo coeficiente de correlação mais elevada. O processo de construção de variáveis canônicas continua até o número de pares de variáveis canônicas se igualarem ao número de variáveis do menor grupo. Cada variável canônica é não correlacionada com todas as outras variáveis canônicas de ambos os conjuntos, exceto para uma variável canônica correspondente no conjunto oposto (Hair et al., 2007). Análise de redundância Canonical também foi usada para examinar como as variáveis originais podem ser previstas a partir das variáveis canônicas (Rugmini et al., 2007). A análise estatística para correlações canônicas foi realizada no SAS PROC CANCORR do programa estatístico SAS-STAT (Sas Institute, 2009)

3.2.6.2 Regressão linear múltipla

Regressão linear múltipla foi realizada para determinar o efeito das diferentes doses de biocarvão (Mg ha^{-1}) e os principais componentes mensuráveis no solo (variáveis de fertilidade, microbiológicas e físicas do solo) sobre a produtividade da soja. É suposto que cada componente mensurável do solo sofreu influência das diferentes doses de biocarvão, influenciando o desenvolvimento da planta e por fim, a produtividade da soja. Dessa forma, por meio de equação de regressão, é possível verificar o efeito da relação do biocarvão com os diferentes componentes mensuráveis no solo para esse experimento. As regressões foram feitas utilizando-se o PROC REG do programa estatístico SAS-STAT (Sas Institute, 2009).

3.2.6.3 Análise de variância

Utilizou-se o teste de Duncan ($p \leq 0,05$) para a análise do teste de médias e análise de variância pelo teste F. Para essas análises foram usados o PROC GLM do programa estatístico SAS-STAT (Sas Institute, 2009).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Análise de correlação canônica

O resultado da análise de correlações canônicas entre as variáveis microbiológicas do solo e as variáveis de fertilidade do solo foi significativo para a primeira correlação canônica nos anos (2010, 2011 e 2012) avaliados (Tabela 3.2). A primeira correlação canônica para os anos de 2010 e 2012 foi de 0,99 e para o ano de 2011 foi 0,98.

Os índices de redundância (Tabela 3.3) para as variáveis de fertilidade do solo foram 0,43 (2010), 0,36 (2011) e 0,36 (2012). Para as variáveis de microbiologia do solo foram 0,30 (2010), 0,36 (2011) e 0,23 (2012). Portanto em 2010 43,26% da variância das variáveis de fertilidade do solo foram explicadas pela primeira variável canônica de fertilidade. E 43,17 % da variância das variáveis de fertilidade do solo foram explicadas pela primeira variável canônica de microbiologia, e assim sucessivamente pode-se interpretar para as variáveis de 2011 e 2012.

Tabela 3.2. Análise de correlações canônicas entre as variáveis microbiológicas do solo e as variáveis de fertilidade do solo para os anos de 2010, 2011 e 2012.

	Correlação canônica	Correlação canônica ²	Proporção	Acumulado	Valor F	P > F
-----2010-----						
1	0,999016	0,998034	0,9826	0,9826	2,90	0,0038
2	0,935097	0,874407	0,0135	0,9961	0,80	0,7367
3	0,736686	0,542707	0,0023	0,9984	0,43	0,9765
4	0,644781	0,415743	0,0014	0,9997	0,35	0,9775
5	0,348503	0,121454	0,0003	10000	0,16	0,9875
-----2011-----						
1	0,985580	0,971367	0,7792	0,7792	1,73	0,0795
2	0,927130	0,859569	0,1406	0,9198	1,04	0,4760
3	0,803718	0,645962	0,0419	0,9617	0,76	0,7507
4	0,745010	0,555041	0,0286	0,9903	0,69	0,7642
5	0,544730	0,296731	0,0097	10000	0,48	0,8238
-----2012-----						
1	0,997733	0,995472	0,9640	0,9640	2,32	0,0160
2	0,928093	0,861356	0,0272	0,9912	0,78	0,7590
3	0,716492	0,513361	0,0046	0,9958	0,45	0,9718
4	0,612160	0,374740	0,0026	0,9985	0,41	0,9552
5	0,507709	0,257769	0,0015	10000	0,40	0,8797

Tabela 3.3. Análise de redundância para as variáveis de fertilidade do solo e variáveis de microbiologia de solo para a primeira correlação canônica.

Variância padronizada das variáveis de fertilidade do solo explicada			
Por suas próprias variáveis canônicas		Pela variável canônica oposta	
	Proporção	R ² canônico	Proporção
2010	0,4326	0,9980	0,4317
2011	0,3665	0,9714	0,3560
2012	0,3568	0,9955	0,3552
Variância padronizada das variáveis de microbiologia do solo explicada			
Por suas próprias variáveis canônicas		Pela variável canônica oposta	
	Proporção	R ² canônico	Proporção
2010	0,3064	0,9980	0,3058
2011	0,3634	0,9714	0,3530
2012	0,2276	0,9955	0,2266

Nas variáveis de microbiologia do solo de 2010, 30,64% da variância das variáveis de microbiologia do solo foram explicadas pela primeira variável canônica de microbiologia. E, portanto, 30,58% da variância das variáveis de microbiologia do solo foram explicadas pela primeira variável canônica de fertilidade. Da mesma forma podem-se interpretar os valores de variância para os anos de 2011 e 2012.

3.3.1.1 Fertilidade do solo

As cargas cruzadas canônicas, correlação das variáveis de microbiologia do solo e as correlações canônicas das variáveis de fertilidade do solo e a correlação das variáveis de fertilidade do solo com as correlações canônicas das variáveis de microbiologia do solo, para os anos 2010, 2011 e 2012 são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Correlação das variáveis de microbiologia do solo e as correlações canônicas das variáveis de fertilidade do solo, e correlação das variáveis de fertilidade do solo com as correlações canônicas das variáveis de microbiologia do solo, ano 2010, 2011 e 2012.

Variáveis de fertilidade do solo	2010	2011	2012
	BMS	BMS	BMS
pH (pH, H ₂ O)	0,8163	0,7048	0,6636
Ca (Cálcio, mmolc/dm ³)	0,8835	0,8161	0,6665
Mg (Magnésio, mmolc/dm ³)	0,7587	0,5502	0,5536
Al (Alumínio, mmolc/dm ³)	-0,6832	-0,5569	-0,5921
H+Al (Acidez potencial, mmolc/dm ³)	-0,3489	-0,1181	0,1146
P (Fósforo, mg dm ⁻³)	-0,0738	0,1950	-0,2261
K (Potássio, cmol _c dm ⁻³)	0,1453	0,5650	0,3438
Zn (Zinco, mg dm ⁻³)	-0,5717	0,4061	0,6217
Fe (Ferro, mg dm ⁻³)	-0,6144	-0,5652	-0,7562
Mn (Manganês, mg dm ⁻³)	0,7075	0,6349	0,5286
MO (Matéria orgânica do solo, g dm ⁻³)	0,9522	0,9392	0,9723
Variáveis microbiológicas do solo	FERT	FERT	FERT
	FERT	FERT	FERT
CBM (Carbono da biomassa microbiana, mg _C .g ⁻¹ solo)	-0,1470	-0,3165	0,7767
NBM (Nitrogênio da biomassa microbiana, mg _N .g ⁻¹ solo)	0,5767	-0,0223	0,2682
RESP (Respiração Basal, mg.CO ₂ .g ⁻¹ solo)	0,3641	0,7513	0,6279
qCO₂ (Quociente metabólico, C-CO ₂ .g ⁻¹ C _{microbiano} .h ⁻¹)	0,4028	0,6571	0,2521
qMic (Quociente microbiano, mg _{CBM} .mg ⁻¹ COT)	-0,9381	-0,8173	0,0066

BMS (Variáveis de microbiológicas do solo); FERT (Variáveis de fertilidade do solo); em negrito = maiores correlações canônicas positivas e negativas.

As variáveis de fertilidade de solo que contribuíram para a primeira correlação canônica em todos os anos foram o pH, Ca, Mg, Al, Zn, Fe, Mn e MO. Esses nutrientes

foram os mesmos presentes em maior quantidade na composição elementar do biocarvão (Tabela 3.1) antes desse ser adicionado ao solo. Quanto maior a dose de biocarvão adicionada ao solo, maior o teor de Ca, Mg, Fe, Zn e Mn adicionados. Para o biocarvão, similares resultados foram encontrados por Graber et al., (2010) em biocarvão de citrus para altos teores de Ca e Fe (1,8 e 1,1%) e menores teores de K, Mg e Mn. Norvak et al. (2009) analisando biocarvão de cascas de nozes verificaram altos teores de Ca, Mg, K e menores para Fe, Zn e Mn.

O pH (0,81; 0,70 e 0,66 respectivamente), o Ca (0,88; 0,81 e 0,66 respectivamente), o Mg (0,75; 0,55 e 0,55 respectivamente), e o Mn (0,70; 0,63; 0,52 respectivamente) contribuíram com valores positivos para a primeira correlação canônica (Tabela 3.4). No entanto, esses valores decresceram a cada ano de cultivo, o que também pode ser observado no teste de médias (Figuras 3.2 e 3.3).

Van Zwieten et al. (2010) avaliaram dois biocarvões obtidos de resíduo de fábrica de papel, em experimento por dois meses em casa de vegetação, e ambos possuíam efeito de calagem de 30% de CaCO_3 . Eles relatam que o uso em solo ácido aumentou o pH significativamente (de 4,20 para 4,73) e reduziu o Al trocável ($2 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$) para um teor não detectado, elevando o nível de Ca disponível no solo (de 1,23 para 8,87 $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$) em comparação ao solo controle, resultados que não ocorreram para o solo calcário com os mesmos biocarvões. No entanto, para o experimento em estudo, a aplicação de calcário em 2006 provavelmente reduziu o efeito a ser observado das doses de biocarvão aplicadas no solo, de forma que não foi possível detectar as diferenças entre os tratamentos pelos testes de análises de média (Figuras 3.2 e 3.3), mas foi possível verificar, principalmente no ano de primeira safra do experimento (2007), a tendência de maiores valores de pH, Ca e Fe, especialmente com relação à maior dose (16 Mg ha^{-1}).

A variável Al contribuiu com valores negativos para a primeira correlação canônica (-0,68; -0,55 e -0,59, respectivamente). Esses valores negativos podem estar relacionados com a menor disponibilidade de Al no solo em presença do Ca e Mg. De acordo com Inda et al. (2010) o carbono orgânico dissolvido na solução do solo também influencia na formação de complexos Al-orgânicos. Em 2012, os teores de Al aumentaram muito no solo (Figura 3.2), e os teores de Ca e Mg diminuíram. De acordo com Vieira et al. (2008), o baixo teor de bases no solo e a alta saturação de Al aumentaram a acidez do solo, principalmente devido à extração na remoção durante a safra de grãos, durante os cinco anos de cultivo do solo sem aplicação de calcário.

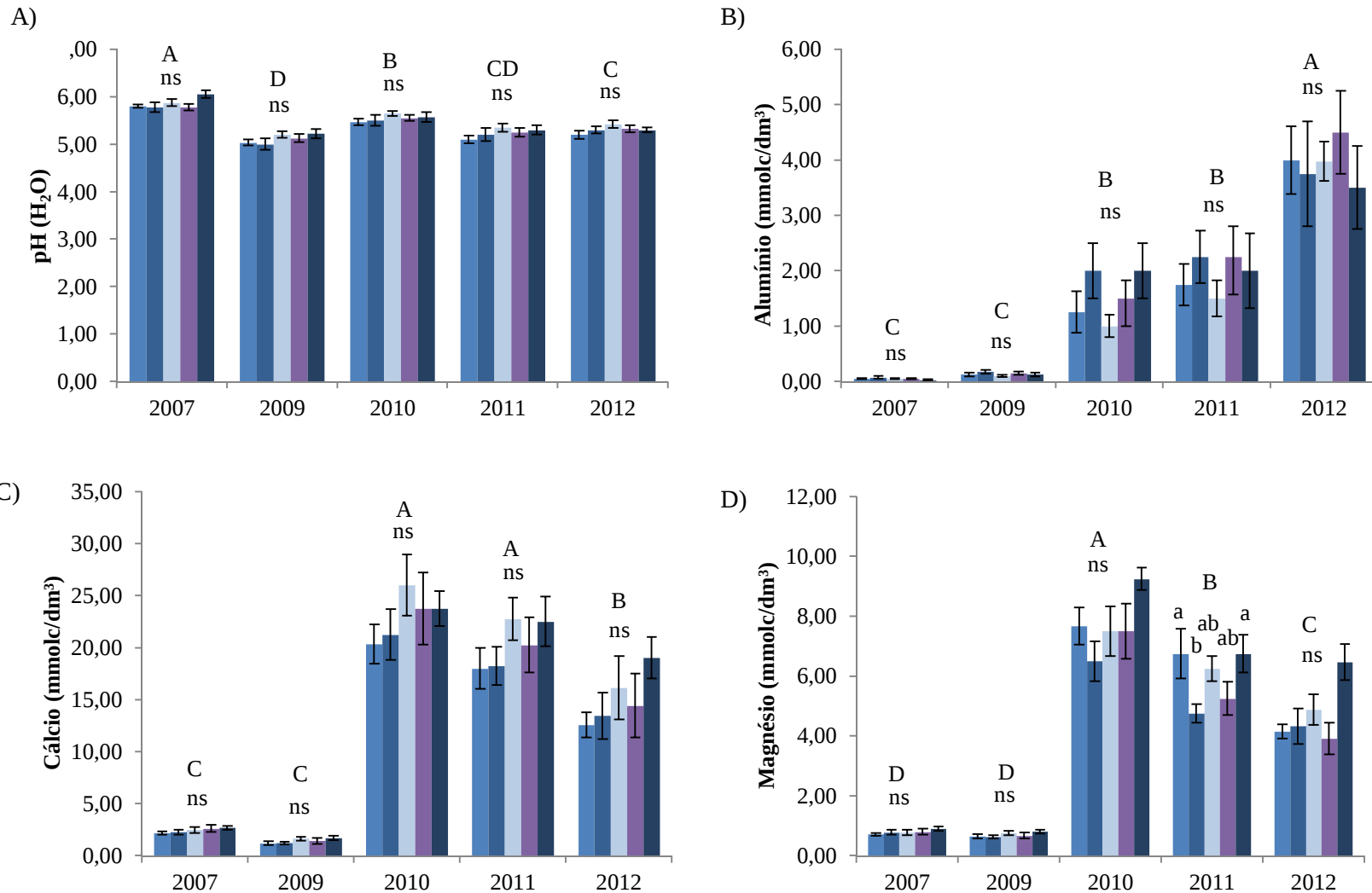


Figura 3.2. Efeito dos diferentes anos, para a testemunha (■) e as doses 2 (■), 4 (■), 8 (■), 16 (■) Mg ha⁻¹ de biocarvão para as variedades de fertilidade do experimento de campo localizado em Nova Xavantina, MT, nos valores de pH (A), Al (B), Ca (C) e Mg (D). O conjunto de barras seguido pelas mesmas letras maiúsculas não são diferentes entre os anos pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; o conjunto barras, seguidos por letras minúsculas não são diferentes entre as doses de biocarvão pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ns= não significativo; $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$).

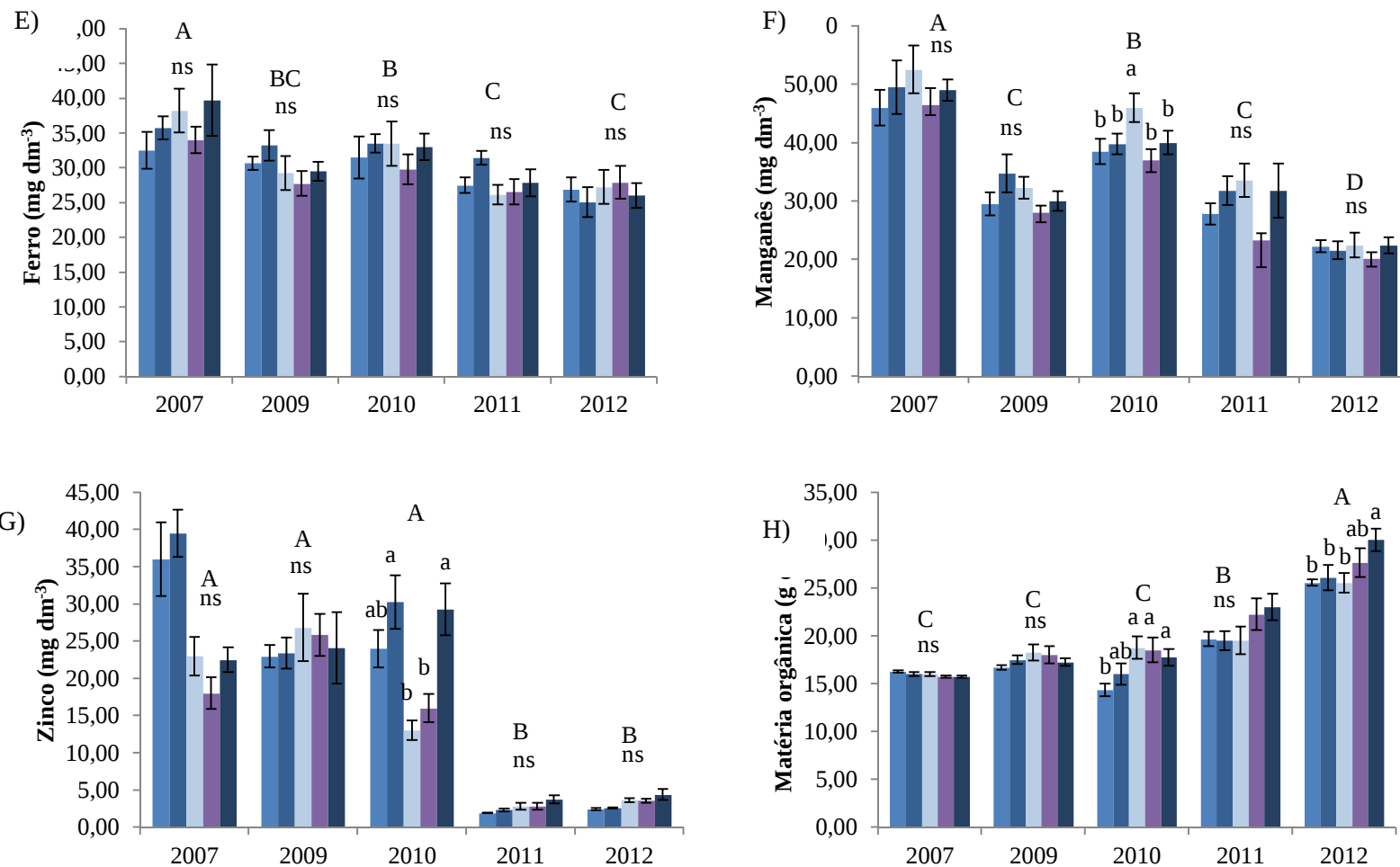


Figura 3.3. Efeito dos diferentes anos, para a testemunha (■) e as doses 2 (■), 4 (■), 8 (■), 16 (■) Mg ha⁻¹ de biocarvão para as variáveis de fertilidade do experimento de campo localizado em Nova Xavantina, MT, nos valores de Fe (E), Mn (F), Zn (G) e M.O. (H). O conjunto de barras seguido pelas mesmas letras maiúsculas não são diferentes entre os anos pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; o conjunto de barras, seguidos pelas mesmas letras minúsculas não são diferentes entre as doses de biocarvão pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ns= não significativo; $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$).

É importante observar que no ano de 2010, o plantio direto da soja foi feito sobre palhada de *Urochloa brizantha*. Braquiárias são caracterizadas por possuírem denso sistema radicular até 40 cm de profundidade do solo, podendo ter raízes em até um metro de profundidade (Santos et al., 2007). De acordo com Pacheco et al. (2011), as pastagens são responsáveis por liberarem gradativamente, depois de dessecadas em plantio direto, os nutrientes fixados pelas folhas. Isto pode explicar, parcialmente, o aumento do Ca, Mg, P, K, Fe, Mn e Zn na amostragem de 2010. Muitos desses nutrientes, na implantação do experimento, ao serem adicionados ao solo pelo carvão, foram lavados, através da intensa precipitação, e reagiram ou foram lixiviados do solo.

O Mn teve contribuição positiva nas primeiras correlações canônicas (0,70; 0,63 e 0,52 respectivamente). Na Figura 3.3 é possível observar que os teores de Mn decresceram com os anos de cultivo de soja. De acordo com Andrade et al. (2002), a solubilidade do Mn no solo é influenciada por teores de MO principalmente, pois esta é uma das principais fontes de Mn no solo. Excessos de Ca, Mg e Fe podem causar deficiência de Mn no solo (Abreu et al., 2007) mas, mais importante ainda é que, valores de Mn aumentam com a diminuição do pH do solo (Zanão Júnior et al., 2007) e como o Al, também são tóxicos às plantas (Meurer, 2007). No experimento, o pH do solo com valores entre 5,0 e 5,5, principalmente a partir do ano de 2009 (Figura 3.2), confirma a maior disponibilidade do Mn no solo.

Para o Fe, os valores que contribuíram para a correlação canônica foram negativos (-0,61; -0,56 e -0,75 respectivamente) e seus teores no solo foram menores, conforme o ano de cultivo (Figura 3.3). De acordo com Castro Filho et al. (2002), em sistema plantio direto, onde há adições constantes de MO no solo durante os anos de cultivos, os teores de Fe estão altamente correlacionados com os teores de MO. O efeito da MO no controle da disponibilidade de Fe no solo ocorre devido esse elemento estar mais ligado a fração orgânica que a óxidos de Fe, formando complexos Fe-ácidos fúlvicos (Zanão Júnior et al., 2007). Além da MO, altos teores de Mn também influenciam na deficiência de Fe no solo (Abreu et al., 2007).

A contribuição do Zn na primeira variável canônica para 2010 foi negativa (-0,57), no entanto, positiva para os anos de 2011 (0,40) e 2012 (0,62). Em 2011 e 2012, os valores menores de Zn podem estar relacionados à extração na remoção durante a safra de grãos, durante os três anos anteriores. Grandes quantidades de Zn também podem se associar a fração orgânica do solo, levando à sua deficiência (Abreu et al., 2007).

A MO foi a variável que mais contribuiu para a primeira correlação canônica, apresentando o maior acréscimo no último ano, com 0,95 para 2010, 0,94 para 2011 e 0,97 para 2012. O acréscimo dos valores de MO de acordo com os anos também pode ser observado na Figura 3.3. A condução do experimento em sistema de cultivo mínimo permitiu acréscimos nos teores de MO do solo de um ano para outro, mas nos dois primeiros anos (2007 e 2009) não se observaram diferenças estatísticas entre os valores de MO. Farrell et al. (2013), avaliando experimentos com biocarvão, também não observaram efeito no carbono orgânico do solo nos dois anos de sua avaliação. No entanto, no experimento em estudo, no ano de 2010 o solo controle se diferenciou das doses 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ e em 2012 o solo controle se diferenciou apenas da dose 16 Mg ha⁻¹. De acordo com Inda et al. (2010), sistemas de manejo com baixa remoção do solo aumentam o teor de MO, e mudanças nas frações da MO são mostradas principalmente na camada superficial do solo, devido a acumulação de resíduos de planta na superfície (Freixo et al., 2002), principalmente devido a introdução da braquiária.

3.3.1.2 Biomassa microbiana do solo

As variáveis microbiológicas contribuíram de formas diferentes em cada ano de cultivo na primeira correlação canônica (Tabela 3.2). O qMic é um indicador que representa a fração de C lábil do solo e fornece uma medida da qualidade da matéria orgânica do solo (Tótolá & Chaer, 2002). O qMic diminuiu no solo a cada ano do plantio de soja, iniciando com valores negativos, (-0,93) em 2010 e (-0,81) 2011, no entanto com valores positivos (0,006) em 2012, com baixa adição na primeira correlação canônica (Tabela 3.2). Em contrapartida, em 2012, o CBM contribuiu positivamente com a primeira correlação canônica (0,77), ao contrário das contribuições negativas dos anos de 2010 (-0,14) e 2011 (-0,31). A RESP contribuiu em 2011 (0,75) e 2012 (0,62) com a primeira correlação canônica.

Resultados para o teste de médias da biomassa microbiana do solo no ano de 2012 podem ser verificados na Tabela 3.5. O efeito do biocarvão nos teores de MO e de BMS do solo foram significativos em 2012, devido, principalmente, ao aumento da MO, após 5 anos de cultivo. Jones et al. (2012), avaliando experimento de campo por três anos, observaram diferença significativa para a RESP apenas no segundo ano de produção no solo, concluindo que o biocarvão teve pouco efeito sobre a mineralização da MO do solo. Quilliam et al. (2012a), não observaram mudanças significativas para o crescimento de

plantas, teor de nutrientes no solo e na dinâmica da comunidade microbiana, quando observou solo com e sem biocarvão por três anos. Chen et al. (2013) também não verificaram mudanças significativas para a biomassa microbiana do solo em experimento de longa duração de três anos. No entanto, verificou aumento da comunidade de bactéria e decréscimo da comunidade de fungos com as doses crescentes de biocarvão utilizadas. Embora esses autores indicassem que a falta de resultados foi devido à alta sorção de células lisadas pelo processo de fumigação, nas partículas de biocarvão, a diferença que eles mostraram sobre a diferença no crescimento de bactérias e fungos nos solos com biocarvão explicam que os resultados para biomassa microbiana no solo não poderia ter sido diferente.

Tabela 3.5. Efeito do biocarvão para biomassa microbiana do solo, no ano de 2012, após seis anos de condução de experimento com diferentes doses de biocarvão aplicados ao solo.

Variáveis	Doses de biocarvão (Mg ha ⁻¹)									
	0		2		4		8		16	
CBM	0,34	± 0,01 B	0,39	± 0,02 AB	0,41	± 0,01 AB	0,48	± 0,02 A	0,45	± 0,02 A
NBM	0,03	± 0,00 A	0,03	± 0,00 A	0,04	± 0,00 A	0,04	± 0,00 A	0,04	± 0,00 A
RESP	0,85	± 0,06 A	0,80	± 0,10 A	1,07	± 0,07 A	0,96	± 0,09 A	0,86	± 0,09 A
qCO ₂	2,45	± 0,12 AB	1,97	± 0,14 AB	2,59	± 0,11 A	2,02	± 0,17 AB	1,86	± 0,09 B
qMIC	0,01	± 0,00 B	0,01	± 0,00 AB	0,02	± 0,00 AB	0,02	± 0,00 A	0,01	± 0,00 AB
MO	25,56	± 0,33 B	26,07	± 1,34 B	25,54	± 1,00 B	27,63	± 1,51 AB	30,03	± 1,19 A

CBM (carbono da biomassa microbiana, mg C g⁻¹ solo), NBM (nitrogênio da biomassa microbiana, mg N g⁻¹ solo), RB (respiração basal, mg CO₂ g⁻¹ solo), qCO₂ (quociente metabólico, C-CO₂ g⁻¹ C_{microbiano}), qMIC (quociente microbiano, mg CBM mg⁻¹ COT), MO (matéria orgânica do solo, g kg⁻¹). Números seguidos pelas mesmas letras nas linhas não são diferentes pelo teste de Duncan, p ≤ 0,05; ± erro padrão da média (n = 4).

Castaldi et al. (2011), observaram efeitos de biocarvão para CBM e RESP aos 3 e aos 14 meses após a incorporação de biocarvão ao solo. O RESP foi significativo aos 3 meses de aplicação conforme a doses de biocarvão aplicadas (3 e 6 kg m⁻²), mas o CBM não variou. Eles explicam que o aumento transitório do pH aos 3 meses provocou efeito positivo na atividade microbiana dos solos com biocarvão, refletindo no RESP. Esses efeitos também foram confirmados por Van Zwieten et al. (2010), quando verificaram a atividade microbiana no solo, com biocarvão recém aplicado ao solo com soja. No entanto, Jones et al. (2012), mostraram, em experimento de campo, que o biocarvão fresco ao ser aplicado no solo possui pouco potencial biológico no campo, mas após três anos no solo, o biocarvão tinha aumentado o potencial de mineralizar glicose.

3.3.2 Regressão linear múltipla para produtividade

Os resultados do teste de médias para a produtividade da soja em kg ha⁻¹ nos anos de condução do experimento podem ser verificados na Tabela 3.6. A produtividade foi significativamente maior na dose 16 Mg ha⁻¹, quando comparada ao controle, nos anos de 2007, 2009 e 2010. Farrell et al. (2013) verificaram aumento da produtividade no primeiro ano do experimento (2,58 Mg ha⁻¹) quando comparado ao segundo ano (1,98 Mg ha⁻¹), o que relacionou a quantidade de precipitação pluviométrica do ano. No experimento em estudo, a menor produtividade da soja em 2009 comparada com os anos de 2007 e 2010 pode estar relacionada com a menor quantidade de precipitação no período de Janeiro e Fevereiro (Figura 3.1), quando há maior demanda de água pela cultura. No entanto, nos anos de 2011 e 2012, com a menor disponibilidade de cátions básicos no solo e o aumento dos teores de Al disponíveis, assim como diminuição do pH, principalmente no ano de 2012, o efeito das doses de biocarvão para a produtividade não foi significativo.

Tabela 3.6. Análise da produtividade em kg ha⁻¹ de soja (*Glycine max* L.) em experimento com diferentes doses de biocarvão localizado em Nova Xavantina, MT.

Anos	Doses de biocarvão (Mg ha ⁻¹)														
	0			2			4			8			16		
2007	3010,25	± 30,85	B	3149,00	± 36,48	AB	3134,75	± 38,65	AB	3129,25	± 28,40	AB	3265,75	± 47,09	A
2009	2328,00	± 37,52	B	2522,50	± 49,70	AB	2508,25	± 56,56	AB	2502,75	± 43,10	AB	2639,25	± 61,31	A
2010	2475,25	± 19,25	C	2550,50	± 68,25	BC	3078,75	± 101,97	AB	2956,25	± 40,05	B	3306,50	± 35,46	A
2011	1869,75	± 83,95	AB	1641,67	± 57,73	B	1904,32	± 86,25	A	1913,06	± 47,01	AB	1748,24	± 58,85	AB
2012	1630,91	± 49,37	A	1578,83	± 47,69	A	1902,19	± 43,53	A	1830,63	± 92,79	A	1913,10	± 66,09	A

Números seguidos pelas mesmas letras nas linhas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$).

As regressões lineares múltiplas na Tabela 3.7 explicam para os anos de 2007, 2009, 2010, 2011 e 2012 a produtividade em função da dose de biocarvão utilizado e a variável mensurada do solo. Os R² foram maiores para as mesmas variáveis de fertilidade que acrescentaram nas correlações canônicas de 2010, 2011 e 2012. O pH, Ca, Mg, Al, Fe, Mn e MO apresentaram R² significativos ($p \leq 0,05$) em todos os anos avaliados, com exceção do ano de 2011, onde os R² foram significativos apenas para pH, Ca, Mn e MO. O K apresentou R² ($p \leq 0,05$) significativo nos primeiros anos de condução do experimento. Em 2010, ano de maior produtividade da soja, todos os parâmetros avaliados obtiveram R² significativo ($p < 0,05$).

Os parâmetros microbiológicos foram relacionados com a produtividade da soja, sendo os R² 0,54 para CBM, 0,53 para NBM, 0,56 para RESP, 0,56 para qCO₂ e 0,59 para qMic. Em 2012 o R² foi elevado para CBM (0,29), RESP, (0,41) e qCO₂ (0,36).

Tabela 3.7. Regressão linear múltipla da produtividade de soja (PROD) em função das doses de biocarvão (bc) e as variáveis mensuradas no solo, nos anos de 2007, 2009, 2010, 2011 e 2012.

2010, 2011 e 2012															
Parâmetros estimados								<i>p</i> interseção	<i>p</i> (bc)	<i>p</i> (variável)	R ²	Pr>F			
-----2007-----															
PROD	=	903,64	+	(6,81	x	bc)	+	(374,60	x	pH)	0,122	0,142	0,001	0,59	0,001
PROD	=	2811,32	+	(9,08	x	bc)	+	(111,24	x	Ca)	<0,001	0,034	0,000	0,64	<0,001
PROD	=	2803,58	+	(8,69	x	bc)	+	(354,55	x	Mg)	<0,001	0,042	0,000	0,65	<0,001
PROD	=	3149,97	+	(9,42	x	bc)	+	(-1374,36	x	Al)	<0,001	0,062	0,007	0,49	0,003
PROD	=	3099,04	+	(12,22	x	bc)	+	(-7,61	x	HAL)	<0,001	0,057	0,901	0,22	0,125
PROD	=	3028,74	+	(12,93	x	bc)	+	(2,41	x	P)	<0,001	0,042	0,713	0,22	0,118
PROD	=	2824,08	+	(14,43	x	bc)	+	(1,74	x	K)	<0,001	0,014	0,066	0,36	0,022
PROD	=	3075,45	+	(12,07	x	bc)	+	(-0,36	x	Zn)	<0,001	0,072	0,891	0,22	0,125
PROD	=	3303,55	+	(14,68	x	bc)	+	(-7,04	x	Fe)	<0,001	0,006	0,009	0,48	0,004
PROD	=	2837,22	+	(12,31	x	bc)	+	(4,65	x	Mn)	<0,001	0,030	0,074	0,35	0,025
PROD	=	2166,28	+	(14,00	x	bc)	+	(55,65	x	MO)	0,027	0,027	0,331	0,26	0,078
PROD	=	2604,02	+	(12,41	x	bc)	+	(350,83	x	DS)	0,001	0,042	0,460	0,24	0,095
-----2009-----															
PROD	=	602,85	+	(10,26	x	bc)	+	(358,77	x	pH)	0,122	0,061	<0,001	0,66	<0,001
PROD	=	2235,15	+	(10,44	x	bc)	+	(141,16	x	Ca)	<0,001	0,137	0,013	0,43	0,009
PROD	=	2111,72	+	(10,19	x	bc)	+	(466,30	x	Mg)	<0,001	0,112	0,002	0,52	0,002
PROD	=	2547,14	+	(13,92	x	bc)	+	(-966,62	x	Al)	<0,001	0,040	0,006	0,47	0,004
PROD	=	2331,35	+	(14,96	x	bc)	+	(16,58	x	HAL)	<0,001	0,081	0,813	0,17	0,205
PROD	=	2288,51	+	(16,40	x	bc)	+	(9,85	x	P)	<0,001	0,055	0,387	0,20	0,144
PROD	=	1837,76	+	(19,27	x	bc)	+	(4,65	x	K)	<0,001	0,011	0,015	0,42	0,010
PROD	=	2451,29	+	(14,59	x	bc)	+	(-1,57	x	Zn)	<0,001	0,079	0,678	0,18	0,193
PROD	=	3027,25	+	(11,43	x	bc)	+	(-19,80	x	Fe)	<0,001	0,058	0,001	0,58	0,001
PROD	=	2072,55	+	(16,16	x	bc)	+	(10,70	x	Mn)	<0,001	0,036	0,057	0,33	0,033
PROD	=	1299,11	+	(13,72	x	bc)	+	(63,80	x	MO)	<0,001	0,014	<0,001	0,66	<0,001
PROD	=	4048,90	+	(15,73	x	bc)	+	(-1299,28	x	DS)	<0,001	0,012	0,001	0,58	0,001
PROD	=	1411,75	+	(17,33	x	bc)	+	(39,84	x	Mi)	<0,001	0,007	0,001	0,58	0,001
PROD	=	2276,34	+	(14,34	x	bc)	+	(5,44	x	Ma)	<0,001	0,084	0,629	0,18	0,187
PROD	=	761,73	+	(15,73	x	bc)	+	(32,87	x	Ptotal)	0,077	0,012	0,001	0,58	0,001
-----2010-----															
PROD	=	909,83	+	(47,12	x	bc)	+	(302,95	x	pH)	0,484	<0,001	0,205	0,57	0,001
PROD	=	2275,19	+	(46,28	x	bc)	+	(13,93	x	Ca)	0,000	<0,001	0,036	0,64	<0,001
PROD	=	2356,61	+	(44,36	x	bc)	+	(32,63	x	Mg)	0,000	0,001	0,192	0,57	0,001
PROD	=	2632,05	+	(49,82	x	bc)	+	(-37,09	x	Al)	0,000	<0,001	0,409	0,54	0,001
PROD	=	3077,43	+	(49,81	x	bc)	+	(-10,12	x	HAL)	0,000	<0,001	0,400	0,54	0,001
PROD	=	2849,91	+	(46,79	x	bc)	+	(-23,51	x	P)	0,000	0,001	0,318	0,55	0,001
PROD	=	2861,50	+	(49,52	x	bc)	+	(-3,06	x	K)	0,000	<0,001	0,594	0,53	0,002
PROD	=	2741,01	+	(50,11	x	bc)	+	(-7,48	x	Zn)	0,000	<0,001	0,165	0,58	0,001
PROD	=	2726,47	+	(48,53	x	bc)	+	(-4,47	x	Fe)	0,000	<0,001	0,551	0,53	0,002
PROD	=	2038,43	+	(49,21	x	bc)	+	(13,41	x	Mn)	0,000	<0,001	0,089	0,60	<0,001
PROD	=	2188,50	+	(44,40	x	bc)	+	(24,52	x	MO)	0,000	0,001	0,124	0,59	0,001

Parâmetros estimados							<i>p</i> interseção	<i>p</i> (bc)	<i>p</i> (variável)	R ²	Pr>F
PROD	=	2920,04	+	(47,18 x bc)	+	(-935,57 x CBM)	0,000	0,001	0,511	0,54	0,001
PROD	=	2535,69	+	(50,51 x bc)	+	(252,70 x NBM)	0,000	<0,001	0,551	0,53	0,002
PROD	=	2334,64	+	(51,49 x bc)	+	(365,55 x Resp)	0,000	<0,001	0,247	0,56	0,001
PROD	=	2364,05	+	(49,77 x bc)	+	(116,16 x qCO ₂)	0,000	<0,001	0,258	0,56	0,001
PROD	=	3011,80	+	(43,15 x bc)	+	(-18223,93 x qMic)	0,000	0,001	0,122	0,59	0,001
-----2011-----											
PROD	=	-1695,00	+	(-10,60 x bc)	+	(690,55 x pH)	0,193	0,388	0,011	0,33	0,033
PROD	=	1424,036	+	(-10,54 x bc)	+	(24,52 x Ca)	<0,001	0,392	0,011	0,33	0,035
PROD	=	1590,093	+	(-6,51 x bc)	+	(51,90 x Mg)	<0,001	0,639	0,164	0,12	0,351
PROD	=	2037,499	+	(-3,56 x bc)	+	(-80,15 x Al)	<0,001	0,788	0,075	0,18	0,187
PROD	=	2734,368	+	(-3,58 x bc)	+	(-17,38 x HAL)	0,004	0,800	0,310	0,07	0,560
PROD	=	1776,513	+	(-6,31 x bc)	+	(12,18 x P)	<0,001	0,670	0,582	0,02	0,813
PROD	=	1331,324	+	(-14,16 x bc)	+	(8,93 x K)	0,001	0,338	0,101	0,16	0,239
PROD	=	1671,237	+	(-15,07 x bc)	+	(103,16 x Zn)	<0,001	0,299	0,068	0,19	0,171
PROD	=	2695,219	+	(-6,61 x bc)	+	(-28,53 x Fe)	<0,001	0,609	0,040	0,23	0,109
PROD	=	1361,983	+	(-4,96 x bc)	+	(17,81 x Mn)	<0,001	0,682	0,012	0,32	0,038
PROD	=	1116,053	+	(-14,42 x bc)	+	(39,95 x MO)	0,002	0,271	0,017	0,29	0,052
PROD	=	2124,212	+	(-2,44 x bc)	+	(-683,56 x CBM)	<0,001	0,868	0,495	0,03	0,748
PROD	=	1998,694	+	(-4,62 x bc)	+	(-4643,82 x NBM)	<0,001	0,751	0,785	0,01	0,915
PROD	=	1691,384	+	(-4,59 x bc)	+	(207,37 x Resp)	<0,001	0,742	0,217	0,09	0,434
PROD	=	1732,681	+	(-3,22 x bc)	+	(52,31 x qCO ₂)	<0,001	0,818	0,227	0,09	0,449
PROD	=	2331,44	+	(-8,28 x bc)	+	(-22166,41 x qMIC)	<0,001	0,545	0,101	0,16	0,238
-----2012-----											
PROD	=	-933,77	+	(16,82 x bc)	+	(490,40 x pH)	0,219	0,043	0,002	0,52	0,002
PROD	=	1413,55	+	(11,15 x bc)	+	(19,22 x Ca)	<0,001	0,162	0,001	0,55	0,001
PROD	=	1340,61	+	(7,63 x bc)	+	(81,01 x Mg)	<0,001	0,379	0,004	0,49	0,003
PROD	=	1895,11	+	(16,97 x bc)	+	(-57,17 x Al)	<0,001	0,053	0,007	0,46	0,005
PROD	=	1860,86	+	(20,06 x bc)	+	(-4,12 x HAL)	0,010	0,114	0,761	0,16	0,224
PROD	=	1666,70	+	(18,01 x bc)	+	(-0,16 x P)	<0,001	0,098	0,984	0,16	0,235
PROD	=	1365,96	+	(15,78 x bc)	+	(2,92 x K)	<0,001	0,138	0,337	0,20	0,146
PROD	=	1453,78	+	(8,53 x bc)	+	(80,54 x Zn)	<0,001	0,409	0,048	0,33	0,032
PROD	=	2019,45	+	(18,06 x bc)	+	(-13,40 x Fe)	<0,001	0,067	0,075	0,30	0,046
PROD	=	1296,12	+	(18,03 x bc)	+	(16,86 x Mn)	<0,001	0,073	0,121	0,27	0,068
PROD	=	1037,23	+	(10,78 x bc)	+	(24,82 x MO)	0,007	0,295	0,074	0,30	0,045
PROD	=	1177,32	+	(9,59 x bc)	+	(1299,24 x CBM)	0,001	0,371	0,092	0,29	0,055
PROD	=	1613,63	+	(17,43 x bc)	+	(1452,78 x NBM)	<0,001	0,113	0,806	0,16	0,228
PROD	=	1280,93	+	(17,87 x bc)	+	(421,00 x Resp)	<0,001	0,051	0,016	0,41	0,012
PROD	=	1110,81	+	(25,47 x bc)	+	(233,08 x qCO ₂)	<0,001	0,015	0,033	0,36	0,023
PROD	=	1673,11	+	(18,11 x bc)	+	(-690,15 x x qMIC)	<0,001	0,100	0,978	0,16	0,235
PROD	=	2668,77	+	(23,37 x bc)	+	(-722,72 x x DS)	0,006	0,043	0,246	0,22	0,118
PROD	=	1255,75	+	(16,79 x bc)	+	(12,43 x x Micro)	0,043	0,117	0,484	0,18	0,183
PROD	=	1602,65	+	(19,31 x bc)	+	(4,26 x x Macro)	<0,001	0,088	0,711	0,16	0,219
PROD	=	692,92	+	(22,91 x bc)	+	(20,48 x x Ptotal)	0,383	0,043	0,225	0,23	0,110

p é o nível de significância.

Em 2009 os R^2 (0,58) foram significativos ($p < 0,001$) para a densidade do solo, microporosidade do solo e porosidade total. Não se observaram os mesmos efeitos com relação a essas variáveis em 2012. De acordo com Major et al. (2010), a aplicação de biocarvão em uma única vez, em solo com condições de alta acidez, mostrou resultados significativos na produtividade do milho. A partir do segundo ano de condução da cultura, durante três anos consecutivos (2004, 2005 e 2006), o biocarvão forneceu benefícios na produção. A maior produtividade foi atribuída à maior absorção de Ca e Mg e aumento do pH do solo (não significativo), nos tratamentos com biocarvão.

3.4 CONCLUSÕES

- A aplicação de calcário no solo reduziu os efeitos a serem observados com a aplicação de diferentes doses de biocarvão no solo.
- Os três primeiros anos (2007, 2009 e 2010) após a aplicação do biocarvão permitiram produtividades com níveis significativos com relação ao tratamento controle.
- O efeito do biocarvão sobre os microrganismos do solo, demonstrado pelo carbono da biomassa microbiana, ocorreu no quinto ano de condução do experimento, principalmente devido ao aumento do teor de matéria orgânica do solo no sistema plantio utilizado.
- Inicialmente o biocarvão pode adicionar nutrientes no solo, mas após cinco anos, a exportação de nutrientes pelas culturas, a diminuição do pH e o aumento dos níveis de Al no solo, nas condições de solo ácido do Cerrado, reduz o efeito do biocarvão no solo, principalmente sobre a produtividade, mesmo sob a melhoria dos teores de matéria orgânica.

3.5 REFERÊNCIAS

- ABREU, C. D.; LOPES, A.; SANTOS, G.; NOVAIS, R.; ALVAREZ V, V.; BARROS, N.; FONTES, R.; CANTARUTTI, R.; NEVES, J. Micronutrientes. **NOVAIS, RF et al. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS**, p. 724-736, 2007.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, 1995, 243p.
- ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, A.; KH. The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

- ANDRADE, E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; OLIVEIRA, E. L. D. Effect of organic matter on manganese solubility. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 17-20, 2002.
- BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 837-842, 1985.
- C JESUS, E.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; DE S MOREIRA, F. M. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME J**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.
- CASTALDI, S.; RIONDINO, M.; BARONTI, S.; ESPOSITO, F. R.; MARZAIOLI, R.; RUTIGLIANO, F. A.; VACCARI, F. P.; MIGLIETTA, F. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes. **Chemosphere**, v. 85, n. 9, p. 1464-1471, 2011.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; DE F. GUIMARÃES, M.; FONSECA, I. C. B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the state of Parana, Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2002.
- CHEN, J.; LIU, X.; ZHENG, J.; ZHANG, B.; LU, H.; CHI, Z.; PAN, G.; LI, L.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; WANG, J.; YU, X. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. **Applied Soil Ecology**, v. 71, n. 0, p. 33-44, 2013.
- ELAD, Y.; DAVID, D. R.; HAREL, Y. M.; BORENSHTEIN, M.; KALIFA, H. B.; SILBER, A.; GRABER, E. R. Induction of Systemic Resistance in Plants by Biochar, a Soil-Applied Carbon Sequestering Agent. **Phytopathology**, v. 100, n. 9, p. 913-921, 2010.
- EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. **Rio de Janeiro: Embrapa Solos**, 1997.
- FARRELL, M.; MACDONALD, L.; BUTLER, G.; CHIRINO-VALLE, I.; CONDRON, L. Biochar and fertiliser applications influence phosphorus fractionation and wheat yield. **Biology and fertility of soils**, p. 1-10, 2013.
- FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. D. A.; DOS SANTOS, H. P.; SILVA, C. A.; FADIGAS, F. D. S. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 64, n. 3, p. 221-230, 2002.
- GRABER, E. R.; MELLER HAREL, Y.; KOLTON, M.; CYTRYN, E.; SILBER, A.; RAV DAVID, D.; TSECHANSKY, L.; BORENSHTEIN, M.; ELAD, Y. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. **Plant and soil**, p. 1-16, 2010.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. Grupo A, 2007.
- INDA, A. V.; TORRENT, J.; BARRÓN, V.; BAYER, C. Aluminum hydroxy-interlayered minerals and chemical properties of a subtropical Brazilian Oxisol under no-tillage and conventional tillage. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2010.

- JONES, D.; ROUSK, J.; EDWARDS-JONES, G.; DELUCA, T.; MURPHY, D. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 113-124, 2012.
- KOLTON, M.; HAREL, Y. M.; PASTERNAK, Z.; GRABER, E. R.; ELAD, Y.; CYTRYN, E. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4924-4930, 2011.
- LEHMANN, J. Bio-energy in the black. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 7, p. 381-387, 2007.
- MAIA, C. M. B. F.; MADARI, B. E.; NOVOTNY, E. H. **Advances in Biochar Research in Brazil**. v. 5, 2011. Acesso em: 2011.
- MAJOR, J.; RONDON, M.; MOLINA, D.; RIHA, S.; LEHMANN, J. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and soil**, v. 333, n. 1-2, p. 117-128, 2010.
- MEURER, E. J. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. **NOVAIS, RF et al. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS**, p. 65-90, 2007.
- NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E.; SPARKS, D.; PAGE, A.; HELMKE, P.; LOEPPERT, R.; SOLTANPOUR, P.; TABATABAI, M.; JOHNSTON, C.; SUMNER, M. Total carbon, organic carbon, and organic matter. **Methods of soil analysis. Part 3-chemical methods.**, p. 961-1010, 1996.
- NOVAK, J. M.; LIMA, I.; XING, B.; GASKIN, J. W.; STEINER, C.; DAS, K.; AHMEDNA, M.; REHRAH, D.; WATTS, D. W.; BUSSCHER, W. J. Characterization of designer biochar produced at different temperatures and their effects on a loamy sand. **Annals of Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 2, 2009.
- PACHECO, L. P.; LEANDRO, W. M.; MACHADO, P. D. A.; ASSIS, R. D.; COBUCCI, T.; MADARI, B. E.; PETTER, F. A. Produção de fitomassa e acúmulo e liberação de nutrientes por plantas de cobertura na safrinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 17-25, 2011.
- PETTER, F. A. **Biomassa carbonizada como condicionador de solo: aspectos agrônômicos e ambientais de seu uso em solos de Cerrado**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- QUILLIAM, R. S.; MARSDEN, K. A.; GERTLER, C.; ROUSK, J.; DELUCA, T. H.; JONES, D. L. Nutrient dynamics, microbial growth and weed emergence in biochar amended soil are influenced by time since application and reapplication rate. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 158, p. 192-199, 2012.
- REATTO, A.; DA SILVA, E. M.; BRUAND, A.; MARTINS, E. S.; LIMA, J. E. F. W. Validity of the centrifuge method for determining the water retention properties of tropical soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, n. 6, p. 1547-1553, 2008.
- RUGMINI, P.; BALAGOPALAN, M.; JAYARAMAN, K. Modelling the growth of teak in relation to soil conditions in the Kerala part of the Western Ghats. 2007.
- SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, I. P. D.; MORAIS, R. F. D.; URQUIAGA, S. C.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Componentes da parte aérea e raízes de pastagens de *Brachiaria* spp. em diferentes idades após a reforma, como indicadores de produtividade em ambiente

de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 37, n. 2, p. 119-124, 2007.

SOHI, S. P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. Chapter 2 - A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. In: DONALD, L. S. (Ed.). **Advances in Agronomy**. Academic Press, v. Volume 105, 2010. p. 47-82.

SPARLING, G. P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Soil Research**, v. 30, n. 2, p. 195-207, 1992.

TÓTOLA, M.; CHAER, G. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 2, p. 195-276, 2002.

VAN ZWIETEN, L.; KIMBER, S.; MORRIS, S.; CHAN, K.; DOWNIE, A.; RUST, J.; JOSEPH, S.; COWIE, A. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. **Plant and soil**, v. 327, n. 1-2, p. 235-246, 2010.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

ZANÃO JÚNIOR, L. A.; LANA, R. M. Q.; GUIMARÃES, E. C. Variabilidade espacial do pH, teores de matéria orgânica e micronutrientes em profundidades de amostragem num Latossolo Vermelho sob semeadura direta. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1000-1007, 2007.

ZHANG, A.; CUI, L.; PAN, G.; LI, L.; HUSSAIN, Q.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; CROWLEY, D. Effect of biochar amendment on yield and methane and nitrous oxide emissions from a rice paddy from Tai Lake plain, China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 139, n. 4, p. 469-475, 2010.

4 COMUNIDADES DE BACTÉRIA, ARCHAEA E FUNGO EM UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO DO CERRADO TRATADO COM BIOCARVÃO E CULTIVADO COM SOJA

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi determinar a estrutura de comunidades microbianas de bactéria, archaea e fungo em solo rizosférico e não rizosférico, com diferentes doses de biocarvão na região do Cerrado. Também foram avaliadas a diversidade microbiana no biocarvão antes de ser adicionado ao solo e após ser condicionado no solo por cinco anos, e as relações com o solo rizosférico e solo não rizosférico. O experimento de campo, localizado na região do bioma Cerrado, em Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, textura Franco Argilo Arenosa foi implantado em 2006, incorporando biocarvão de árvores nativas na profundidade de 0-15 cm. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro doses de carvão vegetal sendo 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ e a testemunha. O solo foi cultivado com soja (*Glycine max* (L.) Merrill). As amostragens de solo foram feitas em fevereiro dos anos de 2010 e 2011, coletando-se solo rizosférico e não rizosférico na profundidade de 0-10 cm. O carvão foi coletado do solo em 2011. A abundância e diversidade das estruturas de bactéria, archaea e fungo, foram caracterizadas usando a análise do poliformismo de fragmentos de restrições terminais (T-RFLP), combinada com PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Comunidades de archaea, bactéria e fungo se distinguiram entre o solo rizosférico e o solo não rizosférico. A dose 16 Mg ha⁻¹ apresentou menor diversidade quando comparada com o solo controle, se diferenciando entre o solo rizosférico e o solo não rizosférico. O biocarvão separado do solo mostrou comunidades de bactérias e archaea similares ao do solo rizosférico. A comunidade de fungo do biocarvão foi similar à do solo. Antes de ser adicionado ao solo, o biocarvão apresentou potencial de desenvolver archaea, bactéria e fungo em sua estrutura. No entanto, após ser adicionado ao solo, por algum período, o biocarvão adquiriu diversidade de microrganismos similar à do solo onde fora condicionado. Estudos com doses menores de biocarvão devem ser estimulados no sentido de verificar o efeito dessas menores doses no solo.

Palavras-Chave: T-RFLP, qPCR, diversidade microbiana, solo rizosférico, solo não rizosférico.

BACTERIA, ARCHAEA AND FUNGUS COMMUNITIES IN HAPLUSTOX SOIL BIOCHAR AMENDED AND CROPPED WITH SOYBEAN

ABSTRACT

The aim of this work was to determinate Archaeal, Bacterial and Fungal community in rhizospheric soil and bulk soil, with different rates of biochar, in Brazilian Savanna Biome. Biochar diversity was evaluated before and after (five year) amendment in

soil and diversity relationships with rhizospheric and bulk soil. Experimental design was field (Savanna Biome) experiment with randomized blocks, 4 repetitions (blocks) and 5 treatments (charcoal doses: 0, 2, 4, 8 and 16 Mg ha⁻¹), plot design 10 x 4 m. In 2006, charcoal was ground and incorporated in soil at 0-15 cm, when the experiment was installed. Soil samples were collected during February of 2010 and 2011, at the soybean flowering, collecting rhizosphere and non-rhizosphere soils (0-10 cm). Data determinations were soil microbial diversity (rhizosphere and non-rhizosphere soils) from *Bacteria*, *Archaea* and *Fungi* community in soil by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) combined with quantitative real time PCR assay (qPCR). Bacterial and Archeal diversity in rhizosphere soil were lower than diversity in bulk soil, mainly in 16 Mg ha⁻¹ biochar rate. Biochar after soil amended, showed bacterial and archaeal community similar to rhizospheric soil. Fungal community was similar of bulk soil. Before amended in soil, fresh biochar had little potential to development archaeal, bacterial and fungal in the structure. After burial in the ground in agronomic field, biochar amended in soil acquired similar microbial diversity of soil. Little biochar rates should be tested in soil.

Key words: T-RFLP, qPCR, microbial diversity, rhizospheric soil.

4.1 INTRODUÇÃO

Biocarvão é uma forma de C, produzido pelo aquecimento da biomassa em condições baixas ou ausentes de oxigênio. Quando aplicado ao solo ele pode aumentar a retenção de água e nutrientes no solo assim como ajudar no decréscimo das concentrações do CO₂ atmosférico pelo sequestro do C (Lehmann, 2007a). O biocarvão embora seja um material relativamente inerte no solo e de alta estabilidade, dependendo das condições da sua formação e das transformações por que passa no solo, tem a capacidade de contribuir para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Madari et al., 2009). No entanto, o conhecimento sobre a microbiologia do biocarvão no solo ainda é escassa (Navarrete et al., 2010).

Os solos de Terra Preta de Índio são um dos solos mais férteis do mundo (Glaser et al., 2000), pois contem altas concentrações de nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, mas também grande quantidade de matéria orgânica estável. Um dos fatores chave para a persistência do material orgânico nesses solos são fragmentos de carvão de combustão incompleta de material orgânico, que possuem estrutura aromática policíclica que permite sua persistência no ambiente por vários anos (Glaser et al., 2001). A alta fertilidade desses solos também está associada à alta diversidade de bactéria,

archaea e fungo, que se mantém nesses solos, mesmo sob cultivo intensivo (Navarrete et al., 2010).

Taketani et al. (2013) investigaram a comunidade de bactérias em solos de Terras Preta de Índio do Amazonas, solo adjacente e a comunidade de bactérias associada ao biocarvão extraído do solo, quando considerados dois tipos de solo. Foi observado que a estrutura de comunidades de bactérias do biocarvão foi similar à do solo de Terra Preta de Índio, com presença também de distintas características. A similar composição da comunidade microbiana observada entre o biocarvão e o solo de onde foi retirado, indicou que forças de seleção dos microrganismos foram semelhantes nos dois ambientes. Ocorreram microrganismos no biocarvão responsáveis exclusivamente por características que o diferenciaram do solo que o deu origem (Terra Preta de Índio), sendo que essas características devem estar relacionada a populações raras, cujo papel no solo ainda é pouco conhecido.

As relações entre as propriedades químicas e físicas do biocarvão e seus efeitos sobre a biota do solo e o concomitante efeito potencial sobre os processos ainda estão pouco entendidos (Lehmann et al., 2011). A maioria dos experimentos com biocarvão são de curta duração (Graber et al., 2010; Anderson et al., 2011; Kolton et al., 2011). Nos experimentos de longa duração, são utilizadas doses muito elevadas de biocarvão e muitas vezes o efeito que se nota são sobre as propriedades de neutralização do biocarvão no solo (Major et al., 2010; Quilliam et al., 2012b). Também pouco se conhece sobre o efeito do biocarvão no solo rizosférico (Kolton et al., 2011), principalmente, quando se considera experimentos de longa duração.

Experimentos que analisaram solos com biocarvão por três anos, verificaram que as mudanças na atividade microbiana do solo foram indiretas e sugere que o biocarvão estimulou o crescimento das plantas por meio da indução de efeitos na rizosfera, com efeitos diretos e indiretos na qualidade e quantidade de exsudatos radiculares (Graber et al., 2010; Jones et al., 2012). Os exsudatos de raízes de diferentes plantas afetaram a atividade microbiana e diferentemente a composição de bactérias no solo (Anderson et al., 2011).

Conhecimentos sobre as relações de diversidade de archaea, bactéria e fungo nos solos com biocarvão também são escassos. Estudos recentes têm utilizado ambas as técnicas tradicionais de isolamento de microrganismos do solo, como também técnicas moleculares independentes de cultivo, que possibilitam o melhor acesso a diversidade microbiana no solo (Kolton et al., 2011). Técnicas de *fingerprinting* como o poliformismo

de fragmentos de restrições terminais (T-RFLP), permitem um acesso rápido à estrutura e composição de comunidades de microrganismos, de modo que várias amostras podem ser avaliadas e comparadas rapidamente (Moreira et al., 2008). Assim como a adoção de ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para quantificar a biomassa de microrganismos tem mostrado um promissor método para quantificar a população microbiana no solo (He et al., 2007; Chen et al., 2013). De acordo com (Anderson et al., 2011), a utilizações dessas técnicas ajudam a estreitar o campo de possíveis grupos de microrganismos alvos em futuras pesquisas sobre o efeito de biochar em comunidades microbianas do solo.

Dessa forma, este estudo focou no objetivo de determinar a estrutura de comunidades microbianas de bactéria, archaea e fungo em solo rizosférico e não rizosférico, com diferentes doses de biocarvão (2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹) e testemunha (no quarto e quinto anos após a aplicação do biocarvão), em experimento cultivado com soja (*Glycine max* (L.) Merrill), na região do Cerrado. Também foram avaliadas a diversidade das comunidades de bactéria, archaea e fungo no biocarvão antes de ser adicionado ao solo e após ser condicionado no solo por cinco anos, assim como suas relações com o solo rizosférico e solo não rizosférico e com as diferentes doses de biocarvão adicionadas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS:

4.2.1 Condições Experimentais

O experimento de campo foi instalado em Nova Xavantina, Mato Grosso, no bioma Cerrado, em setembro de 2006 (14° 35' 36" de latitude e 52° 24' 04" de longitude e altitude de 310 m). O solo no local é um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico (LAd, Embrapa, 2006), textura Franco Argilo Arenosa. Antes da implantação a área do experimento era utilizada com produção de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) seguindo sucessão soja ã pousio. Antes da instalação do experimento, o solo apresentava as seguintes características: pH (H₂O): 5,6; P: 6,7 mg/dm³ (método de Mehlich); K⁺: 61,5 mg/dm³; Ca⁺²: 1,4 cmol_c/dm³; Mg⁺²: 0,4 cmol_c/dm³; Al⁺³: 0,13 cmol_c/dm³; H+Al: 4,98 cmol_c/dm³; V%: 27; CTC: 6,93 cmol_c/dm³; M.O.: 12,6 g/dm³; Fe: 75,0 mg/dm³; Mn: 49 mg/dm³; Zn: 45 mg/dm³; Cu: 1,7 mg/dm³; Argila: 307 g kg⁻¹; Silte: 73 g kg⁻¹; e Areia: 620 g kg⁻¹.

Maiores detalhes sobre esse estudo, no início de sua implantação podem ser verificados em Peter (2010). Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso

com quatro repetições e quatro doses de carvão vegetal como fonte de biocarvão (2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹) e a testemunha (0 Mg ha⁻¹). Cada parcela foi composta por nove linhas da cultura com 10 m de comprimento, totalizando 40,50 m², sendo a área útil para as avaliações de 25,20 m². O biocarvão foi aplicado ao solo uma única vez (safra 2006/2007), sendo incorporado a uma profundidade de 0-15 cm, dois meses antes da semeadura da cultura da soja, utilizando-se enxada rotativa. Antes da incorporação ao solo, o mesmo foi moído e passado na peneira de 2 mm.

Na composição elementar (química) do biocarvão, é possível verificar que as maiores proporções de macronutrientes são do Ca e K e entre os micronutrientes, Fe e Mn (49%), além de N total (0,66%) e C total (49,06%) (Petter, 2010). Assim, conforme a composição elementar apresentou-se os teores de: nitrogênio total (N): 6,6 g kg⁻¹; Fósforo (P₂O₅ ácido cítrico): 0,3 g kg⁻¹; Fósforo (P₂O₅ total): 1,0 g kg⁻¹; K₂O: 3,3 g kg⁻¹; CaO: 5,7 g kg⁻¹; MgO: 1,1 g kg⁻¹; Enxofre (S): 0,4 g kg⁻¹; Cobre (Cu): 7,0 mg kg⁻¹; Ferro (Fe): 6.150,0 mg kg⁻¹; Manganês (Mn): 194 mg kg⁻¹; Zinco (Zn): 13,0 mg kg⁻¹; Molibdênio (Mo): 2,0 mg kg⁻¹; Cobalto (Co): 1,0 mg kg⁻¹; Boro (B): 5,0 mg kg⁻¹; Carbono total (C): 490,6 g kg⁻¹; Umidade: 50 g kg⁻¹; Material mineral total: 280 g kg⁻¹; Relação C:N: 87 g kg⁻¹. Na Tabela 4.1 é possível verificar a magnitude da composição química dos teores de nutrientes no biocarvão com base em sua composição elementar e em função de cada dose aplicada.

Tabela 4.1. Magnitudes dos teores de nutrientes das diferentes doses de biocarvão quando adicionados ao solo e os teores desses nutrientes no solo antes da instalação do experimento.

Nutrientes	Teor no solo ¹	Teores nas doses de biocarvão (Mg ha ⁻¹)			
		2	4	8	16
		cmol _c dm ⁻³			
Ca	1,40	0,03	0,05	0,11	0,22
Mg	0,40	0,01	0,01	0,03	0,06
		mg kg ⁻¹			
K	61,50	3,65	7,30	14,60	29,21
P	6,70	0,17	0,35	0,70	1,40
N	---	8,80	17,60	35,20	70,40
S	---	0,53	1,07	2,13	4,27
Cu	1,70	0,01	0,02	0,04	0,07
Fe	75,00	8,20	16,40	32,80	65,60
Mn	49,00	0,26	0,52	1,03	2,07
Zn	45,00	0,02	0,03	0,07	0,14
Mo	---	0,00	0,01	0,01	0,02
Co	---	0,00	0,00	0,01	0,01
B	---	0,01	0,01	0,03	0,05
		g kg ⁻¹			
C	7,31	0,65	1,31	2,62	5,23

¹ Teor de nutrientes no solo antes da instalação do experimento.

Na Figura 4.1, podem-se observar dados meteorológicos para precipitação e temperatura da época em que a safra de soja foi conduzida.

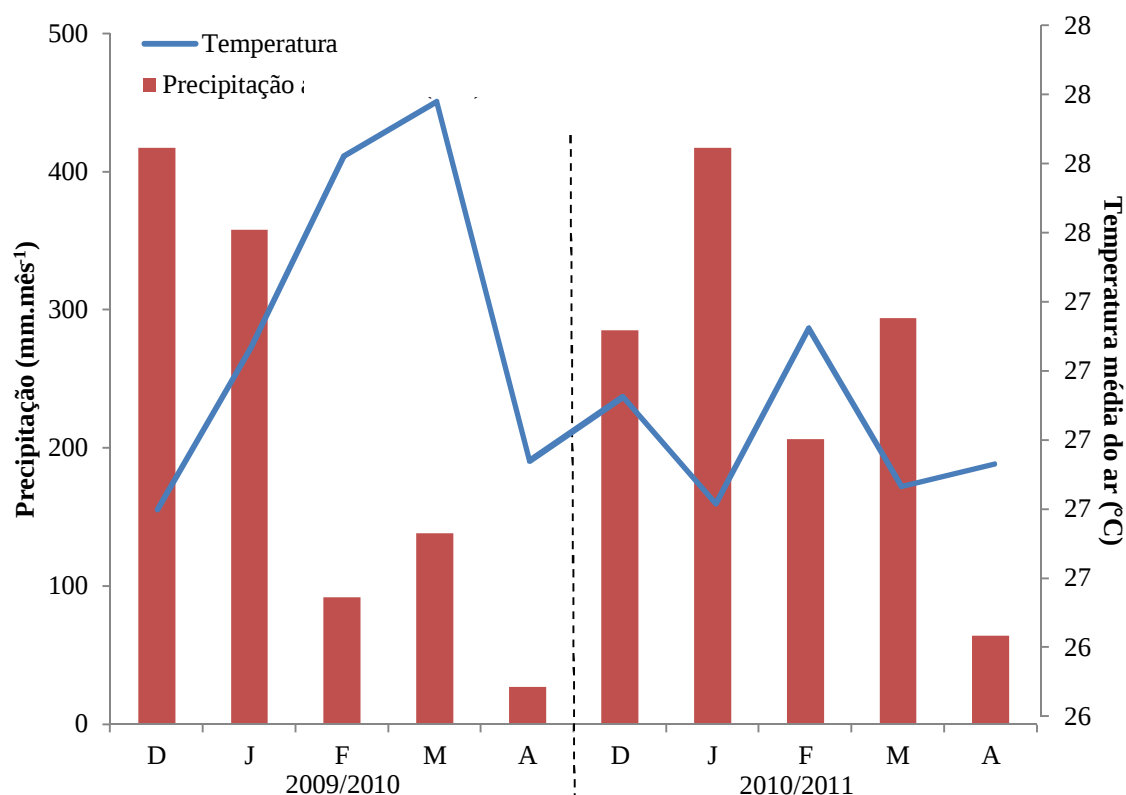


Figura 4.1. Precipitação (mm.mês⁻¹) e temperatura média do ar (°C) para as épocas de safra de plantio da soja no experimento instalado com diferentes doses de biocarvão (2, 4, 8, 16 Mg ha⁻¹ e testemunha) em Nova Xavantina, Mato Grosso. O plantio sempre foi realizado no início de Dezembro e as coletas de solo no início de Fevereiro.

Antes da implantação do experimento, em setembro de 2006, o calcário (2 Mg ha⁻¹) foi aplicado e incorporado na área. Posteriormente foi semeado milho (*Pennisetum glaucum*) na área experimental, visando à formação de palhada. Dois dias antes da semeadura da soja foi realizada dessecação de manejo na área experimental. A semeadura da soja (cultivar TMG 108 RR®) foi realizada com o mínimo revolvimento do solo, sempre durante os primeiros dez dias do mês de dezembro, sendo distribuídas 12 sementes por metro, observando-se espaçamento de 0,45 m entre linhas e profundidade de semeadura de 2-3 cm, sendo nessa mesma operação realizada a adubação de base de 200 kg ha⁻¹ da fórmula 00-18-18.

Durante o desenvolvimento da cultura foram realizados tratamentos fitossanitários, com a aplicação do herbicida glifosato visando o controle de plantas daninhas, do inseticida metamidofos para o controle de pragas e duas aplicações de fungicidas, sendo a

primeira de trifloxistrobina + ciproconazol e a segunda com o fungicida tebuconazole visando o controle de doenças. Em 2009, a área do experimento foi conduzida com braquiária (*Urochloa brizantha*) como planta de cobertura no período entre safra. Antes do plantio da soja em 2010, a braquiária foi dessecada para formação de palhada no solo.

4.2.2 Amostragem de solo:

O solo foi amostrado nos anos de 2010 e 2011, na profundidade de 0-10 cm, quando a cultura da soja se encontrava em pleno florescimento. Para a coleta do solo foram utilizados tubos de PVC de 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, que foram introduzidos no solo obtendo-se três sub-amostras em cada parcela. Para o solo rizosférico foi obtido solo que se encontrava na superfície de raízes de soja, também em triplicatas. Também foi coletado do solo, no ano de 2011 (cinco anos após aplicação no solo) o biocarvão, que foi aplicado na instalação do experimento no ano de 2006. Após a amostragem, todo o material foi armazenado, para transporte, em caixas de isopor com gelo, e posteriormente em freezer a -20 °C.

4.2.3 Extração de DNA

As amostras foram analisadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Assim, o DNA total do solo foi extraído utilizando o *Power Soil DNA* (MoBIO, Carlsbad, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para isso 0,25 g de solo foram utilizadas em triplicatas para cada tratamento. Após extração, 5 µl DNA foi quantificado em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo em tampão TSB (Brody & Kern, 2004). O DNA também foi quantificado em espectrofotômetro (Sambrook et al., 1989), e posteriormente foi armazenado a -20°C, para utilização.

4.2.4 Análise de PCR quantitativo (qPCR)

Análise de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizada para quantificar número de totais de genes de 16S rRNA de *Bacteria*, totais de genes de 18S rRNA de *Fungi* e totais de genes de 16S rRNA de *Archaea* em solo rizosférico e solo não rizosférico dos diferentes tratamentos do estudo.

Para amplificação de qPCR do gene 16S rRNA de *Bacteria* total, o par de *primers* utilizados foram U968f (5' GCA ACG AGA ACC TTA C 3') e R1387r (5' CCG

TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (Heuer et al., 1997). Para amplificação de qPCR do gene 16S rRNA de *Archaea* total, o par de *primers* utilizado foi: 787f (5' ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC 3') e 1059r (5' GCC ATG CAC CWC CTC T 3') (Yu et al., 2005). Para amplificação de qPCR do gene 18S rRNA de *Fungi* total, o par de *primers* utilizado foi: e EF4f (5' GGA AGG G[G/A]T GTA TTT ATT AG 3') e FUNG5r (5' GTA AAA GTC CTG GTT CCC 3') (Van Elsas et al., 2000).

As quantificações foram determinadas utilizando 1,0 µl (2,5pmol) de cada *primer*, 10 a 20 ng do DNA genômico do solo, 5,0 µl de SYBR master mix 2x (Fermentas) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 10,0 µl. As análises foram realizadas com o equipamento Step One™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem, Foster City, USA) e os kits para reação Maxima™ SYBR™ Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, Brasil).

As condições ótimas para qPCR de *Bacteria* foram ajustadas para: pré-incubação a 95°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s., temperatura de anelamento de 56°C por 20 s. e a aquisição de fluorescência foi realizada a 72°C por 45 s. e ao final da reação foi incluído uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 s., 56°C por 60 s. e 95°C por 15 s. com leitura dos dados a cada 0,7°C. Para amplificação de qPCR de *Archaea* as condições foram ajustadas para: pré-incubação a 95°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s., temperatura de anelamento de 57°C por 20 s. e a aquisição de fluorescência foi realizada a 72°C por 30 s. e ao final da reação foi incluído uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 s., 57°C por 60 s. e 95°C por 15 s. com leitura dos dados a cada 0,7°C. Para amplificação de qPCR de *Fungi* as condições foram ajustadas: pré-incubação a 95°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s., temperatura de anelamento de 51°C por 30 s. e a aquisição de fluorescência foi realizada a 72°C por 60 s. e ao final da reação foi incluído uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 s., 51°C por 60 s. e 95°C por 15 s. com leitura dos dados a cada 0,7°C.

Ao final de cada reação, a especificidade de todos os conjuntos de *primers* foram checados pela observação de um único pico de *melting* confirmando a pureza dos produtos amplificados. Adicionalmente, foram corridos gel de agarose (1%) para confirmação do tamanho dos amplicons. Os amplicons dos genes foram obtidos de clones de amostras ambientais por PCR usando os *primers* específicos, purificados com Kit GFX e ligados em um vetor pGEM-T (Promega). Os vetores contendo os incertos foram

transformados com células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Promega). Para quantificação e obtenção de uma curva padrão, os incertos clonados foram re-amplificados usando os mesmos primers onde os plasmídeos foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão usando uma diluição seriada de 10² a 10⁷ genes μ L⁻¹ usando triplicatas com diluição seriada de 10 vezes do plasmídeo de DNA isolado.

A análise automatizada da qualidade dos fragmentos do PCR (PCR baseline subtraction, Ct-threshold setting to the linear amplification phase) e quantificação foi interpretados com o Step One™ Software v2.3 (Applied Biosystems). Ademais, foi feita a correlação linear entre a diluição e o número de cópias do gene ($R^2=0,99$), não havendo efeito significativo de inibidores de PCR na quantificação do gene. O número de cópias dos genes foram apresentados por gramas de solo seco. Para a comparação entre os tratamentos, utilizou-se o teste de Duncan ($p=0,05$) para a análise do teste de médias e análise de variância pelo teste F. Para essas análises foram usados o PROC GLM do programa estatístico SAS-STAT (Sas Institute, 2009).

4.2.5 Análise de T-RFLP

Na análise de fingerprint T-RFLP para o gene 16S rRNA foram quantificados comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, e para o gene 18S rRNA comunidade de *Fungi* para o solo rizosférico, solo não rizosférico nos diferentes tratamentos, e para o biocarvão antes de ser adicionado ao solo e após ser coletado do solo (permanência de cinco anos).

O gene 16S rRNA de *Bacteria* foi amplificado utilizando os primers universais 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') com a extremidade 5' marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM); e o primer 1492r (5' ACC TTG TTA CGA CTT 3') (Amann et al., 1995). Cada 25 μ l de mix continha: água ultrapura (Milli-Q) esterilizada; 5 μ l da amostra de DNA total de solo; 0,5 μ l de cada primer a 5 pmol; 2,5 μ l de tampão para PCR 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM; 0,5 μ l de dNTP 10 mM; 0,5 μ l de BSA 1 ng. μ l; 0,2 μ l de Platinum® Taq Polimerase 5U (Invitrogen). As seguintes condições de amplificação foram utilizadas após otimização: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 59°C por 45 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 15 min em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Para o gene 16S rRNA de *Archaea*, foram utilizados os primers ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') com a extremidade 5' marcada com 6-

carboxyfluorescein (FAM); e o *primer* ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (DELONG et al., 1992). Cada 25 µl de mix continha: água ultrapura (Milli-Q) esterilizada; 5 µl da amostra de DNA total de solo; 0,5 µl de cada *primer* a 5 pmol; 2,5 µl de tampão para PCR 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de dNTP 10 mM; 0,25 µl de BSA 1ng.µl⁻¹; 0,2 µl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen). As seguintes condições de amplificação foram utilizadas após otimização: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Para as reações de amplificação do gene 18S-28S de *Fungi*, foram utilizados os *primers* ITS1 F (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') com a extremidade 5' marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM); e o *primer* ITS4 R (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Dickie e Fitzjohn, 2007). Cada 25 µl de mix continha: água ultrapura (Milli-Q) esterilizada; 5 µl da amostra de DNA total de solo; 0,5 µl de cada *primer* a 5 pmol; 2,5 µl de tampão para PCR 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,25 µl de dNTP 10 mM; 0,25 µl de BSA 1ng.µl⁻¹; 0,2 µl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen). As seguintes condições de amplificação foram utilizadas após otimização: 96°C por 3 min, 35 ciclos de 96°C por 60 s, 52°C por 60 s e 72°C por 2 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Após amplificação dos produtos de PCR em gel de agarose 1% (p/v) estes foram purificados utilizando o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos de PCR purificados para as comunidades *Bacteria* e *Archaea* foram alíquotados para reações de restrição com cada enzima de restrição, sendo a *HhaI* (GCG[^]C) e *MspI* (C[^]CGG) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Marsh, 1999). Os produtos de PCR purificado de *Fungo* foram alíquotados para reações de restrição com cada enzima de restrição, sendo a *HinfI* (G[^]ANTC) e *AluI* (AG[^]CT) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para cada 15 µl reações de digestão foram utilizadas: 5 µl do produto de PCR purificado; 1,5 µl do Buffer React 10X (Invitrogen); 0,15 µl de BSA 1 ng.µl⁻¹; 0,06 µl da endonuclease 10U; e água ultrapura (Milli-Q). Foram utilizadas as condições de 37°C por 3 h e 68°C por 10 min para inativação da endonuclease para *HhaI*, *MspI* e *AluI*; para *HinfI* as condições foram de

37°C por 3 h e 80°C por 20 min para inativação. As reações de restrição foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Os produtos digeridos por enzima de restrição foram precipitados, usando acetato de sódio/EDTA, e desnaturados por 5 min a 95°C e resfriadas a 0 °C por 4 min, em presença de 9,75 µl de Formamida HiDi e 0,25 µl de padrão de comprimento GENESCAN - 600 LIZ SIZE Size Standard V2.0 (Applied Biosystems). A análise de fragmentos foi realizada no seqüenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A análise dos fragmentos foi realizada com o programa GeneMapper®, versão 4.1 (Applied Biosystems). Foram usados picos de fluorescência de 50 a 500.

4.2.5.1 Análise dos resultados de T-RFLP

Para a análise dos dados foi montada uma matriz de similaridade por Bray-Curtis incluindo todos os tratamentos. Os dados foram analisados utilizando o programa Primer 6 version 6.1.5 (Primer-E Ltd., Plymouth, UK) por meio da análise de similaridade (ANOSIM) utilizando-se os diferentes tratamentos como diferentes fatores. A ANOSIM compara as similaridades entre dois ou mais grupos de unidades amostrais (fatores), e gera uma estatística R que varia de -1 a +1. Assim, o valor de R igual ou menor que zero indica a hipótese nula (não há diferenças entre as diferentes espécies dos tratamentos estudados). Isso indica que a similaridade entre as espécies de cada tratamento é maior ou igual que dentro das espécies, em cada tratamento observado. No entanto, um valor de R maior que zero indica que um grupo de amostras (fator) é mais semelhante entre si do que entre grupos. Um teste de significância é executado por meio de permutações aleatórias dos grupos e calculado de valores de R*. Assim o valor de p é calculado como o número de vezes que R* for maior ou igual a R. Se $p < 0.05$, então o valor é significativo. Caso haja diferença entre espécies, outra ANOSIM é realizada par-a-par (com $\hat{U}$ corrigido) para determinar quais grupos são diferentes. Uma análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) determina a contribuição relativa de cada variável (espécie) para as diferenças observadas entre grupos, baseado na distância de similaridade de Bray-Curtis (Clarke & Gorley, 2006).

Pelo programa Primer 6 version 6.1.5 também foram obtidos, para cada amostra, índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e de Equitabilidade de Pielou (J') (Magurran, 1988).

Shannon-Wiener (H') é obtido pela equação: $H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i)$, onde S é o número de espécies, p_i é a proporção de espécies i , estimadas como n_i/N , onde n_i é a medida da importância da espécie i (número de indivíduos, biomassa), e N é o número total de indivíduos. Este índice dá maior peso para as espécies raras, ou seja, é mais sensível em identificar espécies raras e as variações de abundância. Seus valores variam entre 1,5 e 3,5 (raramente acima de 5,0). Quanto maior a porcentagem de espécies raras, menor será seu valor. É o índice mais usado para estudos de diversidade.

Equitabilidade de Pielou (J') é obtido pela equação: $J' = H'/\ln(S)$, onde S é o número de espécies, e H' o índice de Shannon- Wiener. É a medida da equitabilidade máxima, e mede o quanto uniforme os indivíduos estão distribuídos entre as diferentes espécies. Seus valores variam entre 0 e 1, e 1 representa uma situação em que todas as espécies são igualmente abundantes. Em uma comunidade a J' será baixo, quando ocorrer poucas espécies altamente dominantes no meio e grande número de espécies raras. E J' terá valores próximos de 1, quando não houver espécies dominantes, e ocorrer maior heterogeneidade de espécies.

Posteriormente, utilizou-se o teste de Duncan ($p \leq 0,05$) para a análise do teste de médias e análise de variância pelo teste F. Para essas análises foram usados o PROC GLM do programa estatístico SAS-STAT (Sas Institute, 2009).

4.3 RESULTADOS

É importante avaliar a comunidade da rizosfera que está mais envolvida com o desenvolvimento da planta (Kolton et al., 2011). O objetivo desse estudo foi verificar o efeito da aplicação do biocarvão sobre a composição de comunidades de bactéria, archaea e fungo em solo rizosférico de plantas de soja e solo não rizosférico. Foram realizadas análises moleculares de *fingerprint* independentes de cultivos (T-RFLP e qPCR) de fragmentos do gene 16S rRNA e 18S rRNA no solo associado a rizosfera, no solo não rizosférico, no biocarvão condicionado no solo por cinco anos e no biocarvão que não foi adicionado ao solo.

4.3.1 Abundância dos genes

Os resultados para PCR quantitativo (qPCR) do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* e do número de cópias do gene 16S rRNA de *Archaea* podem ser

verificados na Tabela 4.2 e Tabela 4.3, respectivamente. Na Tabela 4.4 são mostrados resultados para qPCR do número de cópias do gene 18S rRNA de *Fungi*. Os resultados foram avaliados para o solo rizosférico e para o solo não rizosférico, no ano de 2010 e 2011.

Os resultados de qPCR do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* foram significativos apenas para as análises realizadas no solo não rizosférico no ano de 2011. A dose 16 Mg ha⁻¹ apresentou o menor número de cópias ($1,48 \cdot 10^{10}$), e as doses 2 e 4 Mg ha⁻¹ apresentaram os maiores valores ($2,25 \cdot 10^{10}$ e $2,22 \cdot 10^{10}$). A dose 8 Mg ha⁻¹ ($8,61 \cdot 10^8$) e a testemunha ficaram com valores intermediários ($1,86 \cdot 10^{10}$). Valor maior, embora não significativo também foram encontrados na dose 4 Mg ha⁻¹ ($7,37 \cdot 10^9$), no ano de 2010. O solo rizosférico, nos anos de 2010 e 2011, mostrou tendência em apresentar alto valor para a dose 8 e 16 Mg ha⁻¹ em 2011 ($4,21 \cdot 10^{10}$ e $4,63 \cdot 10^{10}$), mas devido à alta variabilidade dos resultados, estes valores não foram significativos.

Tabela 4.2. Número de cópias do gene 16S rRNA para comunidades de *Bacteria*, para os tratamentos 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ do solo rizosférico, do solo não rizosférico, obtidos em 2010 e 2011.

Doses (Mg ha ⁻¹)		Solo Rizosférico			Solo		
		2010			2011		
0	µg.DNA.g.solo ⁻¹	2,26E+09	± 1,21E+08	A	6,14E+09	± 1,78E+08	A
2		1,20E+09	± 7,18E+07	A	6,35E+09	± 1,62E+08	A
4		2,13E+09	± 1,30E+08	A	7,37E+09	± 1,92E+08	A
8		2,67E+09	± 1,75E+08	A	6,87E+09	± 1,70E+08	A
16		1,43E+09	± 4,04E+07	A	6,40E+09	± 1,49E+08	A
0	µg.DNA.g.solo ⁻¹	2,14E+10	± 1,60E+09	A	1,86E+10	± 8,06E+08	AB
2		2,38E+10	± 1,99E+09	A	2,25E+10	± 1,09E+09	A
4		2,89E+10	± 1,54E+09	A	2,22E+10	± 1,02E+09	A
8		4,21E+10	± 2,02E+09	A	1,76E+10	± 8,61E+08	AB
16		4,63E+10	± 2,41E+09	A	1,48E+10	± 7,50E+08	B

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 4$).

O PCR quantitativo de cópias do gene 16S rRNA de *Archaea* (Tabela 4.3), foram significativos para o resultados obtidos para análise do solo não rizosférico no ano de 2011. A dose 16 Mg ha⁻¹ apresentou o maior números de cópias para esse gene ($6,05 \cdot 10^5$), seguidos pelos valores obtidos na dose 4 Mg ha⁻¹ ($5,58 \cdot 10^5$) e 8 Mg ha⁻¹ ($5,11 \cdot 10^5$). Os menores valores foram encontrados para o solo controle ($4,83 \cdot 10^5$) e para a dose 2 Mg ha⁻¹ ($3,72 \cdot 10^5$), embora somente a dose 2 mostre ser significativamente menor. Semelhante resultado, embora não significativo foi encontrado para o solo no ano de 2010. Com relação ao solo rizosférico e o solo não rizosférico, o número de cópias de gene foi menor para o solo rizosférico.

Tabela 4.3. Número de cópias do gene 16S rRNA para comunidades de *Archaea*, para os tratamentos 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ do solo rizosférico, do solo não rizosférico, obtidos em 2010 e 2011.

Doses (Mg ha ⁻¹)		Solo Rizosférico			Solo		
		-----2010-----					
0	µg.DNA.g.solo ⁻¹	2,15E+05	± 1,80E+04	A	5,40E+05	± 4,09E+04	A
2		1,19E+05	± 2,70E+03	A	3,74E+05	± 1,47E+04	A
4		2,48E+05	± 1,27E+04	A	4,25E+05	± 2,10E+04	A
8		3,22E+05	± 2,14E+04	A	4,49E+05	± 1,81E+04	A
16		1,63E+05	± 6,60E+03	A	5,66E+05	± 4,14E+04	A
		-----2011-----					
0	µg.DNA.g.solo ⁻¹	1,21E+05	± 2,85E+03	A	4,83E+05	± 3,32E+03	AB
2		1,27E+05	± 1,90E+03	A	3,72E+05	± 2,96E+03	B
4		1,38E+05	± 6,86E+02	A	5,58E+05	± 1,06E+04	A
8		1,37E+05	± 2,31E+03	A	5,11E+05	± 1,33E+04	AB
16		1,21E+05	± 3,44E+03	A	6,05E+05	± 1,25E+04	A

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 4$).

Para o número de cópias do gene 18S rRNA de Fungo, foi observado valores significativos para o solo rizosférico no ano de 2011. A dose 8 Mg ha⁻¹ apresentou o maior valor ($2,10 \cdot 10^7$). No ano de 2010, o solo rizosférico, dados não significativos, mostraram maiores valores para a dose 8 ($3,91 \cdot 10^6$) e 16 ($4,09 \cdot 10^6$) Mg ha⁻¹. Os valores no solo, embora não significativos, para os anos de 2010 e 2011 foram maiores para a dose 4 e 16 Mg ha⁻¹.

Tabela 4.4. Número de cópias do gene 18S rRNA para comunidades de *Fungi*, para os tratamentos 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ do solo rizosférico, do solo não rizosférico, obtidos em 2010 e 2011.

H2O2-SENSITIVITY, GROWTH AND DNA CONTENT OF RIZOSPHERIC BACTERIA									
Doses (Mg ha ⁻¹)		Solo Rizosférico			Solo				
		-----2010-----							
0	µg.DNA.g.solo ⁻¹	3,40E+06	±	1,55E+05	A	3,02E+06	±	6,74E+04	A
2		2,94E+06	±	6,87E+04	A	2,58E+06	±	6,65E+04	A
4		2,51E+06	±	1,06E+05	A	4,25E+06	±	6,47E+04	A
8		3,91E+06	±	2,13E+05	A	3,12E+06	±	1,20E+05	A
16		4,09E+06	±	2,23E+05	A	3,26E+06	±	1,49E+05	A
		-----2011-----							
0	µg.DNA.g.solo ⁻¹	1,18E+07	±	1,78E+05	B	5,05E+06	±	1,55E+05	A
2		1,73E+07	±	4,85E+05	AB	4,01E+06	±	5,68E+04	A
4		1,11E+07	±	1,58E+05	B	5,92E+06	±	2,08E+05	A
8		2,10E+07	±	8,58E+05	A	4,96E+06	±	1,81E+05	A
16		1,71E+07	±	3,23E+05	AB	6,35E+06	±	8,30E+04	A

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 4$).

4.3.2 Estrutura da comunidade de bactéria

A análise de *fingerprint* de T-RFLP de 16S rRNA de *Bacteria*, em solo rizosférico e solo não rizosférico, para os dois anos de análise (2010 e 2011), biocarvão antes e após uso no solo (*HhaI* e *MspI*) pode ser visualizada na Figura 4.2. As mudanças mais notáveis foram observadas na abundância relativa dos T-RFs 77, 121, 78 e 90 pb. A enzima *MspI* mostrou melhor variação na abundância de T-RFs entre o solo rizosférico e não rizosférico. É possível observar, principalmente com relação ao T-RF 77-bp, diferença na abundância nos tratamentos com adição de biocarvão, em relação ao solo controle, tanto em 2010 como em 2011, no solo não rizosférico.

No biocarvão, antes de ser adicionado ao solo (C), os T-RFs com maiores abundâncias nos solos (77, 121 e 78 bp) também estão presentes. O biocarvão (B) após ser selecionado do solo, após cinco anos, mostrou similar abundância aos T-RFs apresentados nos solo rizosférico e não rizosférico. A quantidade de T-RFs presentes nesses biocarvões mostram o potencial desse em adquirir diversidade mesmo antes de ser adicionado ao solo. O número de T-RFs e abundância foram inicialmente utilizados para o cálculo de medida da diversidade (Tabelas 4.5 e 4.6). As medidas de diversidade foram mensuradas considerando todas as sub-amostras dos tratamentos com biocarvão, para as enzimas *HhaI* e *MspI*.

Em 2010 os resultados foram significativos para o solo não rizosférico, mensurados pela enzima *HhaI*, podendo-se observar que as doses 2 e 4 Mg ha⁻¹ apresentaram os maiores valores de Equitabilidade (0,79 para ambos), e o solo controle apresentou o menor valor (0,76). Semelhante resultado foi encontrado em 2011, para a enzima *HhaI*, no solo não rizosférico, sem contudo existir diferença significativa (Tabela 4.5). No entanto, para a enzima *MspI*, no ano de 2010, no solo não rizosférico, as doses 4 e 16 Mg ha⁻¹ mostraram Equitabilidade maior (0,76 para ambos), quando comparado ao solo testemunha (0,73). Igual resultado foi obtido para o índice de Shannon (3,5 e 3,6 para dose 4 e 16 Mg ha⁻¹ respectivamente e 3,4 para solo controle). No entanto, no ano de 2011, o solo rizosférico mostrou diferenças significativas, para Equitabilidade, indicando que a dose 16 Mg ha⁻¹ (0,83) mostrou resultado maior que as outras doses e o solo controle, e o mesmo aconteceu para o Índice de Shannon (4,0).

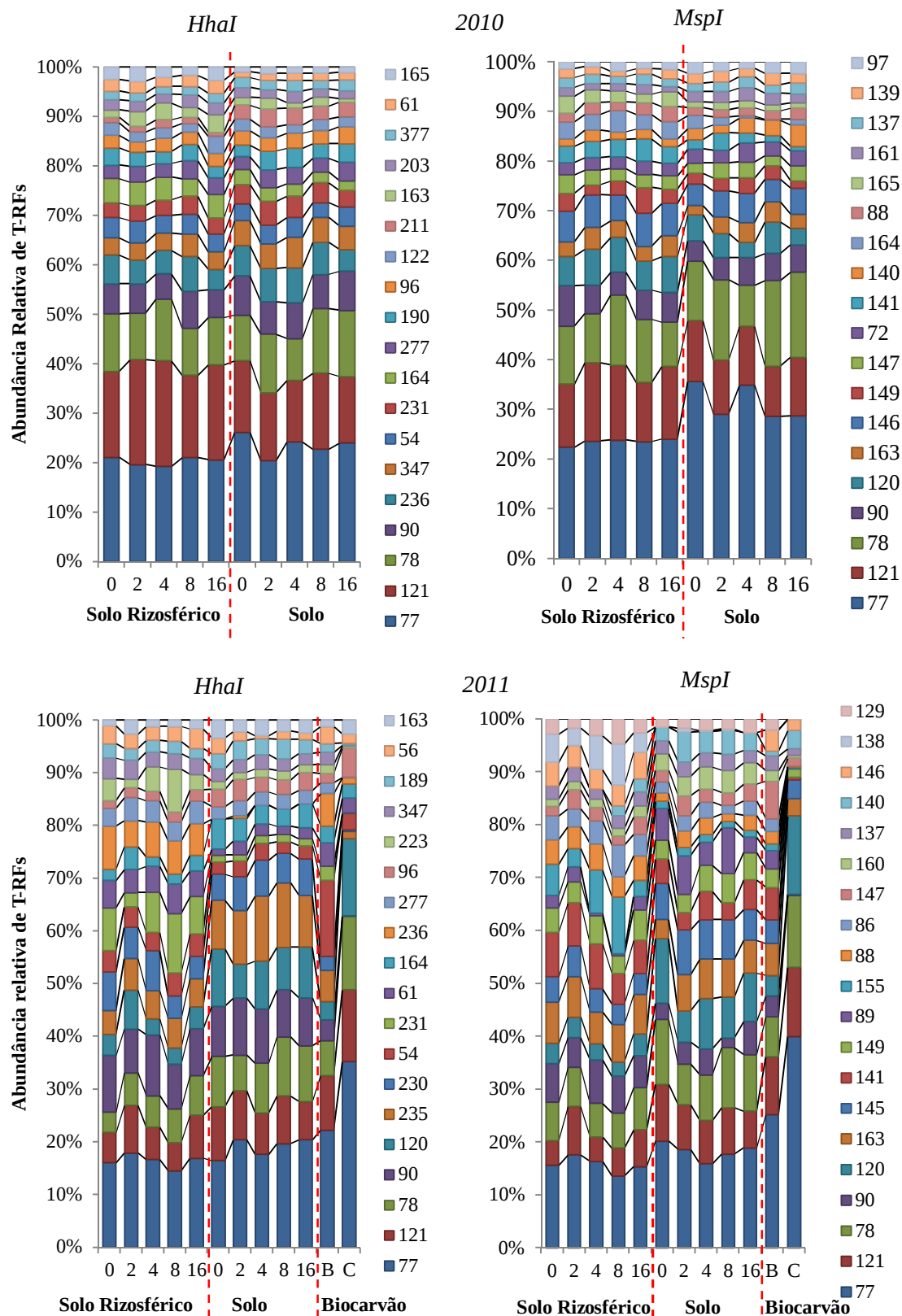


Figura 4.2. Abundância relativa de T-RFs de comunidades de *Bacteria* do gene 16S rRNA, com as enzimas *HhaI* e *MspI* para os tratamentos 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ no solo rizosférico, no solo não rizosférico, obtidos em 2010 e 2011 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C). As diferentes cores na vertical indicam os diferentes fragmentos, em pares de bases, com abundância relativa > 1,0%.

Tabela 4.5. Número de UTOs, índice de Equitabilidade de Pielou e de Shannon-Wiener, para comunidades de *Bacteria* com base na enzima *HhaI* e *MspI*, para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2010.

Tratamentos do solo: Rizosférico, Solo não Rizosférico, Estratos em 2010.													
Enzima	Dose (Mg ha ⁻¹)	Nº UTOs ¹			Equitabilidade ²			H'(log _e) ³					
<i>HhaI</i>	-----Solo rizosférico-----												
	0	108,333	±	2,231	A	0,795	±	0,005	A	3,691	±	0,014	A
	2	116,333	±	2,792	A	0,788	±	0,005	A	3,705	±	0,013	A
	4	117,083	±	2,826	A	0,782	±	0,004	A	3,681	±	0,006	A
	8	107,667	±	2,561	A	0,805	±	0,005	A	3,727	±	0,018	A
	16	107,417	±	2,668	A	0,793	±	0,005	A	3,668	±	0,016	A
	-----Solo-----												
	0	106,500	±	1,505	A	0,763	±	0,003	C	3,551	±	0,018	A
	2	100,250	±	1,882	A	0,799	±	0,002	A	3,658	±	0,016	A
	4	102,500	±	1,594	A	0,793	±	0,003	AB	3,657	±	0,014	A
	8	105,167	±	1,583	A	0,767	±	0,002	C	3,559	±	0,015	A
	16	104,500	±	2,255	A	0,775	±	0,002	BC	3,580	±	0,019	A
<i>MspI</i>	-----Solo rizosférico-----												
	0	119,833	±	1,227	A	0,792	±	0,003	A	3,784	±	0,013	A
	2	120,750	±	0,830	A	0,791	±	0,003	A	3,789	±	0,014	A
	4	122,583	±	1,144	A	0,774	±	0,002	A	3,719	±	0,013	A
	8	110,667	±	3,056	A	0,789	±	0,003	A	3,463	±	0,092	A
	16	125,333	±	1,559	A	0,786	±	0,003	A	3,786	±	0,011	A
	-----Solo-----												
	0	107,583	±	1,390	A	0,735	±	0,004	B	3,434	±	0,026	B
	2	109,833	±	0,983	A	0,758	±	0,003	AB	3,563	±	0,022	AB
	4	107,083	±	0,717	A	0,767	±	0,004	A	3,583	±	0,019	A
	8	108,167	±	1,027	A	0,745	±	0,004	AB	3,490	±	0,025	AB
	16	113,083	±	1,324	A	0,766	±	0,003	A	3,618	±	0,020	A

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 12$).

¹Unidades taxionômicas operacionais; ² Equitabilidade de Pielou; ³ Shannon-Wiener.

Tabela 4.6. Número de UTOs, índice de Equitabilidade de Pielou e de Shannon-Wiener, para comunidades de *Bacteria* com base na enzima *HhaI* e *MspI*, para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2011 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Enzima	Dose (Mg ha ⁻¹)	Nº UTOs ¹			Equitabilidade ²			H'(log _e) ³					
<i>HhaI</i>	-----Solo rizosférico-----												
	0	101,417	±	2,045	A	0,815	±	0,002	A	3,739	±	0,012	A
	2	99,583	±	2,960	A	0,839	±	0,005	A	3,674	±	0,050	A
	4	106,833	±	2,046	A	0,801	±	0,003	A	3,720	±	0,017	A
	8	101,417	±	3,515	A	0,805	±	0,003	A	3,442	±	0,091	A
	16	109,500	±	2,163	A	0,820	±	0,003	A	3,824	±	0,008	A
	-----Solo-----												
	0	129,833	±	3,615	A	0,778	±	0,002	A	3,527	±	0,093	A
	2	117,750	±	1,933	A	0,787	±	0,001	A	3,743	±	0,015	A
	4	111,583	±	0,950	A	0,791	±	0,002	A	3,726	±	0,008	A
	8	119,083	±	1,233	A	0,778	±	0,002	A	3,713	±	0,017	A
	16	124,250	±	1,790	A	0,779	±	0,001	A	3,747	±	0,017	A
	-----Biocarvão-----												
	B	103,500	±	2,586		0,794	±	0,004		3,668	±	0,021	
	C	91,333	±	7,011		0,667	±	1,000		2,995	±	0,005	
<i>MspI</i>	-----Solo rizosférico-----												
	0	113,000	±	1,228	BC	0,824	±	0,003	AB	3,885	±	0,012	BC
	2	117,167	±	1,095	ABC	0,820	±	0,004	ABC	3,899	±	0,013	B
	4	108,167	±	1,327	C	0,809	±	0,003	BC	3,779	±	0,011	C
	8	122,083	±	1,518	AB	0,804	±	0,003	C	3,855	±	0,013	BC
	16	125,250	±	1,297	A	0,832	±	0,003	A	4,009	±	0,012	A
	-----Solo-----												
	0	138,333	±	2,115	A	0,774	±	0,002	A	3,804	±	0,020	A
	2	141,750	±	1,646	A	0,779	±	0,001	A	3,852	±	0,011	A
	4	133,333	±	1,184	A	0,788	±	0,002	A	3,853	±	0,010	A
	8	135,417	±	1,215	A	0,774	±	0,002	A	3,795	±	0,015	A
	16	137,417	±	1,360	A	0,780	±	0,003	A	3,838	±	0,016	A
	-----Biocarvão-----												
	B	117,750	±	0,508		0,790	±	0,003		3,767	±	0,017	
	C	91,667	±	3,289		0,640	±	1,000		2,885	±	0,084	

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 12$).

¹Unidades taxionômicas operacionais; ² Equitabilidade de Pielou; ³ Shannon-Wiener.

Utilizando a análise de pares da estatística R da análise de similaridade (ANOSIM) foi possível verificar as interações entre a estrutura da comunidade microbiana de T-RFs de bactéria (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Análise de similaridade (ANOSIM) para as comunidades de *Bacteria* nos anos 2010 e 2011 utilizando a enzima *HhaI* e *MspI* para o solo rizosférico (R) e solo não rizosférico (S), para as doses 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ de biocarvão e para o biocarvão extraído após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Enzima	Doses		Solo Rizosférico (R)					(R) X (S)	Doses		Solo (S)					
	Mg ha ⁻¹	0	2	4	8	16	Mg ha ⁻¹		0	2	4	8	16	B		
-----2010-----																
<i>HhaI</i>	0						0,138	0								
	2	0,015					0,167	2	-0,013							
	4	0,046	-0,016				0,286	4	-0,035	-0,039						
	8	0,004	0,02	0,056			0,069	8	-0,056	-0,068	-0,05					
	16	0,043	-0,038	-0,008	-0,003		0,18	16	-0,014	-0,027	-0,018	-0,042				
<i>MspI</i>	0						0,168	0								
	2	-0,026					0,167	2	-0,025							
	4	0,041	-0,012				0,172	4	-0,005	0,022						
	8	-0,036	-0,029	-0,016			0,125	8	-0,011	-0,01	0,043					
	16	0,007	-0,054	-0,024	-0,037		0,186	16	-0,008	-0,037	0,011	-0,011				
-----2011-----																
<i>HhaI</i>	0						0,467	0								
	2	0,021					0,154	2	0,007							
	4	-0,053	0,001				0,397	4	-0,02	-0,007						
	8	-0,003	0,1	-0,019			0,488	8	0,05	-0,025	0,007					
	16	-0,004	-0,013	-0,009	0,036		0,303	16	-0,034	-0,02	-0,034	0,021				
	B	0,342	0,323	0,358	0,339	0,297			0,68	0,519	0,605	0,61	0,582			
	C	0,899	0,886	0,868	0,894	0,847			0,938	0,934	0,949	0,932	0,92	0,728		
<i>MspI</i>	0						0,513	0								
	2	0,003					0,286	2	0,055							
	4	-0,058	0,009				0,437	4	0,063	-0,003						
	8	0,001	0,082	-0,012			0,564	8	0,067	-0,012	0,062					
	16	0,007	-0,039	0,025	0,047		0,256	16	0,025	-0,002	-0,027	0,058				
	B	0,324	0,251	0,332	0,318	0,185			0,458	0,417	0,495	0,498	0,44			
	C	0,907	0,933	0,913	0,893	0,865			0,879	0,963	0,984	0,985	0,957	0,688		

Verificou-se alta similaridade (baixo valor de R) entre os tratamentos com diferentes doses de biocarvão para as duas enzimas (*HhaI* e *MspI*) nos anos de 2010 e 2011, tanto no solo como solo rizosférico. Em 2010, avaliando o solo rizosférico e sua dose correspondente no solo não rizosférico, verificou-se maior dissimilaridade na dose 4 e 16 Mg ha⁻¹ tanto na enzima *HhaI* (0,28 e 0,18 respectivamente) como na enzima *MspI*

(0,17 e 0,18 respectivamente) e maior similaridade na dose 8 Mg ha⁻¹ (0,069 em *HhaI* e 0,12 em *MspI*). Esses valores foram diferentes dos que ocorreram em 2011, onde a dose 8 Mg ha⁻¹ apresentou maior dissimilaridade entre o solo e o solo rizosférico (0,48 em *HhaI* e 0,56 em *MspI*). Em 2011, observou-se razoável dissimilaridade do solo rizosférico com relação a sua dose correspondente no solo não rizosférico. Na dose 2 Mg ha⁻¹ (0,15 e 0,18 para *HhaI* e *MspI*, respectivamente), observou-se maior similaridade.

O ANOSIM para o biocarvão revelou que B e C possuem alta dissimilaridade (o R foi de 0,68 para *MspI* e 0,72 para *HhaI*). O solo rizosférico apresentou maior similaridade com B (R médio 0,33 para *HhaI* e 0,28 para *MspI*) em relação ao solo não rizosférico (R médio 0,59 para *HhaI* e 0,46 para *MspI*). A dose 16 Mg ha⁻¹ do solo rizosférico, para as enzimas *HhaI* (0,29) e *MspI* (0,18), mostraram similaridade maior com B, quando comparado com as outras doses. No solo não rizosférico, o tratamento controle apresentou maior dissimilaridade (0,68) para a enzima *HhaI*, quando comparadas com B. O biocarvão sem adição ao solo (C) mostrou dissimilaridade alta tanto para o solo rizosférico como para o solo não rizosférico (R > 0,84).

Resultados para NMDS, gráfico associado com a análise de similaridade (ANOSIM), podem ser verificados na Figura 4.3. Assim como verificado para ANOSIM, não foi possível distinguir entre os diferentes tratamentos com o biocarvão. Em 2011, observou-se melhor separação entre as amostras para o solo rizosférico e o solo não rizosférico.

4.3.3 Estrutura da comunidade de archaea

A análise de fingerprints de T-RFLP de 16S rRNA de *Archaea* do solo rizosférico, solo não rizosférico e biocarvão antes e após uso no solo, para os dois anos (2010 e 2011) de análise (enzimas *HhaI* e *MspI*) é mostrada na Figura 4.4. Mudanças na abundância relativa foram maiores para os T-RFs 321, 319 e 318 pb quando utilizado a enzima *HhaI* e para os T-RFs 254, 251 e 280 pb quando utilizado a enzima *MspI*.

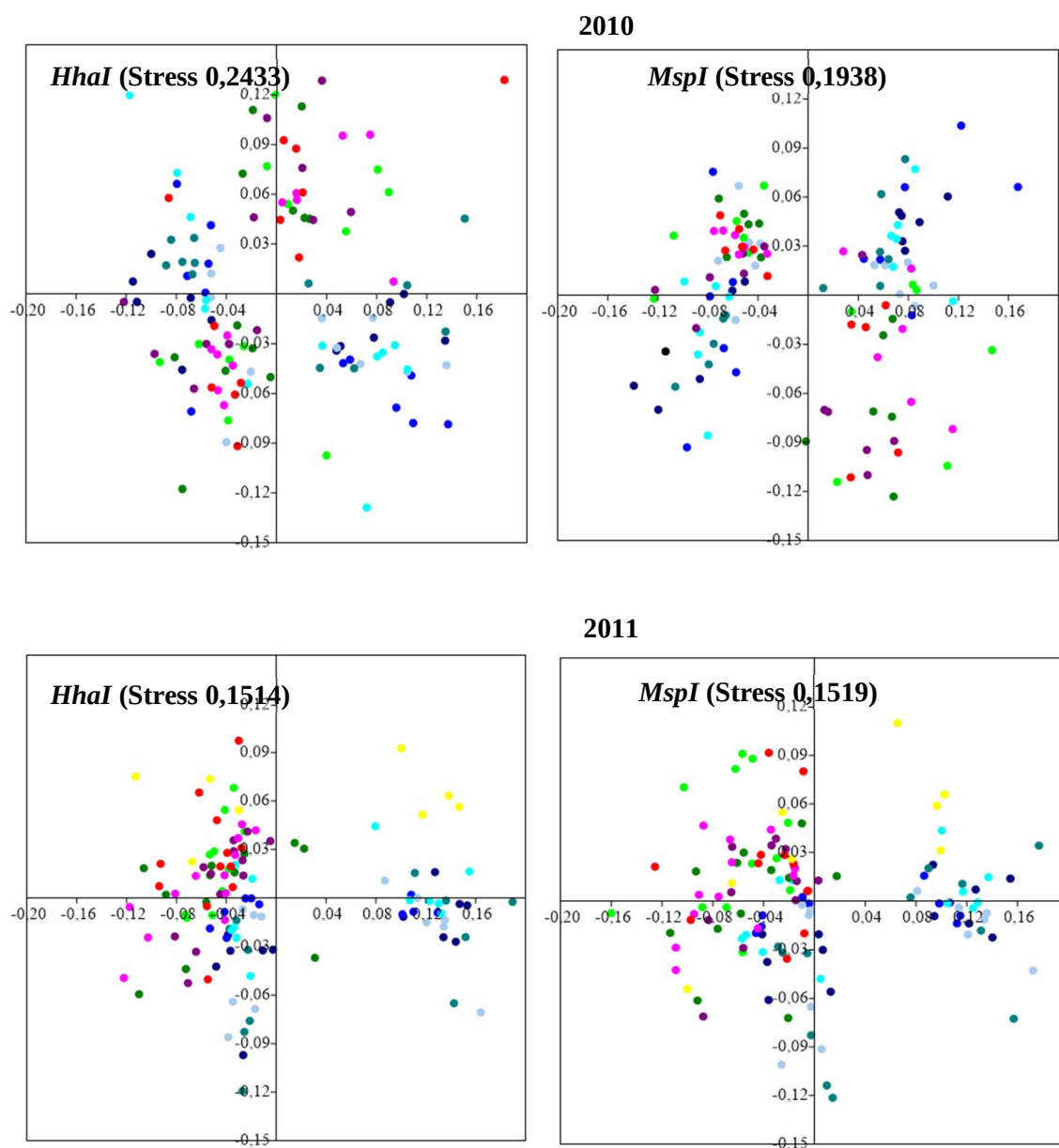


Figura 4.3. Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades microbianas do solo rizosférico e solo não rizosférico, das estruturas de comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a enzima *HhaI* e *MspI* nos anos de 2010 e 2011. Para o solo rizosférico considera-se na testemunha (●) e as doses 2 (●), 4 (●), 8 (●), 16 (●) Mg,ha^{-1} de biocarvão; e no solo não rizosférico considera-se para a testemunha (●) e as doses 2 (●), 4 (●), 8 (●), 16 (●) Mg,ha^{-1} de biocarvão; e para o biocarvão extraído do solo (●).

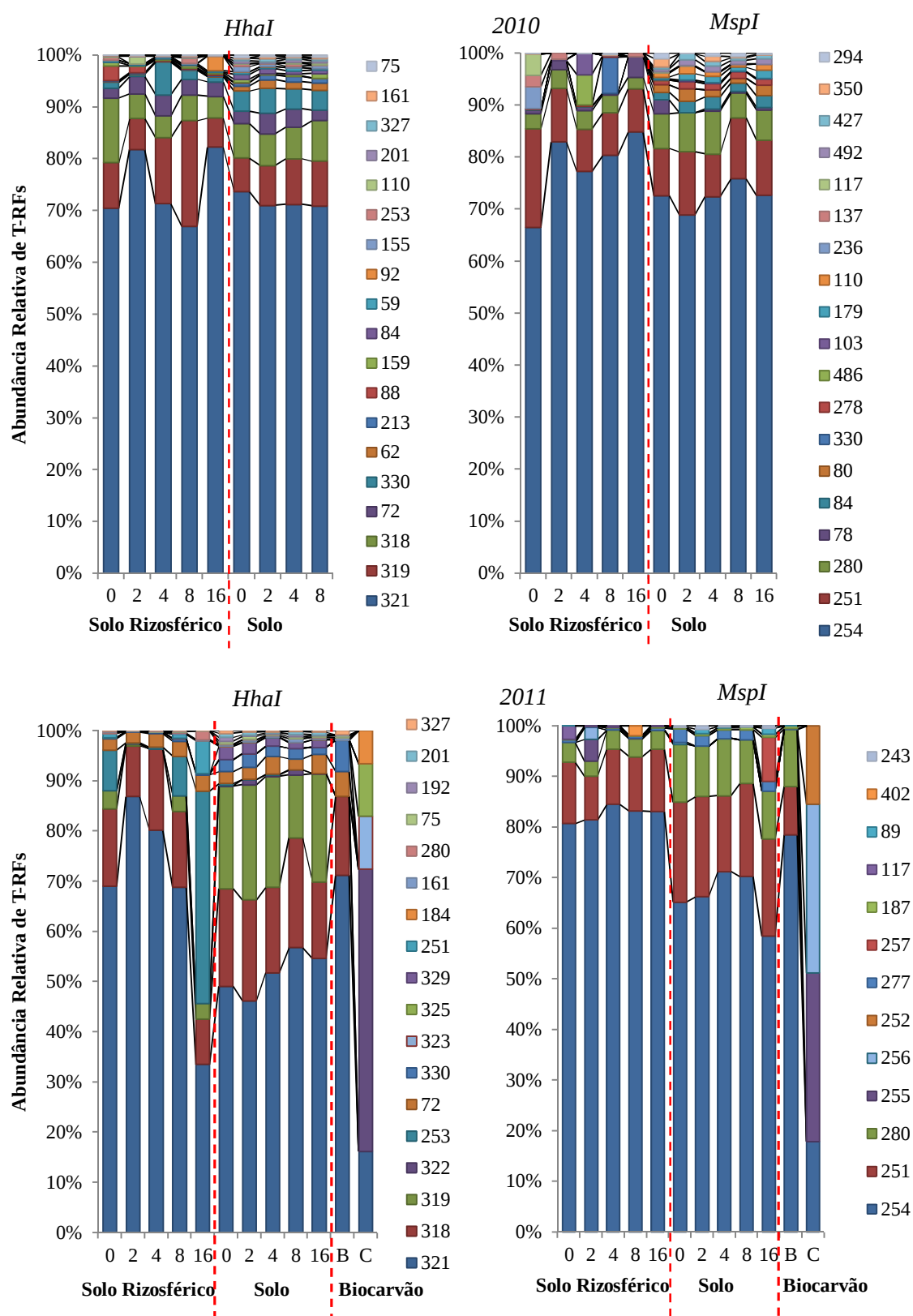


Figura 4.4. Abundância relativa de T-RFs de comunidades de *Archaea* do gene 16S rRNA, com a enzima *HhaI* e *MspI* para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2010 e 2011 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C). As diferentes cores na vertical indicam os diferentes fragmentos, em pares de bases, com abundância relativa > 1,0%.

A enzima *HhaI* mostrou melhor variação na abundância de T-RFs entre o solo rizosférico e não rizosférico. Em 2011, enquanto o T-RF 321bp aumenta inicialmente na dose 2 Mg ha⁻¹, e diminui a abundância com o aumento das doses de biocarvão, o T-RF 253pb, diminui em muito a abundância na dose 2 e 4 Mg ha⁻¹, e posteriormente aumenta a abundância com nas doses 8 e 4 Mg ha⁻¹, se assemelhando a abundância do solo controle.

Com relação ao biocarvão antes de ser adicionado ao solo (C) é possível observar que os T-RFs 321 bp (*HhaI*) e 254 (*MspI*), que possuem maior abundância no solo e solo rizosférico, também estão presente (em menor abundância) nesse biocarvão. O biocarvão (B) após ser recuperado do solo depois de cinco anos, apresentou menor abundância dos T-RFs, no entanto com abundância semelhante à do solo rizosférico.

Na Tabela 4.8 e 4.9, o número de T-RFs e abundância foram inicialmente utilizados para o cálculo de medida da diversidade. As medidas de diversidade foram mensurada considerando todas as sub-mostras dos tratamentos de solo com biocarvão, para as enzimas *HhaI* e *MspI*.

Tabela 4.8. Número de UTOs, índice de Equitabilidade de Pielou e de Shannon-Wiener, para comunidades de *Archaea* com base na enzima *HhaI* e *MspI*, para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2010.

Enzima	Dose (Mg ha ⁻¹)	Nº UTOs ¹			Equitabilidade ²			H'(log _e) ³					
<i>HhaI</i>		-----Solo Rizosférico-----											
	0	55,083	±	4,025	AB	0,406	±	0,011	A	1,344	±	0,048	A
	2	44,750	±	3,762	AB	0,303	±	0,007	A	0,992	±	0,047	AB
	4	36,833	±	4,260	AB	0,390	±	0,009	A	1,095	±	0,069	AB
	8	57,917	±	4,508	A	0,378	±	0,014	A	1,295	±	0,087	AB
	16	26,667	±	2,692	B	0,316	±	0,011	A	0,805	±	0,022	B
		-----Solo-----											
	0	71,083	±	2,922	A	0,402	±	0,010	A	1,713	±	0,058	A
	2	74,167	±	1,899	A	0,391	±	0,006	A	1,668	±	0,031	A
	4	84,917	±	1,314	A	0,384	±	0,005	A	1,703	±	0,025	A
	8	79,750	±	1,695	A	0,391	±	0,007	A	1,702	±	0,037	A
	16	69,000	±	1,649	A	0,402	±	0,005	A	1,697	±	0,030	A
<i>MspI</i>		-----Solo Rizosférico-----											
	0	4,667	±	0,510	AB	0,404	±	0,030	A	0,615	±	0,044	A
	2	3,667	±	0,306	AB	0,292	±	0,020	A	0,455	±	0,034	A
	4	4,250	±	0,345	AB	0,386	±	0,027	A	0,524	±	0,030	A
	8	6,833	±	0,431	A	0,348	±	0,018	A	0,651	±	0,025	A
	16	2,417	±	0,168	B	0,325	±	0,024	A	0,371	±	0,024	A
		-----Solo-----											
	0	26,500	±	2,549	A	0,347	±	0,022	A	1,126	±	0,089	A
	2	27,833	±	2,797	A	0,336	±	0,021	A	1,100	±	0,081	A
	4	29,167	±	2,618	A	0,272	±	0,020	A	1,030	±	0,081	A
	8	30,833	±	2,339	A	0,318	±	0,017	A	1,117	±	0,067	A
	16	22,167	±	2,160	A	0,311	±	0,020	A	1,013	±	0,073	A

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 12$).

¹Unidades taxionômicas operacionais; ²Equitabilidade de Pielou; ³Shannon-Wiener.

Tabela 4.9. Número de UTOs, índice de Equitabilidade de Pielou e de Shannon-Wiener, para comunidades de *Archaea* com base na enzima *HhaI* e *MspI*, para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2011 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Enzima	Doses (Mg ha ⁻¹)	Nº UTOs ¹			Equitabilidade ²			H'(log _e) ³			
<i>HhaI</i>	-----Solo Rizosférico-----										
	0	24,083	± 2,266	AB	0,276	± 0,005	AB	0,732	± 0,036	AB	
	2	11,667	± 0,837	B	0,277	± 0,009	AB	0,573	± 0,020	B	
	4	28,083	± 2,600	AB	0,281	± 0,005	AB	0,770	± 0,040	AB	
	8	29,167	± 2,896	A	0,250	± 0,008	B	0,776	± 0,051	AB	
	16	22,833	± 2,612	AB	0,339	± 0,007	A	0,852	± 0,036	A	
	-----Solo-----										
	0	83,583	± 3,419	A	0,409	± 0,011	A	1,797	± 0,065	A	
	2	82,417	± 2,348	A	0,410	± 0,007	A	1,800	± 0,043	A	
	4	75,417	± 2,378	A	0,349	± 0,007	A	1,511	± 0,042	A	
	8	73,500	± 2,236	A	0,372	± 0,006	A	1,584	± 0,035	A	
	16	69,750	± 3,638	A	0,375	± 0,007	A	1,505	± 0,054	A	
	-----Biocarvão-----										
	B	29,875	± 2,549		0,358	± 0,012		1,069	± 0,012		
	C	2,000	± 0,333		0,920	± 1,000		0,552	± 0,174		
<i>MspI</i>	-----Solo Rizosférico-----										
	0	10,083	± 0,821	A	0,365	± 0,013	A	0,683	± 0,029	A	
	2	6,167	± 0,402	A	0,393	± 0,017	A	0,567	± 0,019	A	
	4	9,083	± 0,563	A	0,349	± 0,008	A	0,676	± 0,022	A	
	8	11,583	± 1,120	A	0,327	± 0,012	A	0,616	± 0,026	A	
	16	9,083	± 0,509	A	0,336	± 0,007	A	0,663	± 0,016	A	
	-----Solo-----										
	0	30,083	± 2,672	A	0,426	± 0,010	A	1,175	± 0,034	A	
	2	37,583	± 3,086	A	0,396	± 0,005	AB	1,253	± 0,048	A	
	4	37,417	± 2,479	A	0,365	± 0,004	AB	1,167	± 0,036	A	
	8	31,167	± 2,448	A	0,394	± 0,008	AB	1,076	± 0,033	A	
	16	35,583	± 2,225	A	0,340	± 0,006	B	1,124	± 0,044	A	
	-----Biocarvão-----										
	B	7,875	± 0,607		0,400	± 0,016		0,704	± 0,039		
	C	1,333	± 0,192		0,996	± 1,000		0,230	± 0,133		

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 12$).

¹Unidades taxionômicas operacionais; ²Equitabilidade de Pielou; ³Shannon-Wiener.

Os resultados foram significativos para o solo rizosférico, no ano de 2010, para as duas enzimas *HhaI* e *MspI*, com relação ao número de UTOs. O menor número de UTOs foi encontrado na dose 16 Mg ha⁻¹ e o maior para a dose 8 Mg ha⁻¹. O índice de Shannon (2010) apresentou, no solo rizosférico (*HhaI*) menor valor (0,80) para dose 16 Mg ha⁻¹ e maior valor (1,34) para o solo controle. Em 2011, o índice permaneceu o mesmo

para a dose 16 Mg ha⁻¹, e diminuiu nos outros tratamentos. Resultados para Equitabilidade, no solo rizosférico, foi maior (0,33) na dose 16 Mg ha⁻¹, em 2011 (*HhaI*). No entanto, pela enzima *MspI*, no solo não rizosférico, a dose 16 Mg ha⁻¹ foi o tratamento com menor valor (0,34) em contradição com o solo controle (0,42).

Pela análise de similaridade (ANOSIM) foi possível verificar (Tabela 4.10) as interações entre a estrutura da comunidade microbiana de T-RFs de Archaea. Verificou-se alta similaridade (baixo valor de R) para a maioria dos tratamentos com diferentes doses de biocarvão para as duas enzimas (*HhaI* e *MspI*) nos anos de 2010 e 2011. A dose 16 Mg ha⁻¹ apresentou dissimilaridade (*MspI*) com relação ao solo controle (0,15) em 2010 e com relação a todos os tratamentos (*HhaI*) em 2011.

Em 2010, avaliando o solo rizosférico e sua dose correspondente no solo não rizosférico, verificou-se que a tratamento controle apresentou maior similaridade para a enzima *HhaI* (-0,005) e seguidamente para *MspI* (0,15), quando comparado aos tratamentos com biocarvão. Em 2011, ocorreu maior dissimilaridade para as doses 2 (0,56) e 4 (0,40) Mg ha⁻¹. Em geral o solo rizosférico apresentou maior dissimilaridade.

O ANOSIM para o biocarvão mostrou que entre B e C, ocorreu alta dissimilaridade com valores de 0,83 para *MspI* e 0,91 para *HhaI*. Os tratamentos do solo rizosférico, quando comparados com B mostrou maior similaridade (R médio 0,26 para *HhaI* e 0,31 para *MspI*) em relação aos tratamentos do solo comparados com B (R médio 0,38 para *HhaI*). B (*MspI*) em 2011 mostrou similaridade ao solo não rizosférico em todos os tratamentos. O biocarvão (C) sem adição ao solo apresentou alta dissimilaridade com os tratamentos do solo rizosférico e não rizosférico (> 0,67).

Resultados para NMDS, gráfico associado com a análise de similaridade (ANOSIM), podem ser verificados na Figura 4.5. Assim como verificado para ANOSIM, no gráfico NMDS, as amostras referentes à dose 16 Mg ha⁻¹ se agrupam melhor que as amostras referentes aos outros tratamentos. O solo rizosférico se distingue melhor que o solo não rizosférico em 2011. O biocarvão extraído do solo se agrupam com as amostras do solo rizosférico.

4.3.2 Estrutura da comunidade de fungo

A análise de *fingerprint* de T-RFLP para 18S rRNA de *Fungi* do solo rizosférico, solo não rizosférico, biocarvão antes e após uso no solo, para os anos 2010 e 2011 (enzimas *AluI* e *HinfI*) é mostrada na Figura 4.6. Mudanças na abundância relativa

foram maiores para os T-RFs 350 e 336 pb quando utilizado a enzima *AluI*, e para os T-RFs 108, 138, 262 e 186 pb, quando usado a enzima *HinfI*.

Tabela 4.10. Análise de similaridade (ANOSIM) para as comunidade de *Archaea* nos anos 2010 e 2011 utilizando a enzima *HhaI* e *MspI* para o solo rizosférico (R) e solo não rizosférico (S), para as doses 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ de biocarvão e para o biocarvão extraído após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Enzima	Doses	Solo Rizosférico (R)					(R) X (S)	Doses	Solo (S)					
	Mg ha ⁻¹	0	2	4	8	16		Mg ha ⁻¹	0	2	4	8	16	B
-----2010-----														
<i>HhaI</i>	0						-0,005	0						
	2	0,135					0,239	2	-0,025					
	4	0,089	-0,019				0,205	4	-0,036	-0,056				
	8	0,064	0,025	-0,038			0,068	8	-0,062	-0,032	-0,054			
	16	0,258	-0,027	0,019	0,128		0,409	16	-0,009	-0,038	-0,041	-0,017		
<i>MspI</i>	0						0,15	0						
	2	0,064					0,468	2	0,016					
	4	0,078	-0,045				0,314	4	-0,005	0,009				
	8	0,152	-0,035	-0,027			0,297	8	0,05	0,027	0,005			
	16	0,153	-0,061	-0,019	-0,024		0,426	16	0,008	-0,055	-0,029	-0,051		
-----2011-----														
<i>HhaI</i>	0						0,313	0						
	2	0,014					0,569	2	-0,041					
	4	-0,028	-0,006				0,407	4	-0,052	-0,034				
	8	-0,052	0,015	-0,024			0,29	8	-0,008	-0,004	0,001			
	16	0,153	0,355	0,284	0,177		0,321	16	-0,05	-0,034	-0,06	-0,003		
	B	0,142	0,496	0,246	0,168	0,258			0,348	0,408	0,387	0,332	0,43	
<i>MspI</i>	C	0,712	0,96	0,953	0,671	0,528			0,697	0,701	0,754	0,733	0,754	0,914
	0						0,247	0						
	2	-0,015					0,257	2	-0,036					
	4	-0,043	-0,01				0,212	4	-0,011	-0,008				
	8	-0,045	-0,032	-0,034			0,215	8	-0,022	-0,016	-0,015			
	16	0,037	0,011	0,022	0,019		0,274	16	-0,03	-0,072	0,003	0,012		
	B	0,288	0,512	0,177	0,206	0,397			0,065	0,047	-0,034	0,115	0,081	
	C	0,931	0,929	0,942	0,941	0,942			0,927	0,923	0,942	0,942	0,924	0,833

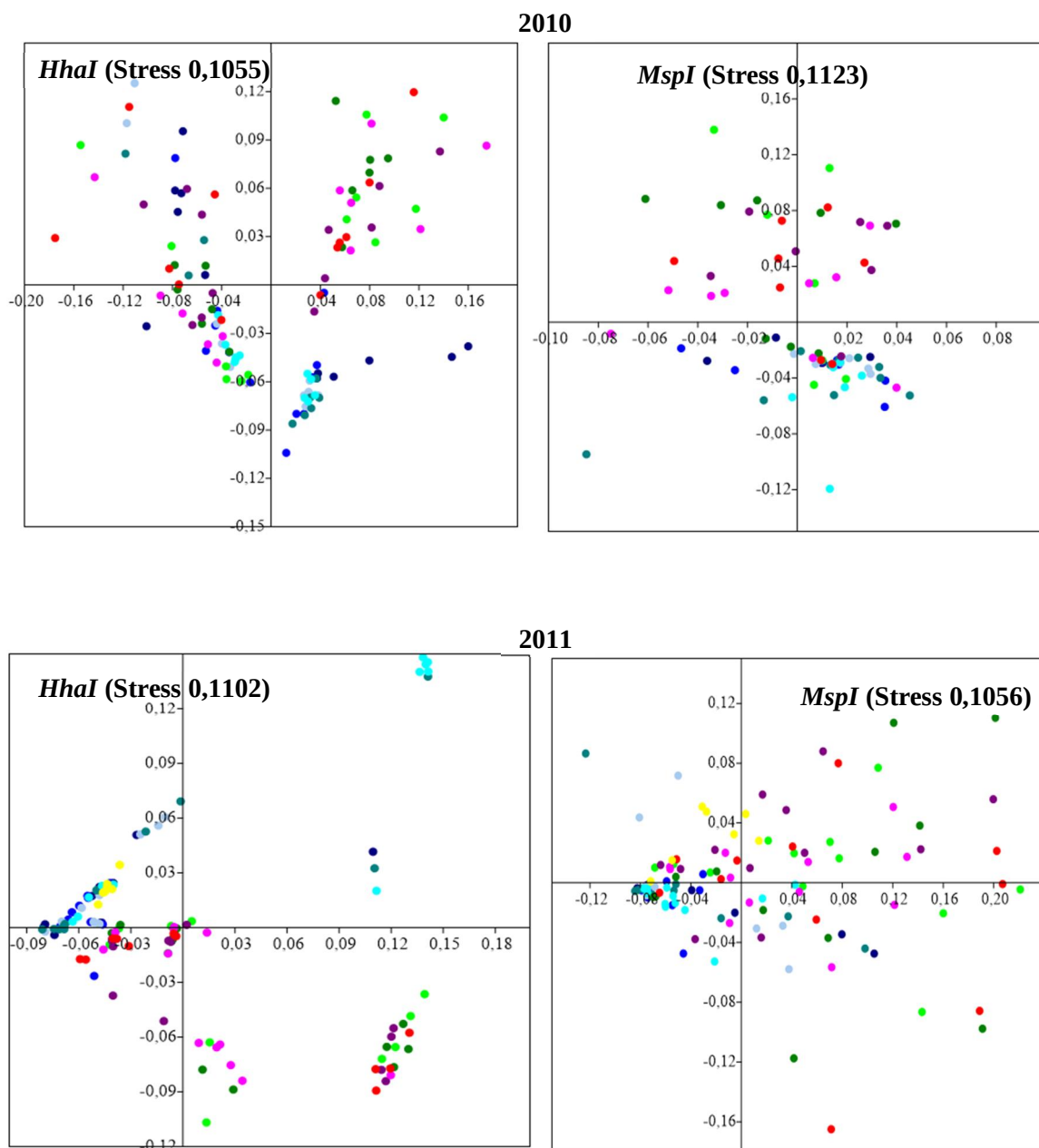


Figura 4.5. Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades microbianas do solo rizosférico e solo não rizosférico, das estruturas de comunidades de *Archaea* determinadas por T-RFLP com a enzima *HhaI* e *MspI* nos anos de 2010 e 2011. Para o solo rizosférico considera-se na testemunha (●) e as doses 2(●), 4(●), 8 (●), 16 (●) Mg,ha^{-1} de biocarvão; e no solo não rizosférico considera-se para a testemunha (●) e as doses 2 (●), 4 (●), 8 (●), 16 (●) Mg,ha^{-1} de biocarvão; e para o biocarvão extraído do solo (●).

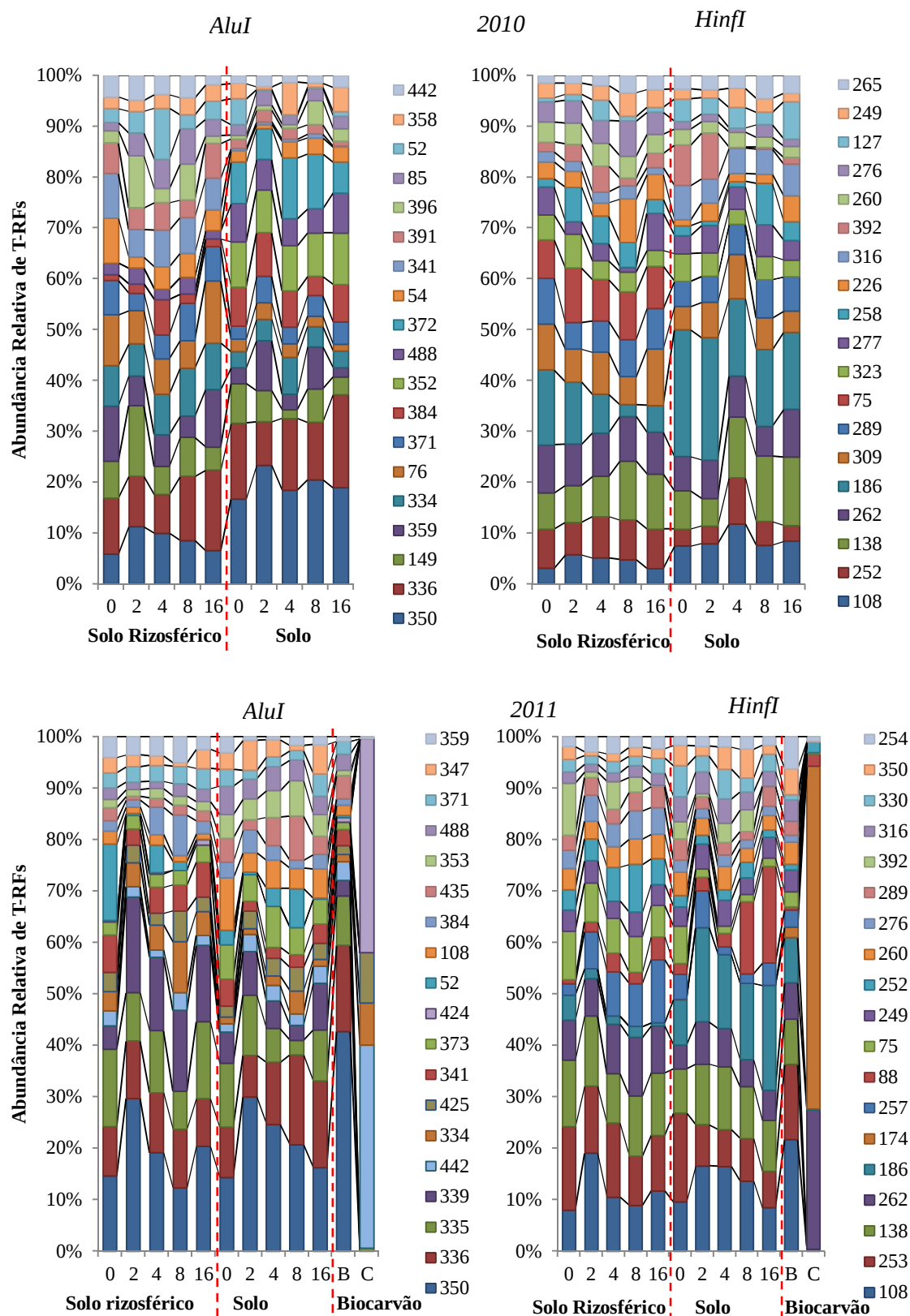


Figura 4.6. Abundância relativa de T-RFs de comunidades de *Fungi* do gene 18S-28S, com a enzima *AluI* e *HinfI* para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2010 e 2011 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C). As diferentes cores na vertical indicam os diferentes fragmentos, em pares de bases, com abundância relativa > 1,0%.

As enzimas *AluI* e *HinfI* mostraram boas variações na abundância de T-RFs entre o solo rizosférico e não rizosférico. É possível observar, na maior parte dos T-RFs, diferença na abundância do tratamento controle em relação aos tratamentos com adição de biocarvão, tanto em 2010 como em 2011.

Com a enzima *AluI*, resultados similares entre os anos de 2010 e 2011, mas mais distintos para o ano de 2011, o T-RF 350 bp é possível verificar que ao aplicar o biocarvão, inicialmente esse T-RF apresenta abundância maior na dose 2 Mg ha⁻¹, e essa abundância diminui com o aumento da dose de biocarvão no solo. O resultado é similar para a enzima *HinfI* com o T-RF 108 bp que, porém, em 2010 mostre maior abundância apenas para a dose 4 Mg ha⁻¹.

Com relação ao biocarvão antes de ser adicionado ao solo (C) há enorme diferença com abundância dos T-RFs presentes no solo. O biocarvão (B) recuperado do solo depois de cinco anos, apresentou abundância dos T-RFs similares ao do solo e solo rizosférico, embora com abundâncias diferentes.

Na Figura 4.6, o número de T-RFs e abundância foram inicialmente utilizados para o cálculo de medidas da diversidade. As medidas de diversidade foram mensuradas considerando todas as sub-mostras dos tratamentos de solo com biocarvão, para as enzimas *AluI* e *HinfI*. A Equitabilidade e o índice de Shannon foram significativos em 2011, para o solo (*HinfI*). O solo controle apresentou valor maior (0,76 e 3,8 respectivamente) e o tratamento 16 Mg ha⁻¹ o menor valor (0,72 e 3,3 respectivamente) para Equitabilidade e para Shannon (Tabela 4.12). No ano de 2010, apenas o números de UTOs no solo foi menor para os 4 (116) e 16 (131) Mg ha⁻¹, sendo verificado valor maior (136) na dose 8 Mg ha⁻¹ (Tabela 4.11).

Utilizando a análise de pares da estatística R da análise de similaridade (ANOSIM) é possível verificar na Tabela 4.13 as interações entre a estrutura da comunidade microbiana de T-RFs de Fungo. Verificou-se alta similaridade (baixo valor de R) entre os tratamentos com diferentes doses de biocarvão para as duas enzimas (*AluI* e *HinfI*) nos anos de 2010 e 2011. Em 2010, avaliando o solo rizosférico e sua dose correspondente no solo não rizosférico, é possível verificar dissimilaridade, (R próximo a 0,60, com *AluI* e R próximo a 0,35 com a enzima *HinfI*). Em 2011, maior similaridade são observadas, mas principalmente no solo controle (0,04 na *AluI* e 0,089 para *HinfI*).

Tabela 4.11. Número de UTOs, índice de Equitabilidade de Pielou e de Shannon-Wiener, para comunidades de *Fungi* com base na enzima *AluI* e *HinfI*, para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2010 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Solo (L) e antes de ser adicionado ao solo (C):											
Enzima	Doses (Mg ha ⁻¹)	Nº UTOs ¹			Equitabilidade ²			H'(log _e) ³			
AluI	-----Solo rizosférico-----										
	0	129,667	± 2,918	A	0,792	± 0,003	A	3,820	± 0,021	A	
	2	113,583	± 2,573	A	0,771	± 0,005	A	3,603	± 0,023	A	
	4	113,167	± 1,784	A	0,758	± 0,003	A	3,574	± 0,021	A	
	8	125,417	± 3,034	A	0,773	± 0,003	A	3,698	± 0,029	A	
	16	110,750	± 2,358	A	0,787	± 0,003	A	3,676	± 0,017	A	
	-----Solo-----										
	0	87,833	± 1,037	A	0,733	± 0,008	A	3,277	± 0,041	A	
	2	88,500	± 0,542	A	0,749	± 0,007	A	3,357	± 0,034	A	
	4	89,000	± 1,294	A	0,732	± 0,007	A	3,281	± 0,034	A	
	8	97,750	± 1,274	A	0,747	± 0,008	A	3,419	± 0,039	A	
	16	96,417	± 1,472	A	0,774	± 0,006	A	3,517	± 0,022	A	
HinfI	-----Solo rizosférico-----										
	0	163,250	± 2,529	A	0,772	± 0,002	A	3,918	± 0,016	A	
	2	154,833	± 2,341	A	0,754	± 0,002	A	3,786	± 0,016	A	
	4	155,750	± 1,472	A	0,765	± 0,002	A	3,858	± 0,013	A	
	8	148,667	± 3,171	A	0,753	± 0,002	A	3,732	± 0,030	A	
	16	153,000	± 2,194	A	0,777	± 0,002	A	3,893	± 0,009	A	
	-----Solo-----										
	0	129,667	± 0,767	AB	0,763	± 0,004	A	3,711	± 0,023	A	
	2	121,333	± 0,765	AB	0,737	± 0,006	A	3,536	± 0,031	A	
	4	116,000	± 3,101	B	0,738	± 0,005	A	3,347	± 0,079	A	
	8	136,083	± 1,117	A	0,770	± 0,005	A	3,781	± 0,026	A	
	16	131,583	± 2,473	B	0,778	± 0,007	A	3,778	± 0,038	A	

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; $\pm$ erro padrão da média ($n = 12$).

¹Unidades taxionômicas operacionais; ² Equitabilidade de Pielou; ³ Shannon-Wiener.

O ANOSIM para o biocarvão mostra alta dissimilaridade entre B e C (0,83 para *AluI* e 0,94 para *HinfI*). B apresentou maior dissimilaridade com o solo rizosférico em relação ao solo não rizosférico. B apresentou maior dissimilaridade com a dose controle no solo não rizosférico para *AluI* (0,48) e *HinfI* (0,53), quando comparado com a doses de biocarvão no solo. O biocarvão sem adição ao solo mostrou alta dissimilaridade tanto para o solo não rizosférico, como para o solo rizosférico. Resultados para NMDS, gráfico associado com a análise de similaridade (ANOSIM), podem ser verificados na Figura 4.7. Assim como verificado para ANOSIM, é possível verificar separação entre os tratamentos do solo rizosférico e o solo não rizosférico, em 2010, para as duas enzimas, e em 2011,

apenas para enzima *HinfI*. Em 2011, as amostras do biocarvão retirado do solo se agruparam próximo às amostras do solo não rizosférico.

Tabela 4.12. Número de UTOs, índice de Equitabilidade de Pielou e de Shannon-Wiener, para comunidades de *Fungi* com base na enzima *AluI* e *HinfI*, para os tratamentos do solo rizosférico, solo não rizosférico, obtidos em 2011 e biocarvão após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Enzima	Doses (Mg ha ⁻¹)	Nº UTOs ²			Equitabilidade ²			H'(log _e) ³			
AluI	-----Solo rizosférico-----										
	0	93,500	± 1,673	A	0,727	± 0,008	A	3,289	± 0,040	A	
	2	89,833	± 1,122	A	0,709	± 0,006	A	3,180	± 0,025	A	
	4	94,833	± 2,477	A	0,718	± 0,005	A	3,246	± 0,032	A	
	8	93,333	± 1,570	A	0,753	± 0,006	A	3,395	± 0,026	A	
	16	82,250	± 1,641	A	0,723	± 0,007	A	3,161	± 0,027	A	
	-----Solo-----										
	0	101,083	± 1,702	A	0,747	± 0,004	A	3,433	± 0,022	A	
	2	102,000	± 2,260	A	0,704	± 0,004	A	3,240	± 0,031	A	
	4	104,333	± 2,495	A	0,707	± 0,003	A	3,267	± 0,028	A	
	8	98,917	± 2,989	A	0,741	± 0,007	A	3,362	± 0,038	A	
	16	99,583	± 3,740	A	0,762	± 0,007	A	3,208	± 0,071	A	
	-----Biocarvão-----										
	B	86,375	± 1,275		0,658	± 0,008		2,932	± 0,037		
	C	21,000	± 7,265		0,878	± 1,000		2,319	± 0,263		
HinfI	-----Solo rizosférico-----										
	0	132,833	± 1,250	A	0,731	± 0,004	A	3,573	± 0,024	A	
	2	115,583	± 2,946	A	0,757	± 0,005	A	3,390	± 0,056	A	
	4	132,917	± 1,597	A	0,727	± 0,004	A	3,553	± 0,024	A	
	8	133,000	± 1,698	A	0,745	± 0,003	A	3,639	± 0,020	A	
	16	133,333	± 1,113	A	0,749	± 0,004	A	3,662	± 0,020	A	
	-----Solo-----										
	0	154,750	± 2,968	A	0,762	± 0,003	A	3,832	± 0,029	A	
	2	129,833	± 3,383	A	0,739	± 0,004	AB	3,543	± 0,030	AB	
	4	144,667	± 2,552	A	0,739	± 0,004	AB	3,669	± 0,032	AB	
	8	137,750	± 3,166	A	0,724	± 0,006	AB	3,557	± 0,046	AB	
	16	136,167	± 4,540	A	0,721	± 0,005	B	3,375	± 0,079	B	
	-----Biocarvão-----										
	B	110,000	± 2,296		0,691	± 0,008		3,239	± 0,041		
	C	29,667	± 9,714		0,768	± 1,000		2,369	± 0,286		

Números seguidos pelas mesmas letras nas colunas não são diferentes pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$; ± erro padrão da média ($n = 12$).

¹Unidades taxionômicas operacionais; ² Equitabilidade de Pielou; ³ Shannon-Wiener.

Tabela 4.13. Análise de similaridade (ANOSIM) para as comunidades de *Fungo* nos anos 2010 e 2011 utilizando a enzima *AluI* e *HinfI* para o solo rizosférico (R) e solo não rizosférico (S), para as doses 0, 2, 4, 8 e 16 Mg ha⁻¹ de biocarvão e para o biocarvão extraído após cinco anos no solo (B) e antes de ser adicionado ao solo (C).

Enzima	Doses		Solo Rizosférico (R)					(R) X (S)	Doses		Solo (S)					
	Mg ha ⁻¹	0	2	4	8	16	Mg ha ⁻¹		0	2	4	8	16	B		
-----2010-----																
AluI	0						0,691	0								
	2	0,092					0,578	2	-0,068							
	4	0,052	0,037				0,617	4	-0,039	-0,031						
	8	0,092	0,007	0,001			0,642	8	-0,006	-0,04	0,012					
	16	0,102	0,099	0,045	0,097		0,645	16	-0,067	-0,05	-0,009	0,006				
HinfI	0						0,351	0								
	2	0,068					0,355	2	-0,065							
	4	0,056	0,004				0,3	4	-0,01	0,01						
	8	0,22	0,117	0,041			0,367	8	-0,027	-0,004	-0,041					
	16	0,083	0,091	0,048	0,122		0,437	16	-0,003	-0,015	-0,025	-0,016				
-----2011-----																
AluI	0						0,045	0								
	2	0,181					0,176	2	0,04							
	4	0,007	0,023				0,172	4	-0,001	-0,061						
	8	0,092	0,145	0,002			0,223	8	0,056	0,063	-0,053					
	16	0,027	0,047	-0,013	0,057		0,087	16	-0,072	-0,019	-0,074	0,002				
	B	0,499	0,524	0,501	0,594	0,492			0,486	0,454	0,414	0,456	0,418			
	C	0,996	1	1	1	1			0,999	1	0,992	0,996	1	0,833		
HinfI	0						0,089	0								
	2	0,119					0,191	2	0,082							
	4	0,024	0,089				0,289	4	0,041	-0,093						
	8	0,119	0,151	-0,023			0,343	8	0,03	-0,009	-0,037					
	16	0,115	0,029	0,008	0,072		0,266	16	0,038	-0,059	-0,016	-0,067				
	B	0,637	0,633	0,641	0,698	0,656			0,536	0,48	0,43	0,363	0,366			
	C	1	1	1	1	1			1	1	0,994	0,997	0,982	0,946		

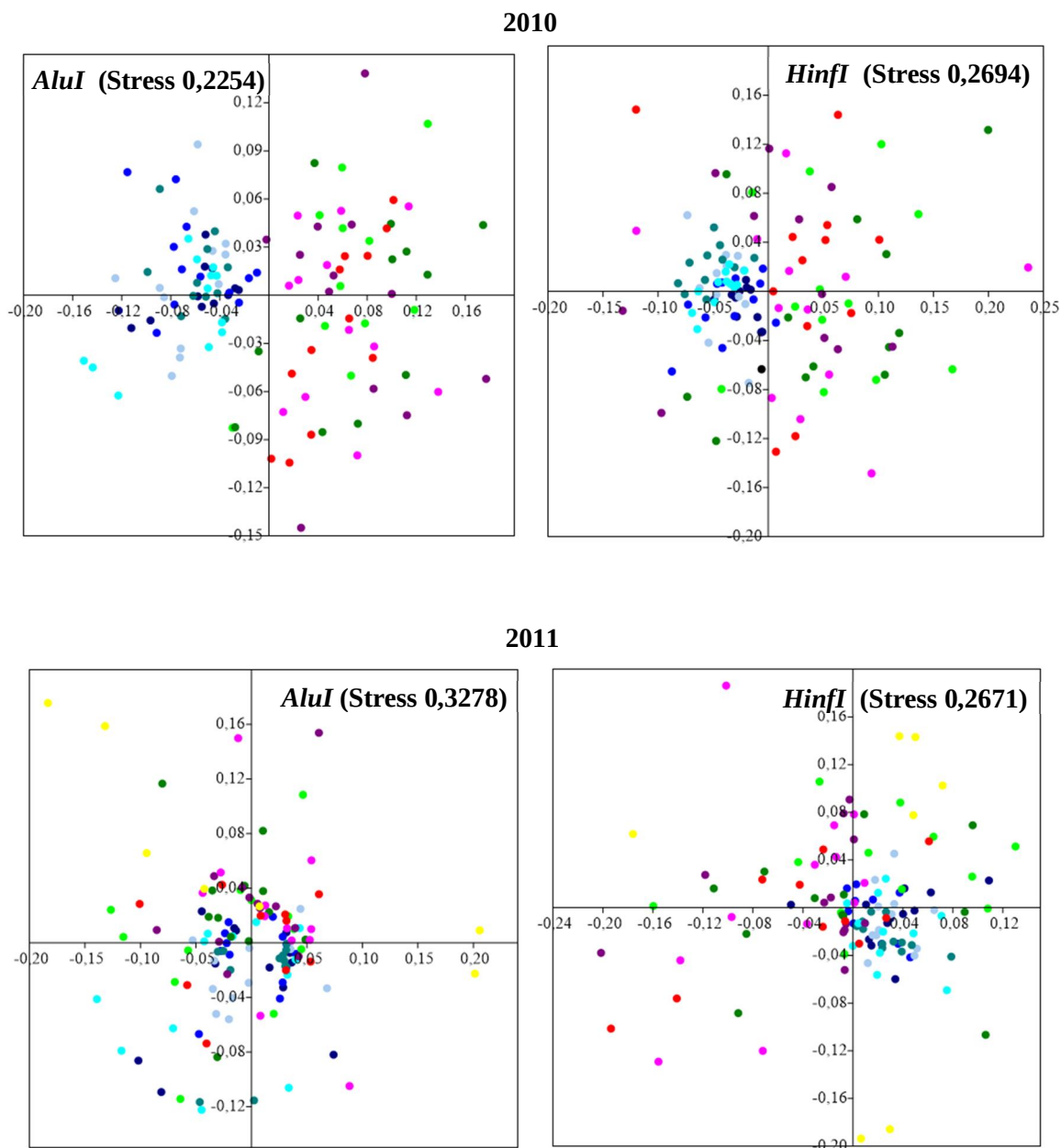


Figura 4.7. Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades microbianas do solo rizosférico e solo não rizosférico, das estruturas de comunidades de fungos determinadas por T-RFLP com a enzima *AluI* e *HinfI* nos anos de 2010 e 2011. Para o solo rizosférico considera-se na testemunha (●) e as doses 2 (●), 4 (●), 8 (●), 16 (●) Mg,ha^{-1} de biocarvão; e no solo não rizosférico considera-se para a testemunha (●) e as doses 2 (●), 8 (●), 4 (●), 16 (●) Mg,ha^{-1} de biocarvão; e para o biocarvão extraído do solo (●).

4.4 DISCUSSÕES

4.4.1 Efeito do biocarvão nas comunidades de bactéria, archaea e fungo do solo

As estruturas das comunidades de archaea apresentaram-se diferentes entre os tratamentos do solo rizosférico e do solo não rizosférico conforme as doses de biocarvão, e apresentaram-se mais eficiente em determinar a diferença entre os tratamentos com biocarvão. De forma intermediária, as estruturas de fungos no solo, também foram eficientes na determinação da diferença entre as doses de biocarvão no solo rizosférico e não rizosférico. Por ultimo se distinguiram a estrutura das comunidades de Bactérias, com menor distinção entre as doses de biocarvão. De acordo com Aller & Kemp (2008), archaea e bactéria possuem papéis ecológicos diferentes no ambiente. Em um mesmo ambiente, na maioria das vezes, archaea possui menor diversidade em relação à diversidade de bactérias. Isso ocorre, pois, archaeas vivem em micronichos mais restritos, enquanto bactérias se desenvolvem em condições mais abrangentes. Grossman et al. (2010), avaliando solo de Terra Preta de Índio, também verificaram menor diversidade de archaea em relação à de bactérias. E de acordo com Lupatini et al. (2013), a estrutura de comunidades de archaea são mais afetadas pelo tipo de solo, enquanto a estrutura de comunidades de fungos são mais afetadas pelo tipo de uso do solo. Considerando-se que no experimento em estudo, o tipo de solo e o tipo de manejo são os mesmo, as doses de biocarvão também influenciaram na estrutura observada dessas comunidades de archaea, bactéria e fungo tanto no solo rizosférico como no solo não rizosférico. Kolton et al. (2011) verificaram diferenças na comunidade de bactérias do solo rizosférico, em solos condicionados com biochar, por curto período.

Para as doses de biocarvão avaliadas, foi possível verificar que a dose 16 Mg ha⁻¹ apresentou diferença na diversidade, quando comparada com o solo controle. Foi possível verificar menor diversidade de bactérias e fungos no solo não rizosférico e menor diversidade de archaea no solo rizosférico. Essa menor diversidade se caracterizou pelo crescimento de algumas espécies em detrimento do menor desenvolvimento de outras. Para a comunidade de archaea e fungo, é possível indicar, pela abundância de T-RFs, que uma porcentagem considerável de archaea e fungo apresentaram seu crescimento limitado pela dose mais elevada de biocarvão (16 Mg ha⁻¹). E que doses menores, como 2 e 4 Mg ha⁻¹ podem ter estimulado melhor o desenvolvimento da diversidade no solo rizosférico. Por exemplo, Chen et al. (2013) ao avaliar solo arenoso, de plantio de arroz inundado, com

doses de biocarvão 20 e 40 Mg ha⁻¹ observaram aumento do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* (28 e 64 %, respectivamente) e diminuição do número de cópias do gene 18S rRNA de *Fungo* (35 e 46%, respectivamente). Jones et al. (2012) avaliando biocarvão de diferentes árvores, nas doses 25 e 50 Mg ha⁻¹, em Cambissolo de textura franco argilo arenosa, verificou que o raio de crescimento de fungo para bactéria foi 30 % menor.

4.4.2 Comunidades de bactéria, archaea e fungo associados ao biocarvão

A diversidade de bactérias do biocarvão apresentou valores similares à diversidade do solo rizosférico em comparação à diversidade do solo não rizosférico. O biocarvão é uma forma de matéria orgânica, e a maior diferença química entre o biocarvão e outra matéria orgânica é a proporção muito maior de C aromáticos e, mais especificamente, a ocorrência de estruturas aromáticas fundidas (Lehmann et al., 2011). Solo rizosférico, naturalmente, possui menor diversidade de comunidade de bactérias em relação ao solo não rizosférico. Diferenças entre a composição da comunidade microbiana do solo rizosférico com o solo não rizosférico são descritas e são atribuídos aos diferentes tipos de exsudatos de raízes que são liberados na região da rizosfera, o que permitem selecionar microrganismos específicos (Kielak et al., 2008). Dessa forma, é possível indicar que, no biocarvão, mesmo sendo uma forma de matéria orgânica diferente da encontrada facilmente disponível no solo e na rizosfera, ocorreu, no biocarvão, uma preferência maior de ocorrência das bactérias, que surgem preferencialmente no solo rizosférico. Portanto, a adição de biocarvão ao solo, como um todo, permite que este apresente propriedades semelhantes ao do solo rizosférico, para o desenvolvimento de bactérias. Confirmando essa hipótese, é observado, na dose 16 Mg ha⁻¹ maior similaridade entre o solo rizosférico e o biocarvão do solo.

A diversidade de archaea, no biocarvão, também apresentou maior similaridade no solo rizosférico, em relação ao solo não rizosférico (*HhaI*). No entanto, foi observado maior dissimilaridade na dose 2 Mg ha⁻¹ do solo rizosférico, tanto em relação ao biocarvão como do solo rizosférico com o solo não rizosférico. A comunidade de archaea associada com raízes de milho em solo arenoso já foi observada como muito menos diversificada (Chelius & Triplett, 2001). Da mesma forma se observa para os resultados obtidos nesse estudo. Dessa forma, foi possível verificar que o biocarvão também hospeda archaea que estão presentes no solo rizosférico, assim como foi observado para bactérias.

A diversidade dos fungos, no biocarvão, apresentou maior similaridade com o solo não rizosférico, podendo-se indicar que, quanto maior a dose, maior a similaridade. Dessa forma, pode-se inferir que o biocarvão, em maior parte, estimula o crescimento de fungo que possuem maior presença no solo. Ritz & Young (2004) descrevem que hifas de fungos geralmente crescem em superfícies, absorvendo os nutrientes do substrato, mas também são capazes de crescer através do ar e poros do solo com aparente facilidade. Essa forma simples de crescimento subscreve estratégias que permitem o crescimento esparsos, explorando substratos onde está ausente um crescimento mais denso e a alimentação disponível. Assim, pode-se descrever que, como o biocarvão apresenta-se no solo como um novo substrato, os fungos tendem a colonizá-lo facilmente, em busca de alimentação.

Navarrete et al. (2010) avaliando o solo e o biocarvão de Terra Preta de Índio do Amazonas notaram diferenças quanto a abundância da composição da comunidade de Bactéria. Taketani et al. (2013), observaram similar estrutura de Bactérias no biocarvão e no solo de Terra Preta de Índio, de onde o biocarvão fora extraído, não sendo possível verificar uma comunidade específica diferente para o biocarvão (apenas para o solo adjacente), o que sugeriu que forças de seleção dos microrganismos atuam de forma semelhante no solo e no biocarvão.

Quando se considera o biocarvão antes de ser adicionado ao solo, foi possível verificar a dissimilaridade com relação bactéria, archaea, e principalmente fungo. Maior diferença foi observada no biocarvão antes e após ser adicionada ao solo. Isso indicou que as condições de armazenamento do biocarvão, antes desse ser adicionado ao solo, pode lhes proporcionar ganho em diversidade de bactérias, archaea e fungo. Mas, após ser adicionado ao solo, o biocarvão adquire a diversidade similar a existente nesse solo. Jones et al. (2012), avaliaram a atividade biológica do biocarvão ao ser utilizado no solo, e após esse biocarvão ser condicionado no solo por três anos. Observaram que o biocarvão fresco, quando é aplicado no solo possui pouco potencial biológico e pouca atividade biológica e, após algum tempo no solo, esse potencial biológico é acrescentado pelos microrganismos existentes do solo.

4.5 CONCLUSÕES

É possível concluir que as comunidades de archaea, bactéria e fungo se distinguiram entre o solo rizosférico e o solo não rizosférico. Archaea e, em sequência, comunidades de fungo foram mais eficientes na determinação da diversidade do solo

condicionado com biocarvão. Mas quando se consideram as doses de biocarvão utilizadas, a dose 16 Mg ha⁻¹ apresentou menor diversidade quando comparada com o solo controle, diferenciando entre o solo rizosférico e o solo não rizosférico.

O biocarvão adicionado ao solo apresentou comunidades de bactéria e archaea similares ao do solo rizosférico. A comunidade de fungo do biocarvão foi similar à do solo. Além disso, antes de ser adicionado ao solo, o biocarvão apresentou potencial de desenvolver archaea, bactéria e fungo em sua estrutura. No entanto, após ser adicionado ao solo, por algum período, o biocarvão adquiriu diversidade de microrganismos similar à do solo onde fora condicionado.

Estudos com doses menores de biocarvão devem ser estimulados no sentido de verificar o efeito dessas menores doses no melhor desenvolvimento de archaea, bactéria e fungo, no solo.

4.6 REFERÊNCIAS

- ABREU, C. D.; LOPES, A.; SANTOS, G.; NOVAIS, R.; ALVAREZ V, V.; BARROS, N.; FONTES, R.; CANTARUTTI, R.; NEVES, J. Micronutrientes. **NOVAIS, RF et al. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS**, p. 724-736, 2007.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, 1995.
- ALLER, J. Y.; KEMP, P. F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 1, p. 74-87, 2008.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-69, 1995.
- ANDERSON, C. R.; CONDRON, L. M.; CLOUGH, T. J.; FIER, M.; STEWART, A.; HILL, R. A.; SHERLOCK, R. R. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. **Pedobiologia**, v. 54, n. 5-6, p. 309-320, 2011.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. **Soil science**, v. 130, n. 1, p. 211-216, 1980.
- ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, A.; KH. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.
- ANDRADE, E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; OLIVEIRA, E. L. D. Effect of organic matter on manganese solubility. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 17-20, 2002.

- BENITES, V. D. M.; TEIXEIRA, W. G.; REZENDE, M.; PIMENTA, A. Utilização de carvão e subprodutos da carbonização vegetal na agricultura: aprendendo com as Terras Pretas de Índio. In: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. I. (Ed.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. MANAUS: EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2009. p. 285-296.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 1-13, 2004.
- BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 837-842, 1985.
- C JESUS, E.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; DE S MOREIRA, F. M. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME J**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.
- CASTALDI, S.; RIONDINO, M.; BARONTI, S.; ESPOSITO, F. R.; MARZAIOLI, R.; RUTIGLIANO, F. A.; VACCARI, F. P.; MIGLIETTA, F. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes. **Chemosphere**, v. 85, n. 9, p. 1464-1471, 2011.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; DE F. GUIMARÃES, M.; FONSECA, I. C. B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the state of Parana, Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2002. doi: 10.1016/S0167-1987(01)00275-6.
- CHAN, K.; VAN ZWIETEN, L.; MESZAROS, I.; DOWNIE, A.; JOSEPH, S. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. **Soil Research**, v. 45, n. 8, p. 629-634, 2008.
- CHELIUS, M.; TRIPLETT, E. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbial ecology**, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.
- CHEN, J.; LIU, X.; ZHENG, J.; ZHANG, B.; LU, H.; CHI, Z.; PAN, G.; LI, L.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; WANG, J.; YU, X. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. **Applied Soil Ecology**, v. 71, n. 0, p. 33-44, 2013.
- CLARKE, K.; GORLEY, R. User manual/tutorial. **Primer-E Ltd., Plymouth**, p. 93, 2006.
- COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 479-497, 2005.
- DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: Método da fumigação-extração. **EMBRAPA-CNPAB. Documentos**, p. 34, 1997.
- DURENKAMP, M.; LUO, Y.; BROOKES, P. C. Impact of black carbon addition to soil on the determination of soil microbial biomass by fumigation extraction. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 2026-2029, 2010.
- ELAD, Y.; DAVID, D. R.; HAREL, Y. M.; BORENSHTEIN, M.; KALIFA, H. B.; SILBER, A.; GRABER, E. R. Induction of Systemic Resistance in Plants by Biochar, a Soil-Applied Carbon Sequestering Agent. **Phytopathology**, v. 100, n. 9, p. 913-921, 2010. Acesso em: 2013/09/13.

- EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. **Rio de Janeiro: Embrapa Solos**, 1997.
- FARRELL, M.; MACDONALD, L.; BUTLER, G.; CHIRINO-VALLE, I.; CONDRON, L. Biochar and fertiliser applications influence phosphorus fractionation and wheat yield. **Biology and fertility of soils**, p. 1-10, 2013.
- FENG, Y.; XU, Y.; YU, Y.; XIE, Z.; LIN, X. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, n. 0, p. 80-88, 2012.
- FONSECA, G. C.; CARNEIRO, M. A. C.; COSTA, A. R.; OLIVEIRA, G. C.; BALBINO, L. C. Atributos físicos, químicos e biológicos de Latossolo Vermelho distrófico de cerrado sob duas rotações de cultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 1, p. 22-30, 2007.
- FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. D. A.; DOS SANTOS, H. P.; SILVA, C. A.; FADIGAS, F. D. S. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 64, n. 3, p. 221-230, 2002.
- GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1478, p. 187-196, 2007.
- GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. 190-194. **Sustainable management of soil organic matter. CAB International, Wallingford, UK**, 2000.
- GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The Terra Preta phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 1, p. 37-41, 2001.
- GRABER, E. R.; MELLER HAREL, Y.; KOLTON, M.; CYTRYN, E.; SILBER, A.; RAV DAVID, D.; TSECHANSKY, L.; BORENSHTEIN, M.; ELAD, Y. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. **Plant and soil**, p. 1-16, 2010.
- GROSSMAN, J. M.; O'NEILL, B. E.; TSAI, S. M.; LIANG, B.; NEVES, E.; LEHMANN, J.; THIES, J. E. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial ecology**, v. 60, n. 1, p. 192-205, 2010.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. Grupo A, 2007.
- HE, J.-Z.; SHEN, J.-P.; ZHANG, L.-M.; ZHU, Y.-G.; ZHENG, Y.-M.; XU, M.-G.; DI, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2364-2374, 2007.
- HU, L.; CAO, L.; ZHANG, R. Bacterial and fungal taxon changes in soil microbial community composition induced by short-term biochar amendment in red oxidized loam soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-8, 2013.

- HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278 - 285, 1998.
- INDA, A. V.; TORRENT, J.; BARRÓN, V.; BAYER, C. Aluminum hydroxy-interlayered minerals and chemical properties of a subtropical Brazilian Oxisol under no-tillage and conventional tillage. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2010.
- JONES, D.; ROUSK, J.; EDWARDS-JONES, G.; DELUCA, T.; MURPHY, D. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 113-124, 2012.
- KHODADAD, C. L.; ZIMMERMAN, A. R.; GREEN, S. J.; UTHANDI, S.; FOSTER, J. S. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 385-392, 2011.
- KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 3, p. 372-382, 2008.
- KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- KOLTON, M.; HAREL, Y. M.; PASTERNAK, Z.; GRABER, E. R.; ELAD, Y.; CYTRYN, E. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4924-4930, 2011.
- LEHMANN, J. Bio-energy in the black. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 7, p. 381-387, 2007a.
- LEHMANN, J. A handful of carbon. **Nature**, v. 447, n. 7141, p. 143-144, 2007b.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. **Biochar for environmental management: science and technology**. Earthscan, 2009.
- LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.04.022.
- LUPATINI, M.; JACQUES, R. J. S.; ANTONIOLLI, Z. I.; SULEIMAN, A. K. A.; FULTHORPE, R. R.; ROESCH, L. F. W. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 223-233, 2013.
- MADARI, B. E.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D.; MARTIN-NETO, L.; BENITES, V.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. Matéria Orgânica dos Solos Antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): suas características e papel na sustentabilidade da Fertilidade do Solo. **Teixeira, WG, Kern, DC, Madari, BE; Lima, EN, Woods, WI As terras Pretas de Índio da Amazônia: Sua Caracterização e Uso deste Conhecimento na Criação de Novas áreas. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil**, 2009.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton university press Princeton, v. 179, 1988.

MAIA, C. M. B. F.; MADARI, B. E.; NOVOTNY, E. H. **Advances in Biochar Research in Brazil**. v. 5, 2011. Acesso em: 2011.

MAJOR, J.; RONDON, M.; MOLINA, D.; RIHA, S.; LEHMANN, J. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and soil**, v. 333, n. 1-2, p. 117-128, 2010.

MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 323-327, 1999.

METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome research**, v. 15, n. 12, p. 1767-1776, 2005.

MEURER, E. J. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. **NOVAIS, RF et al. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS**, p. 65-90, 2007.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006, 729 p.

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA, 2008.

NAVARRETE, A. A.; CANNAVAN, F. S.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. A Molecular Survey of the Diversity of Microbial Communities in Different Amazonian Agricultural Model Systems. **Diversity**, v. 2, n. 5, p. 787-809, 2010.

NAVARRO-NOYA, Y. E.; SUÁREZ-ARRIAGA, M. C.; ROJAS-VALDES, A.; MONTROYA-CIRIACO, N. M.; GÓMEZ-ACATA, S.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; DENDOOVEN, L. Pyrosequencing analysis of the bacterial community in drinking water wells. **Microbial ecology**, v. 66, n. 1, p. 19-29, 2013.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E.; SPARKS, D.; PAGE, A.; HELMKE, P.; LOEPPERT, R.; SOLTANPOUR, P.; TABATABAI, M.; JOHNSTON, C.; SUMNER, M. Total carbon, organic carbon, and organic matter. **Methods of soil analysis. Part 3-chemical methods.**, p. 961-1010, 1996.

NOVAK, J. M.; LIMA, I.; XING, B.; GASKIN, J. W.; STEINER, C.; DAS, K.; AHMEDNA, M.; REHRAH, D.; WATTS, D. W.; BUSSCHER, W. J. Characterization of designer biochar produced at different temperatures and their effects on a loamy sand. **Annals of Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 2, 2009.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, M.; GOMES, J.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial ecology**, v. 58, n. 1, p. 23-35, 2009.

OKUBO, A.; SUGIYAMA, S.-I. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. **Ecological Research**, v. 24, n. 6, p. 1399-1405, 2009.

PACE, N. R. Microbial ecology and diversity. **American Society of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 328 - 333, 1999.

PACHECO, L. P.; LEANDRO, W. M.; MACHADO, P. D. A.; ASSIS, R. D.; COBUCCI, T.; MADARI, B. E.; PETTER, F. A. Produção de fitomassa e acúmulo e liberação de

nutrientes por plantas de cobertura na safrinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 17-25, 2011.

PETTER, F. A. **Biomassa carbonizada como condicionador de solo: aspectos agrônômicos e ambientais de seu uso em solos de Cerrado**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PIETIKÄINEN, J.; KIIKKILÄ, O.; FRITZE, H. Charcoal as a Habitat for Microbes and Its Effect on the Microbial Community of the Underlying Humus. **Oikos**, v. 89, n. 2, p. 231-242, 2000.

POWLSON, D.; HIRSCH, P.; BROOKES, P. The role of soil microorganisms in soil organic matter conservation in the tropics. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 61, n. 1-2, p. 41-51, 2001.

QUILLIAM, R. S.; MARSDEN, K. A.; GERTLER, C.; ROUSK, J.; DELUCA, T. H.; JONES, D. L. Nutrient dynamics, microbial growth and weed emergence in biochar amended soil are influenced by time since application and reapplication rate. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 158, p. 192-199, 2012a.

QUILLIAM, R. S.; RANGE-CROFT, S.; EMMETT, B. A.; DELUCA, T. H.; JONES, D. L. Is biochar a source or sink for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds in agricultural soils? **GCB Bioenergy**, 2012b.

RANJARD, L.; LEJON, D. P. H.; MOUGEL, C.; SCHEHRER, L.; MERDINOGLU, D.; CHAUSSOD, R. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1111-1120, 2003.

REATTO, A.; DA SILVA, E. M.; BRUAND, A.; MARTINS, E. S.; LIMA, J. E. F. W. Validity of the centrifuge method for determining the water retention properties of tropical soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, n. 6, p. 1547-1553, 2008.

RITZ, K.; YOUNG, I. M. Interactions between soil structure and fungi. **Mycologist**, v. 18, n. 2, p. 52-59, 2004.

RUGMINI, P.; BALAGOPALAN, M.; JAYARAMAN, K. Modelling the growth of teak in relation to soil conditions in the Kerala part of the Western Ghats. 2007.

SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, I. P. D.; MORAIS, R. F. D.; URQUIAGA, S. C.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Componentes da parte aérea e raízes de pastagens de *Brachiaria* spp. em diferentes idades após a reforma, como indicadores de produtividade em ambiente de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 37, n. 2, p. 119-124, 2007.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.

SOHI, S.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. A review of biochar and its use and function in soil. **Advances in Agronomy**, v. 105, p. 47-82, 2010a.

SOHI, S. P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. Chapter 2 - A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. In: DONALD, L. S. (Ed.). **Advances in Agronomy**. Academic Press, v. Volume 105, 2010b. p. 47-82.

- SPARLING, G. P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Soil Research**, v. 30, n. 2, p. 195-207, 1992.
- SPOKAS, K. A. Impact of biochar field aging on laboratory greenhouse gas production potentials. **GCB Bioenergy**, 2012.
- SPOKAS, K. A.; REICOSKY, D. C. Impacts of sixteen different biochars on soil greenhouse gas production. **Annals of Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 4, 2009.
- STEINER, C.; TEIXEIRA, W. G.; LEHMANN, J.; NEHLS, T.; DE MACÊDO, J. L. V.; BLUM, W. E.; ZECH, W. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. **Plant and soil**, v. 291, n. 1-2, p. 275-290, 2007.
- TAKETANI, R.; LIMA, A.; CONCEIÇÃO JESUS, E.; TEIXEIRA, W.; TIEDJE, J.; TSAI, S. Bacterial community composition of anthropogenic biochar and Amazonian anthrosols assessed by 16S rRNA gene 454 pyrosequencing. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 2, p. 233-242, 2013.
- TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial ecology**, v. 59, n. 4, p. 734-743, 2010.
- THIES, J. E.; RILLIG, M. C. Characteristics of biochar: biological properties. **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**, p. 85-105, 2009.
- TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 109-122, 1999.
- TÓTOLA, M.; CHAER, G. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 2, p. 195-276, 2002.
- TROMPOWSKY, P. M.; BENITES, V. D. M.; MADARI, B. E.; PIMENTA, A. S.; HOCKADAY, W. C. Characterization of humic like substances obtained by chemical oxidation of eucalyptus charcoal. **Organic Geochemistry**, v. 36, n. 3, p. 1480 - 1489, 2005.
- VAN ZWIETEN, L.; KIMBER, S.; MORRIS, S.; CHAN, K.; DOWNIE, A.; RUST, J.; JOSEPH, S.; COWIE, A. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. **Plant and soil**, v. 327, n. 1-2, p. 235-246, 2010.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.
- VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Nitrogênio da biomassa microbiana, em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por métodos de fumigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 4, p. 411-417, 1998.
- WARNOCK, D. D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T. W.; RILLIG, M. C. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and soil**, v. 300, n. 1, p. 9-20, 2007.
- WARNOCK, D. D.; MUMMEY, D. L.; MCBRIDE, B.; MAJOR, J.; LEHMANN, J.; RILLIG, M. C. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal

abundances in roots and soils: Results from growth-chamber and field experiments. **Applied Soil Ecology**, 2010.

WOOLF, D. Biochar as a soil amendment: A review of the environmental implications. 2008.

ZANÃO JÚNIOR, L. A.; LANA, R. M. Q.; GUIMARÃES, E. C. Variabilidade espacial do pH, teores de matéria orgânica e micronutrientes em profundidades de amostragem num Latossolo Vermelho sob semeadura direta. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1000-1007, 2007.

ZHANG, A.; BIAN, R.; PAN, G.; CUI, L.; HUSSAIN, Q.; LI, L.; ZHENG, J.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; HAN, X.; YU, X. Effects of biochar amendment on soil quality, crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: A field study of 2 consecutive rice growing cycles. **Field Crops Research**, v. 127, n. 0, p. 153-160, 2012.

ZHANG, A.; CUI, L.; PAN, G.; LI, L.; HUSSAIN, Q.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; CROWLEY, D. Effect of biochar amendment on yield and methane and nitrous oxide emissions from a rice paddy from Tai Lake plain, China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 139, n. 4, p. 469-475, 2010.

5 CONCLUSÕES FINAIS

- A composição elementar do biocarvão influencia na neutralização do solo e manutenção da fertilidade deste; no entanto, em altos valores de Al disponível, e baixo pH no solo, não há efeitos das diferentes doses sobre a produtividade da soja.
- Os efeitos na produtividade da soja foram altamente influenciados pelos elementos presentes na composição elementar do biocarvão.
- A biomassa microbiana do solo apresentou resultados quando os níveis de material orgânico foram significativos para as diferentes doses de biocarvão.
- A diversidade de comunidades microbianas no solo é influenciada pelas diferentes doses de biocarvão no solo.
- O biocarvão após condicionar o solo por algum tempo, apresentou diversidade microbiana semelhante ao solo.
- Estudos devem levar em consideração o efeito de doses menores de biocarvão sobre as propriedades do solo.