

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**CÍNTIA CAROLINE GOUVEIA DA SILVA**

**ABUNDÂNCIA E ESTRUTURA GENÉTICA E BIOQUÍMICA DAS  
COMUNIDADES MICROBIANAS EM SOLO ARENOSO CULTIVADO  
COM FEIJÃO E MILHO SOB APLICAÇÃO DE BIOCHARS  
ORIUNDOS DO CAFÉ**

**RECIFE**

**2019**



Cíntia Caroline Gouveia da Silva

Bióloga

**Abundância e estrutura genética e bioquímica das comunidades microbianas em solo arenoso cultivado com feijão e milho sob aplicação de biochars oriundos do café**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientadora: Profa. Dra. Erika Valente de Medeiros

Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Dr. Claude Hammecker

**Recife  
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586a Silva, Cintia Caroline Gouveia da

Abundância e estrutura genética e bioquímica das comunidades microbianas em solo arenoso cultivado com feijão e milho sob aplicação de biochars oriundos do café / Cintia Caroline Gouveia da Silva. – 2019.

109 f. : il.

Orientadora: Erika Valente de Medeiros.

Coorientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto e Claude Hammecker.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Carvão vegetal 2. Microbiologia do solo 3. Solos arenosos 4. Genética vegetal  
I. Medeiros, Erika Valente de, orient. II. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, coorient.  
III. Hammecker, Claude IV. Título

CDD 631.4

CÍNTIA CAROLINE GOUVEIA DA SILVA

**Abundância e estrutura genética e bioquímica das comunidades microbianas em solo arenoso cultivado com feijão e milho sob aplicação de biochars oriundos do café**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 19 de Fevereiro de 2019

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Erika Valente de Medeiros

Orientadora

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Unidade Acadêmica de Garanhuns

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dr. Diogo Paes da Costa

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Unidade Acadêmica de Garanhuns



## **DEDICO**

*À minha mãe Célia Cristina Gouveia da Silva, pelo seu amor incondicional, dedicação, carinho, incentivo e compreensão.*

*Ao meu pai Sandro Candido da Silva, que sempre investiu na minha formação e nunca mediu esforços para que eu tivesse a melhor educação.*

*Ao meu irmão Everton Bruno Gouveia da Silva, que é um grande, alegre e maravilhoso companheiro.*

*À minha grande família: avós, avôs (in memoriam), tios e primos pelo apoio, alegria e festas maravilhosas que sempre me serviram como fonte para recarregar as energias.*

## **OFEREÇO**





## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita bondade e misericórdia, que me sustentou e deu forças durante toda a caminhada.

À minha orientadora, profa. Dra. Erika Valente de Medeiros, pelo apoio, por me mostrar que é possível a orientação à distância, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e toda confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

À minha coorientadora e amiga, profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto, pelo apoio e por ser meu porto seguro aqui em Recife. Obrigada pela disponibilidade, orientação, ensinamentos, amizade, confiança, conversas, momentos de descontração, puxões de orelha, e por acreditar tanto em mim quando nem eu mesmo acreditava.

Ao amigo, Dr. Felipe Cury Fracetto, pelos ensinamentos, colaboração, amizade, momentos de descontração e melhores churrascos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade concedida e por fornecer a estrutura para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos meus amigos e irmãos científicos que me acolheram tão bem: Felipe Martins, Eliabe Freitas, Victor Lucas, Tiago Santos, Lucía Nuñez, Débora Sales, Andreza Silva e Yure Romero, que me ajudou na realização das análises moleculares.

Ao amigo e irmão científico José Petrônio, por toda paciência, serenidade e disponibilidade para me ajudar nas análises moleculares e transmitir o que aprendeu colaborando para realização deste trabalho. Obrigada pelas conversas, por me tranquilizar e apoiar nos momentos difíceis.

Aos meus pais e meu querido irmão pelo suporte e estrutura emocional, sendo peças fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha grande e querida família por todo apoio, motivação, alegria, confiança, torcida e carinho.

Aos meus bispos e pais espirituais, Alekxander e Sandra Thompson, pelas orações, ensinamentos, direções, aconselhamentos e correções.

Aos meus amigos de graduação Anderson Barboza, Aline Araújo, Mayara Souza, Beatriz Vasconcelos e Júnior Santos pelas conversas, motivação e apoio.

A todos os amigos da pós-graduação: Luiz Henrique, Adriana Bezerra, Juliet Emília, Emanuelle Silva, William Ramos, Joais Silva, Maria Iderlane, Jamilly Barros, Wagner Oliveira, Aglair Cardoso, Janyelle Lemos, Guilherme Andrade, Nara Núbia, Jessyka Adriana e Marilya Sousa pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados nas disciplinas, risadas, torcida, apoio e parceria no decorrer dessa jornada tornando a caminhada mais suave.

Aos Doutores Emmanuella Vila Nova, Danúbia Lima e Hidelblandi Melo pela amizade, apoio, conhecimentos e experiências compartilhadas.

Ao amigo Marllon Martins, companheiro desde a iniciação científica, pela amizade, apoio e carinho.

À Stella Carvalho, pela amizade, apoio, conversas, incentivo e motivação.

À Socorro Santana (Socorrinho; Help), pela disponibilidade e gentileza em ajudar. Ela sempre encontra um jeitinho para tudo.

A Argemiro Martins por coletar e ceder as amostras, pela disponibilidade em ajudar e colaborar para a realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa ECO-SENSORES: atividades enzimáticas e micro-organismos do sistema solo-planta e, especialmente, a Julyana Braga que me ajudou no transporte das amostras com muita presteza e ao Dr. Diogo Paes pela paciência, contribuição nas análises estatísticas e disponibilidade em participar da banca

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

*“Mi voluntad y deseo, se quiebran ante Ti  
Mi voluntad y deseo, son para Ti”*

Pastora Maria Patricia de Rodríguez



## Abundância e estrutura genética e bioquímica das comunidades microbianas em solo arenoso cultivado com feijão e milho sob aplicação de biochars oriundos do café

### RESUMO

Neossolos Regolíticos encontrados no Nordeste do Brasil são solos pobres em nutrientes que, somado à instabilidade climática torna-se um entrave à produção de algumas culturas. Visando suprir tal demanda, pesquisas com biochar vem sendo realizadas no intuito de promover uma melhoria nos atributos desse tipo de solo. O biochar é um produto rico em carbono e produzido a partir da pirólise de resíduos orgânicos que servem como matéria-prima para obtenção do produto. A sua incorporação ao solo melhora os atributos físicos, químicos, microbianos e bioquímicos do solo. Muitos estudos evidenciam os incrementos da qualidade física e química do solo com o uso do biochar, porém ainda existem lacunas a respeito do efeito de diferentes tipos de biochar sobre a estrutura microbiana em Neossolos Regolíticos e é importante ser estudado para fornecer uma ferramenta mais rápida ao produtor. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças nas comunidades microbianas e abundância de genes em um Neossolo com aplicação de dois tipos de biochar produzidos a partir de resíduos de café sob cultivo de feijão e milho. Os biochars foram produzidos a partir da casca de café (CC) e borra de café (BC). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, distribuído em esquema fatorial  $2 \times 3 + 2$  sendo dois tipos de biochar (BC e CC), 3 doses (4, 8 e 16 t ha<sup>-1</sup>) e dois tratamentos adicionais (um com esterco e outro apenas solo). Todos os tratamentos receberam adubação orgânica (esterco bovino), exceto o controle absoluto. Foram realizados dois experimentos um com cada planta teste: o milho e o feijão que foram cultivadas até os 45 dias após a semeadura, quando então procedeu-se à coleta dos solos para avaliação de seus atributos químicos de rotina, biomassa microbiana (CBM, N<sub>mic</sub> e P<sub>mic</sub>), respiração basal (RBS), quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) e estrutura das comunidades de Bactérias, Fungos e diazotróficos por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) e os respectivos genes foram quantificados por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Após a adição de biochar aos solos, a maioria dos parâmetros químicos mostraram-se fortemente influenciados (aumentaram) por CC. O CBM aumentou com a adição das doses 4 t ha<sup>-1</sup> e 8 t ha<sup>-1</sup> de CC. O P<sub>mic</sub> reduziu com a adição de biochar em ambos experimentos. No experimento com milho, N<sub>mic</sub> acompanhou o comportamento de N total, não apresentando diferença estatística. Enquanto no experimento com feijão o N<sub>mic</sub> foi superior aos demais tratamentos com a adição de esterco. Em ambos experimentos, a RBS e qCO<sub>2</sub> aumentaram nos solos que receberam biochar. Entretanto, no experimento com feijão, o qCO<sub>2</sub> foi maior no solo controle. A estrutura das comunidades microbianas foi influenciada pela incorporação de biochar aos solos, apresentando comunidades distintas e bem diferenciadas de acordo com a dose e tipo de biochar. Em relação a abundância de genes, o biochar da BC exerceu influência apenas para diazotróficos e fungos totais no experimento com milho, enquanto os solos do experimento com feijão não foram influenciados. A incorporação dos biochars melhorou os atributos químicos do solo fornecendo a comunidade microbiana nutrientes como C, N e P.

Palavras-chave: Biocarvão. Biomassa Microbiana do Solo. Neossolo. 16S rRNA. 18S rRNA. *nifH*.



## **Abundance and genetic and biochemical structure of microbial communities in sandy soil cultivated with beans and corn under the application of biochars from coffee**

### **ABSTRACT**

Regolithic Neosols found in northeastern Brazil are nutrient-poor soils that, added to climatic instability, become an obstacle to the production of some crops. In order to meet this demand, biochar research has been carried out in order to promote an improvement in the attributes of this type of soil. Biochar is a product rich in carbon and produced from the pyrolysis of organic waste that serves as raw material to obtain the product. Its incorporation to the soil improves the physical, chemical, microbial and biochemical attributes of the soil. Many studies show the increase in soil physical and chemical quality with the use of biochar, but there are still gaps regarding the effect of different types of biochar on the microbial structure in Regolithic Neosols and it is important to be studied to provide a faster tool to the soil producer. The objective of this work was to evaluate the changes in microbial communities and abundance of genes in a Neosol with application of two types of biochar produced from coffee residues under bean and corn cultivation. Biochars were produced from the coffee husk (CC) and coffee grounds (BC). The experimental design was completely randomized, distributed in a 2 x 3 + 2 factorial scheme, two types of biochar (BC and CC), three doses (4, 8 and 16 t ha<sup>-1</sup>) and two additional treatments (one with manure and another only solo). All treatments received organic fertilization (bovine manure), except absolute control. Two experiments were carried out, one with each test plant: corn and beans that were cultivated up to 45 days after sowing, when the soils were collected to evaluate their routine chemical attributes, microbial biomass (CBM, N<sub>mic</sub> and P<sub>mic</sub>), basal respiration (RBS), metabolic quotient (qCO<sub>2</sub>) and structure of the Bacteria, Fungi and diazotrophic communities by Gel Electrophoresis with Denaturing Gradient (DGGE) and the respective genes were quantified by quantitative real-time PCR (qPCR). After addition of biochar to the soils, most of the chemical parameters were strongly influenced (increased) by CC. The MBC increased with the addition of 4 t ha<sup>-1</sup> and 8 t ha<sup>-1</sup> CC doses. P<sub>mic</sub> reduced with the addition of biochar in both experiments. In the corn experiment, N<sub>mic</sub> followed the behavior of total N, presenting no statistical difference. While in the experiment with beans the N<sub>mic</sub> was superior to the other treatments with the addition of manure. In both experiments, RBS and qCO<sub>2</sub> increased in the soils that received biochar. However, in the bean experiment, qCO<sub>2</sub> was higher in the control soil. The structure of the microbial communities was influenced by the incorporation of biochar to the soils, presenting distinct and well differentiated communities according to the dose and type of biochar. In relation to gene abundance, the biochar of BC exerted influence only for diazotrophs and total fungi in the corn experiment, while the soils of the bean experiment were not influenced. The incorporation of the biochars improved the soil chemical attributes by providing the microbial community with nutrients such as C, N and P.

Keywords: Biocarbon. Soil Microbial Biomass. Neosol. 16S rRNA. 18S rRNA. *nifH*.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de localização e imagens da área de floresta tropical seca onde foi coletado o Neossolo Regolítico eutrófico típico para os experimentos .....	38
<b>Figura 2.</b> Resíduos de casca de café (A), obtida no IPA de Brejão, e de borra de café, obtida numa cafeteria de Garanhuns-PE .....	39
<b>Figura 3.</b> Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de bactérias totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058).....	60
<b>Figura 4.</b> Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de fungos totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058) .....	60
<b>Figura 5.</b> Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de fixadora de nitrogênio, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058).61	
<b>Figura 6.</b> Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades bacterianas e as características bioquímicas de solos cultivados com milho (variedade comercial 1058) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ ).....	63
<b>Figura 7.</b> Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades fúngicas e as características bioquímicas de solos cultivados com milho (variedade comercial 1058) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ ).....	64
<b>Figura 8.</b> Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades de diazotróficos e as características bioquímicas de solos cultivados com milho (variedade comercial 1058) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ ).....	65

<b>Figura 9.</b> Análise de heatmap mostrando correlações entre as variáveis analisadas nos solos cultivados com milho (variedade comercial 1058). Os polígonos com asteriscos (*) e traços (-) evidenciam, respectivamente, as correlações positivas e negativas significativas ( $\rho < 0.05$ ) com módulos maiores do que 0.7, de acordo com a estatística baseada no coeficiente de correlação produto-momento de Pearson (r) seguindo a distribuição t.....	66
<b>Figura 10.</b> Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de bactérias totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo).....	73
<b>Figura 11.</b> Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de Fungos totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo).....	74
<b>Figura 12.</b> Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de diazotróficos, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo).....	74
<b>Figura 13</b> Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades bacterianas e as características bioquímicas de solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo) submetidos a diferentes dosagen de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ ).....	76
<b>Figura 14.</b> Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades fúngicas (B) e as características bioquímicas de solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo) submetidos a diferentes dosagen de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ ).....	77
<b>Figura 15.</b> Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades diazotróficas e as características bioquímicas de solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo) submetidos a diferentes dosagen de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ ).....	78
<b>Figura 16.</b> Análise de heatmap mostrando correlações entre as variáveis analisadas nos solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo). Os polígonos com asteriscos (*) e traços (-)	

evidenciam, respectivamente, as correlações positivas e negativas significativas ( $\rho < 0.05$ ) com módulos maiores do que 0.7, de acordo com a estatística baseada no coeficiente de correlação produto-momento de Pearson (r) seguindo a distribuição t..... 79



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características físico-químicas dos biochars e do solo utilizados nos experimentos .....	40
<b>Tabela 2.</b> Primers e condições de ciclagem utilizados para amplificar os genes alvo qPCR..	47
<b>Tabela 3.</b> Primers e condições de ciclagem para PCR-DGGE .....	49
<b>Tabela 4.</b> Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058) .....	53
<b>Tabela 4.</b> Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058) .....	54
<b>Tabela 5.</b> Carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa microbiana (CBM, $N_{mic}$ , $P_{mic}$ ), respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058) .....	56
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância da abundância de genes em solo cultivado com plântulas de milho (variedade comercial 1058).....	58
<b>Tabela 7.</b> Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo).....	68
<b>Tabela 7.</b> Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo).....	69
<b>Tabela 8.</b> Carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa microbiana (CBM, $N_{mic}$ , $P_{mic}$ ), respiração basal do solo, (RBS) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo).....	70
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância da abundância de genes em solo cultivado com plântulas de feijão (variedade BRS estilo).....	71



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	25
1.1 Hipóteses.....	26
1.2 Objetivo Geral.....	26
1.3 Objetivos Específicos .....	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	27
2.1 Aproveitamento de resíduos agrícolas e industriais para produção de biochar .....	27
2.2 Biochar e os atributos físicos e químicos.....	29
2.3 Biochar e os atributos biológicos .....	30
2.4 Importância da biomassa microbiana e respiração basal do solo .....	31
2.5 Fixação biológica de nitrogênio.....	32
2.6 Técnicas moleculares no estudo das comunidades microbianas .....	33
2.7 Neossolos Regolíticos.....	34
2.8 A cultura do milho .....	35
2.9 A cultura do feijão .....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Área de estudo e amostragem de solo e esterco.....	38
3.2 Obtenção dos biochars .....	39
3.3 Caracterização do solo e biochars antes do experimento.....	39
3.4 Implantação do experimento em casa de vegetação e delineamento experimental .....	40
3.5 Análises químicas dos solos após coleta dos experimentos.....	41
3.6 Análises microbiológicas .....	41
3.7 Extração do DNA total do solo.....	46
3.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) .....	46
3.9 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE).....	47
3.10 Análise estatística e interpretação dos resultados .....	49
4. RESULTADOS .....	51

4.1	Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos químicos de um Neossolo Regolítico cultivado com milho.....	51
4.2	Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos microbianos de um Neossolo Regolítico cultivado com milho.....	54
4.3	Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre a abundância de bactérias totais, diazotróficas e fungos totais de um Neossolo Regolítico cultivado com milho .....	57
4.4	Distribuição dos tratamentos levando em consideração a estrutura das comunidades microbianas em solos cultivados com milho sob aplicação de doses crescentes de biochar	58
4.5	Análise canônica de coordenadas principais (CAP), HeatMap, correlação entre os atributos químicos do solo e as comunidades microbianas em solos tratados com biochar de café sob cultivo de milho .....	61
4.6	Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos químicos de um Neossolo Regolítico cultivado com feijão .....	66
4.7	Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos microbianos de um Neossolo Regolítico cultivado com feijão .....	69
4.8	Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre a abundância de bactérias totais, diazotróficas e fungos totais de um Neossolo Regolítico cultivado com feijão.....	71
4.9	Distribuição dos tratamentos levando em consideração a estrutura das comunidades microbianas em solos cultivados com feijão sob aplicação de doses crescentes de biochar	72
4.10	Análise canônica de coordenadas principais (CAP), HeatMap, correlação entre os atributos químicos do solo e as comunidades microbianas em solos tratados com biochar de café sob cultivo de feijão.....	75
5.	DISCUSSÃO .....	80
5.1	Influência do biochar nos atributos químicos do solo .....	80
5.2	Efeitos da aplicação de biochar ao solo na biomassa microbiana .....	81
5.3	Impacto do biochar na estrutura e abundância das comunidades microbianas do solo..	83
6.	CONCLUSÕES .....	86
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87



<b>APÊNDICE A</b> - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 16S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com milho (variedade comercial 1058) .....	104
<b>APÊNDICE B</b> - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 18S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com milho (variedade comercial 1058) .....	105
<b>APÊNDICE C</b> - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene nifH (Micro-organismos diazotróficos) em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com milho (variedade comercial 1058).....	106
<b>APÊNDICE D</b> - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 16S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com feijão (variedade BRS estilo).....	107
<b>APÊNDICE E</b> - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 18S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com feijão (variedade BRS estilo).....	108
<b>APÊNDICE F</b> - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene nifH (Micro-organismos diazotróficos) em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com feijão (variedade BRS estilo) .....	109



## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento desenfreado da população mundial tem acarretado em consequências severas no setor agrícola. O aumento da demanda por alimentos no mundo todo tem refletido no uso das terras agriculturáveis e no aumento da produtividade. O uso inadequado e exagerado do solo tem aumentado cada vez mais o volume de terras degradadas, consideradas assim, inapropriadas para o plantio. A baixa fertilidade dos solos brasileiros, principalmente nas regiões semiáridas, tem sido alvo de muitos estudos com a finalidade de melhorar e aumentar o potencial de uso dessas terras. Nessas regiões, os produtores rurais destacam-se pelas práticas de agricultura sustentável. Entretanto, devido à escassez de recursos e falta de informação para o manejo adequado do solo, eles conseguem apenas produzir alimento para o próprio sustento através da prática da agricultura de subsistência.

A utilização de fertilizantes minerais para garantir a produtividade e melhorar a fertilidade do solo tem sido um problema para os mananciais. Além de encarecer, a produção e aplicação desses recursos não renováveis nos solos, estão contaminando rios, nascentes e lagos, através dos processos de perda por lixiviação e consequente eutrofização. O biochar, produto rico em carbono, produzido a partir do processo de pirólise, pode ser considerado um condicionador do solo e tem sido utilizado em diversos trabalhos como alternativa para reduzir o uso de fertilizantes minerais. Como matéria-prima para produção do biochar, podem ser utilizados resíduos de colheita e da agropecuária (palha, sabugo, madeira, esterco etc).

Os benefícios da incorporação de biochar ao solo são muitos, mas entre eles podem ser citados aumento da CTC do solo, com consequente maior liberação de nutrientes para as plantas. Devido a presença de carbonatos, o biochar apresenta pH elevado, podendo assim, ser utilizado como corretivo em solos ácidos. Outras características importantes do biochar, também assim chamado, são sua porosidade e elevada área de superfície específica de modo que apresenta alta capacidade de retenção de água e nutrientes.

Os poros do biochar servem de habitat para os micro-organismos presentes no solo que encontram refúgio contra seus predadores. As modificações que o biochar provoca nos atributos químicos e físicos do solo, principalmente, mudanças no pH, retenção de água e nutrientes beneficiam a comunidade microbiana aumentando sua atividade nos solos modificados com biochar. Os micro-organismos participam ativamente dos ciclos biogeoquímicos e, através da adição de biochar ao solo como fonte também de matéria orgânica, esses processos são acelerados disponibilizando maiores quantidades de nutrientes para as plantas.

Os micro-organismos são responsáveis por realizar inúmeros e complexos processos no solo, e a maioria deles não são cultiváveis. Para acessar esses micro-organismos de maneira mais rápida e eficiente, as técnicas moleculares têm sido utilizadas como ferramentas de estudo das comunidades microbianas afim de facilitar o entendimento dos processos que ocorrem no solo, relacionados a ciclagem de nutrientes e como Bactérias, Archaeas e Fungos atuam nesses processos.

### **1.1 Hipóteses**

- A aplicação de biochar, proveniente de resíduos de café, em um Neossolo Regolítico cultivado com milho e feijão estrutura a comunidade de bactérias totais, diazotróficos e fungos totais;
- O biochar aumenta a abundância de genes funcionais e influencia os teores de C, N e P microbiano em um Neossolo Regolítico sob cultivo de milho e feijão.

### **1.2 Objetivo Geral**

Avaliar as mudanças nas comunidades de bactérias totais, diazotróficos e fungos totais em um Neossolo Regolítico com aplicação de biochar de café sob cultivo de feijão e milho.

### **1.3 Objetivos Específicos**

- Determinar o efeito do biochar sobre a abundância das comunidades de fungos totais, bactérias totais e micro-organismos diazotróficos, através da PCR quantitativa em tempo real;
- Avaliar a estrutura das comunidades de fungos totais, bactérias totais e micro-organismos diazotróficos por meio da técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante;
- Avaliar o efeito do biochar e suas doses sobre o carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa microbiana; a respiração basal do solo e o quociente metabólico;
- Relacionar as características dos atributos químicos dos solos e do biochar com os atributos microbianos visando fornecer ferramentas mais sensíveis às mudanças pelo uso do biochar em solo arenoso proveniente de condições de área tropical seca.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aproveitamento de resíduos agrícolas e industriais para produção de biochar

O biochar é um produto rico em carbono, de granulometria fina e altamente poroso, sendo capaz de aumentar a retenção de água, nutrientes e atividade microbiana melhorando a qualidade do solo (LI et al., 2017). É produzido a partir da decomposição térmica (pirólise) da biomassa proveniente de resíduos orgânicos em condições limitadas de oxigênio numa ampla faixa de temperatura que pode variar entre 300°C e 900°C. O rendimento do produto final vai depender do tipo de resíduo utilizado e da pirólise (CHA et al., 2016).

As modificações causadas pelo biochar no solo dependem da temperatura da pirólise, do tipo de resíduo e do método utilizado para sua produção (SUN et al., 2014). O rendimento do produto está relacionado principalmente ao tipo de matéria-prima utilizada e a presença de compostos recalcitrantes, por exemplo lignina, na composição do resíduo aumentam o rendimento do biochar (AHMAD et al., 2014). A temperatura da pirólise deve ser considerada um dos fatores mais importantes na produção do biochar, uma vez que determina a maioria das propriedades que o biocarvão influencia no solo e controla a decomposição da matéria-prima utilizada para sua produção (ZHANG et al., 2019).

O crescimento populacional e o desenvolvimento industrial contribuíram para o aumento na produção de resíduos como o lodo de esgoto e resíduos agroindustriais (SINGH et al., 2011). Muitos destes resíduos são ricos em matéria orgânica e podem ser adicionados ao solo para melhorar suas características químicas (incorporando principalmente nitrogênio e fósforo) e reduzir os custos com fertilizantes minerais (MANTOVIA; BALDONI; TODERI, 2005). Além disso, melhora as características físicas do solo, aumentando a agregação, aeração e retenção de água (NASCIMENTO et al., 2004).

Assim, os resíduos orgânicos provenientes da agricultura e pecuária, tais como, palha de arroz, bambu, palha de milho, palha de trigo, madeira, esterco de aves, bovinos e suínos (CANTRELL et al., 2012; DOMENE et al., 2014; LEE et al., 2013; TAN et al., 2017; WU et al., 2012), plantas de tomate, entre outros recursos têm sido utilizados como matéria-prima para produção do biochar devido a facilidade de obtenção de acordo com cada região (LI et al., 2017; LLORACH-MASSANA et al., 2017).

Em contrapartida, alguns resíduos como o lodo de esgoto, por exemplo, apresentam altos teores de metais pesados (GOMES et al., 2007), além de conter micro-organismos

patogênicos (NASCIMENTO et al., 2014) o que pode comprometer o uso de tais resíduos na agricultura. A pirólise desses resíduos, transformando-os em biochar, pode eliminar os patógenos e reduzir os custos com transporte, sendo capaz de melhorar a estrutura e qualidade do solo, aumentar a produção agrícola e favorecer a comunidade microbiana (MÉNDEZ et al., 2012).

A escolha do resíduo para produção do biochar geralmente está baseada na disponibilidade na região, facilidade e valor de obtenção (SRINIVASAN et al., 2015). O café é um produto amplamente consumido no mundo todo, e o processamento dos grãos até a obtenção do produto final (a bebida) gera uma grande quantidade de resíduos que tem sido utilizado para a produção de biochar devido ao baixo custo e ampla disponibilidade (TSAI; LIU; HSIEH, 2012). Neste sentido, a produção agrícola é uma grande geradora de resíduos (casca de café, palha, dejetos de animais, pó de serra, lixo, madeira, etc) e a reutilização destes materiais pode trazer benefícios para o solo, tais como: aumento na quantidade de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, além de evitar problemas ambientais como contaminação do solo, aumento na emissão de gases do efeito estufa e eutrofização dos rios (DIAS et al., 2010).

A adição de biochar ao solo facilita a estabilidade de agregados em solos arenosos com presença de vegetação, melhora a absorção de água e liberação de nutrientes (OJEDA et al., 2015). Estudos têm demonstrado que a temperatura de pirólise do biochar influencia na sua porosidade, onde biochars produzidos em temperaturas mais altas apresentam maior volume de poros e área de superfície específica. Além disso, as altas temperaturas utilizadas na produção dos biochars facilitam a absorção de água a partir da redução da hidrofobicidade da superfície (SULIMAN et al., 2017).

Desta forma, a produção de biochar a partir de resíduos orgânicos pode ser considerada uma alternativa de manejo para o solo, melhorando suas propriedades físicas, químicas e biológicas (WU et al., 2013), pois a aplicação de biochar no solo está relacionada com o interesse em aumentar a capacidade de retenção de água e nutrientes, além da manutenção de carbono no solo (DUKU; GU; HAGAN, 2011). No trabalho realizado por Chintala et al. (2014), utilizando diferentes tipos de resíduos, a adição de biochar reduziu a mineralização de N e C e a atividade de algumas enzimas envolvidas no ciclo desses elementos. O aumento da temperatura de pirólise (>600 °C) reduz o rendimento do biochar, a capacidade de troca de cátions, a condutividade elétrica do solo e a solubilidade de sais e metais (MÉNDEZ; TERRADILLOS; GASCÓ, 2013).

## 2.2 Biochar e os atributos físicos e químicos

De acordo com Barrow et al. (2012), a aplicação de biochar em solos agriculturáveis se torna uma alternativa para a redução da degradação do solo. Isto porque o biochar apresenta propriedades que podem melhorar as características físicas do solo, tais como: aumento da porosidade total (poros grandes favorecem a aeração do solo além de servir como espaço para alojamento, crescimento e reprodução microbiana e poros pequenos melhoram a capacidade de adsorção do biochar), maior estabilidade dos agregados do solo, redução da densidade aparente, aumento da capacidade do solo de reter a água disponível para as plantas (PRANAGAL et al., 2017), melhoria da área superficial específica e da capacidade de absorção (TAN et al., 2015).

A produtividade das plantas tem sido assegurada através da utilização de excessivas quantidades de fertilizantes minerais solúveis. Entretanto, na maioria das vezes, o uso desses fertilizantes eleva o custo de produção, além de oferecer risco de contaminação ambiental (ROESCH et al., 2005). O nitrogênio e o fósforo são os elementos requeridos em maiores quantidades pelas plantas e conseqüentemente utilizados na adubação mineral para suprir a demanda dos solos agrícolas, mas grande parte desses fertilizantes aplicados, tem sido direcionado a mananciais ocasionando problemas como eutrofização (HUANG et al., 2017). O biochar é um produto rico em carbono, podendo apresentar em sua composição mais de 50% de C (TAN et al., 2017). A manutenção desse carbono no solo na forma orgânica ajuda não apenas na manutenção da fertilidade, como também reduz as mudanças climáticas (LEHMANN; GAUNT; RONDON, 2006).

O biocarvão tem sido utilizado como um condicionador do solo pois é rico em nutrientes como nitrogênio, potássio e fósforo, sendo eficaz em aumentar a produtividade sustentável através do reaproveitamento e queima de resíduos orgânicos (HUNG et al., 2017). Para reduzir a utilização de fertilizantes minerais, o biochar tem sido recomendado devido a sua alta porosidade e conseqüente capacidade de reter nutrientes (HE; ZHONG; YANG, 2017). O biochar é uma fonte rica em P, N e carbono orgânico, além de favorecer a troca catiônica e a atividade microbiana que regula a ciclagem de nutrientes (WANG et al., 2017).

De modo geral, os biochars apresentam pH alcalino podendo ser utilizado como corretivo para reduzir o pH de solos ácidos (SANDHU et al., 2017). A condutividade elétrica e o pH do biochar são influenciados pela temperatura da pirólise, pois a medida que a temperatura aumenta, ocorre também um aumento na concentração de sais solúveis (NARZARI et al., 2017). Uma vez incorporado ao solo, o biochar melhora a aeração e conseqüentemente reduz a densidade do solo, aumenta a porosidade e infiltração de água (HERATH; CAMPS-

ARBESTAIN; HEDLEY, 2013; LIU et al., 2016). Aumenta o pH do solo e a capacidade de troca de cátions (CTC), fertilidade do solo e melhora o desenvolvimento das plantas (DEENIK; COONEY et al., 2016; LIMA; TAMIOZZO; PALOMINO, 2015). Além disso, o biochar proporciona aumento da atividade microbiana e maior disponibilidade de habitats para interação dos micro-organismos devido a porosidade do produto (PURAKAYASTHA; KUMARI; PATHAK, 2015).

O biochar pode ainda ser aplicado ao solo com o objetivo de reter contaminantes e substâncias consideradas tóxicas, tais como: corantes (LEE; KIM; KWON, 2017; YAO et al., 2014), pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (KHORRAM et al., 2017; OLESZCZUK et al., 2014) e metais pesados (CHEN et al., 2011; PARK et al., 2016).

### **2.3 Biochar e os atributos biológicos**

A estrutura e funções das comunidades microbianas podem ser alteradas a partir de mudanças nas propriedades físicas e químicas do solo, assim, a incorporação do biochar também pode alterar e/ou modificar a dinâmica e predominância dos micro-organismos neste ambiente (ANDERSON et al., 2011). Os microporos do biochar são utilizados como micro-habitat pelos micro-organismos que se protegem contra a ação de predadores (TAN et al., 2015). Essa estrutura é capaz de reter principalmente água e nutrientes, além de outros elementos, tornando o produto um habitat favorável para o desenvolvimento e reprodução de diferentes grupos de micro-organismos (THIES; RILLIG, 2009).

A matéria orgânica do solo (MOS) é considerada uma importante fonte de nutrientes para o solo (TAN et al., 2015). A adição de biochar aumenta a quantidade de matéria orgânica (SMEBYE et al., 2016) e a comunidade de micro-organismos, os quais são responsáveis por atuar nos processos de decomposição e mineralização, ciclagem de nutrientes e estabilização do carbono (YANARDAĞ et al., 2017).

Os micro-organismos são responsáveis por realizar importantes processos no solo, e por isso, podem ser considerados indicadores muito sensíveis da qualidade (GEISSELER; LINQUIST; LAZICKI, 2017). A incorporação desse biocarvão ao solo melhora suas características biológicas e conseqüentemente aumenta a atividade microbiana e enzimática (DEMISIE; LIUA; ZHANG, 2014). Os manejos utilizados nas culturas, assim como os fertilizantes e as doses aplicadas, podem alterar as comunidades microbianas (GEISSELER; SCOW, 2014). Cole et al. (2018) sugeriram que a adição de biochar aumenta a diversidade de



micro-organismos presentes no solo e pode favorecer mudanças nas comunidades envolvidas no ciclo do nitrogênio.

## **2.4 Importância da biomassa microbiana e respiração basal do solo**

A adição de resíduos ricos em matéria orgânica no solo tem sido uma prática muito utilizada no mundo todo, devido a produção em larga escala e quantidade de nutrientes incorporados ao solo através desses resíduos (LLORET et al., 2016; MONDAL et al., 2015). A biomassa microbiana é responsável por mediar inúmeros processos que ocorrem no solo, incluindo principalmente a mineralização da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e agregação. Entretanto, esses micro-organismos são muito sensíveis a mudanças ambientais e por isso podem também ser considerados como indicadores da qualidade do solo (KUZUYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015).

As bactérias e fungos encontrados no solo naturalmente desempenham papéis cruciais que tem contribuído para o avanço e desenvolvimento de sistemas agriculturáveis, tais como: fixação biológica de nitrogênio, aumento na disponibilidade e absorção de nutrientes, produção de proteínas, sideróforos, exsudados e ácidos orgânicos. Além disso, como efeitos secundários, esses micro-organismos podem promover crescimento das plantas, aumentar a tolerância ao estresse salino e hídrico (RASHID et al., 2016).

De acordo com Banerjee et al. (2016), a qualidade do resíduo aplicado ao solo implica na determinação da taxa de imobilização/mineralização. O solo é considerado o maior reservatório terrestre de carbono podendo ser fonte/dreno desse elemento. Desta forma, a maior parte do carbono, nitrogênio e fósforo que compõe a matéria orgânica do solo são provenientes da atividade microbiana.

A incorporação de biochar ao solo aumenta a atividade microbiana e conseqüentemente o carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa (SINGH et al., 2018). Segundo Zhou et al. (2017) a adição de biochar produzido a partir de diferentes resíduos aumenta a respiração basal do solo, mas o quociente metabólico diminuiu independentemente do tipo de matéria-prima utilizada, o que pode ser justificado pelas propriedades dos solos utilizados nos experimentos. Alguns trabalhos têm demonstrado o papel da biomassa microbiana na decomposição da serapilheira e agregação do solo (HELFRICH et al., 2015), influência do preparo do solo na respiração basal e biomassa microbiana (DADALTO et al., 2015), importância da atividade microbiana para a fisiologia vegetal (ORTIZ et al., 2015) e utilização da biomassa microbiana como indicadora da qualidade do solo (VIEIRA et al., 2016).

## 2.5 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um importante constituinte de moléculas orgânicas como bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, proteínas, clorofila e aminoácidos (LI et al., 2015), sendo considerado um elemento essencial para os organismos vivos (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018). A maior parte do nitrogênio existente no planeta não está prontamente disponível para as plantas. Assim, é necessário a quebrar da tripla ligação do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) para torná-lo assimilável. A fixação industrial para produção de fertilizantes tem alto gasto de energia, temperatura e pressão para quebrar a tripla ligação do N<sub>2</sub> (CHERKASOV; IBHADON; FITZPATRICK, 2015). Além disso, o elevado custo de produção dos fertilizantes minerais e as doses aplicadas em grandes quantidades para suprir a necessidade nutricional das culturas pode elevar o custo de produção e causar contaminação de lagos e rios por lixiviação, dando origem ao processo de eutrofização (WANG et al., 2019).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), consiste na redução do N atmosférico (N<sub>2</sub>) a amônia (NH<sub>3</sub>) (forma de nitrogênio assimilável pelas plantas), através da enzima nitrogenase responsável por catalisar a reação. Esse processo é mediado por micro-organismos denominados diazotróficos (possuem a enzima nitrogenase) (KEUTER; VELDKAMP; CORRE, 2014). A FBN torna-se, portanto, uma alternativa sustentável para os ecossistemas evitando perdas do N por volatilização, lixiviação ou desnitrificação (CASTALDELLI et al., 2019; WU et al., 2018) e aumentando a produtividade das culturas (ZAGO et al., 2018).

A família das leguminosas tem se destacado no processo de associação simbiótica com bactérias pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, pelo grande sucesso na formação de nódulos (ROUSK; SORENSEN; MICHELSEN, 2016; ZIMMER et al., 2016). Essa associação pode ser altamente específica como é o caso da utilização de estirpes recomendadas para determinadas culturas ou promíscua, no caso de culturas que não são tão exigentes como, por exemplo, o feijão que tem grande facilidade de nodular utilizando-se da população de organismos nativos do solo no qual a cultura foi introduzida (FREITAS et al., 2015; YOSEPH; SHANKO, 2017). A associação entre leguminosas e bactérias fixadoras melhora a qualidade do solo e estimula o crescimento vegetal (MARCHETTI; BARP, 2015).

Em gramíneas, a FBN ocorre de forma associativa, onde bactérias rizosféricas e endofíticas colonizam o caule, as raízes, folhas ou o colmo das plantas (ROLEY et al., 2019). Os gêneros mais estudados são: *Azospirillum* e *Pseudomonas* (em arroz), *Azoarcus* (em capim-arroz), *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* (em cana-de-açúcar), *Klebsiella* (em trigo) (PANKIEVICZ et al., 2015; ZHANG et al. 2018). Além da FBN, a maioria desses micro-

organismos contribuem para o crescimento das plantas a partir da produção de sideróforos, fitohormônios e protegendo-as contra o ataque de patógenos através do mecanismo de antibiose (POLESE et al., 2017).

A aplicação de resíduos orgânicos carbonizados (biochar) ao solo podem aumentar a nodulação das raízes, a FBN e conseqüentemente o desenvolvimento das plantas (SCHEIFELE et al., 2017). Em um experimento consorciado leguminosa-gramínea (feijão-trigo), Azeem et al. (2019) demonstraram um aumento na produção de grãos, na FBN e redução na densidade do solo e emissão de CO<sub>2</sub>. Embora a aplicação de biochar ao solo contribua para o aumento da FBN, dentre outros benefícios, com o passar do tempo as propriedades do produto podem ser afetadas perdendo ou reduzindo sua eficiência (MIA; DIJKSTRA; SINGH, 2018).

## **2.6 Técnicas moleculares no estudo das comunidades microbianas**

A utilização de técnicas moleculares, a partir da extração de DNA ou RNA, na avaliação da biota do solo tem sido utilizada para melhor entender a complexidade da comunidade microbiana, afim de identificar micro-organismos específicos e os genes neles compreendidos (van ELSAS; BOERSMA, 2011). Existe a necessidade de utilizar técnicas independentes de cultivo, uma vez que grande parte dos micro-organismos presente no solo não crescem em meio de cultivo e a diversidade (genética e estrutural) de organismos aumenta de acordo com área de amostragem (HIRSCH; MAUHLIN; CLARK, 2010). Além disso, as técnicas dependentes de cultivo são mais trabalhosas e demandam mais tempo, uma vez que necessitam de determinado tempo de incubação, para posteriormente quantificar os micro-organismos (BRESSAN et al., 2015).

Os avanços na biologia molecular permitiram a obtenção de resultados mais específicos em relação aos diferentes domínios (Archaea, Bacteria e Eukarya), redução no tempo das reações e na probabilidade de erros. A partir das análises moleculares é possível identificar e entender as classificações taxonômicas e filogenéticas existentes entre esses micro-organismos, as funções que exercem no solo e as possíveis interações (DAS et al., 2014). O 16S rRNA é um gene estrutural presente em todos os procariotos, que apresenta regiões bem conservadas e tem sido muito utilizado como alvo no estudo desses micro-organismos (PATWARDHAN; RAY; ROY, 2014; VĚTROVSKY; BALDRIAN, 2013).

A partir da extração do DNA metagenômico do solo é possível acessar também o gene 18S rRNA utilizado como alvo no estudo de fungos totais presentes no solo (SANTOS et al., 2017). Estes estudos são possíveis a partir da amplificação por Reação em Cadeia da

Polimerase-PCR e PCR quantitativo em tempo real-qPCR de um fragmento do gene utilizando iniciadores específicos e permitem a quantificação (qPCR) do número de cópias existente de cada gene (SILVA; VIDAL-TORRADO; LAMBAIS, 2015; ZILLI et al., 2003).

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante-DGGE é uma técnica utilizada para avaliar a diversidade estrutural das comunidades microbianas e possíveis perturbações no ambiente que se refletem na comunidade (SOUZA et al., 2012). A DGGE tem como princípio a separação de fragmentos, de acordo com a quantidade de guanina e citosina, a partir de um gradiente desnaturante. Para isso, são utilizados genes alvo obtidos a partir da extração de DNA e amplificação por PCR (MAHYARUDIN; RUSMANA; LESTARI, 2015). Meier et al. (2017) utilizaram a técnica de DGGE para demonstrar que o tipo de biochar e as doses aplicadas no solo podem contribuir para mudanças na estrutura das comunidades de fungos e bactérias do solo.

Os genes funcionais podem ser utilizados como marcadores para facilitar o processo de caracterização de alguns grupos em relação a ecologia microbiana e diversidade, como por exemplo, o gene *nifH*, responsável por codificar a enzima nitrogenase, utilizado para a avaliação de micro-organismos diazotróficos. Alguns estudos têm demonstrado que a adição de biochar ao solo em diferentes doses pode aumentar a população de fungos, bactérias e micro-organismos que participam do ciclo do nitrogênio (HARTER et al., 2014; MITCHELL ET AL., 2015). De acordo com Harter et al. (2016) a incorporação de biochar ao solo aumenta o número de cópias e diversidade do gene que codifica para a subunidade catalítica de N<sub>2</sub>O redutase (*nosZ*).

## **2.7 Neossolos Regolíticos**

Os Neossolos são considerados solos pouco desenvolvidos e apresentam características mineralógicas que se aproximam de seu respectivo material de origem. Os Neossolos Regolíticos são de textura média a arenosa, apresentando como limitações no setor agrícola a baixa capacidade de retenção de água, nutrientes e consequentemente baixa fertilidade (ARAÚJO FILHO, 2011). Dentre os tipos de Neossolos, os Regolíticos têm maior representatividade no Brasil, correspondendo a cerca de 54% do território nacional e aproximadamente 27% da área do estado de Pernambuco, sendo encontrados em áreas destinadas a produção agrícola, principalmente agricultura de subsistência (CARMO; VAL, 2013; SANTOS et al., 2012).

Apesar destes impedimentos, é possível manejar estes solos para um aumento de produtividade. Lima et al. (2013) em seu estudo verificaram que após a adição de vinhaça em Neossolos Regolíticos, os teores de  $K^+$  e  $Na^+$  no solo aumentaram, enquanto o pH e CE mostraram-se pouco influenciados pela adição do resíduo. Os autores também verificaram que a vinhaça contribuiu para o aumento na lixiviação de potássio que pode contribuir para a sodicidade do solo. Em solos arenosos cultivados com alface, a utilização de micro-organismos promotores de crescimento como inoculantes promove aumento da biomassa microbiana e das atividades enzimáticas no solo, e aumenta também a produtividade da cultura em questão (MORAES et al., 2018). O crescimento e a produtividade das plantas de morango cultivadas em um Neossolo Regolítico adubado com NPK aumentaram (MEDEIROS et al., 2015).

Em regiões semiáridas os solos apresentam baixo teor de matéria orgânica que diminuem cada vez mais com o uso da terra. Desta forma, a incorporação de resíduos provenientes da agropecuária (esterco) tem sido uma técnica utilizada para aumentar o conteúdo de matéria orgânica e nutrientes nos solos. Entretanto, a quantidade de resíduos não é suficiente para suprir a demanda de nutrientes do solo (MENEZES E SILVA, 2008). Assim, a incorporação de biochar ao solo pode ser uma alternativa para aumentar a retenção de água, nutrientes e melhorar a fertilidade do solo, devido a estrutura porosa do produto e incremento no conteúdo de carbono (LIMA et al., 2018).

## **2.8 A cultura do milho**

O milho é uma planta de origem americana, *Zea mays* L., e é consumido mundialmente para diversos fins. Mais da metade (cerca de 75%) da produção de milho é destinada para alimentação humana, sendo considerado o segundo cereal mais consumido e somente 25% é processado transformando-se em derivados (ALVES et al., 2015). O milho é uma fonte rica em amido (68%), proteínas (7,8%) e minerais, como: K, Fe e Mn (ZHENG et al., 2016). O Brasil é considerado um dos maiores produtores e exportadores de milho do mundo, chegando a produzir aproximadamente 80 milhões de toneladas de grãos por ano (SILVA et al., 2017).

A cultura é considerada líder na produção de grãos no mundo todo e após a colheita toda a matéria-prima é aproveitada. Por ser rico em proteínas e óleos vegetais é muito empregado na alimentação humana, forragem para o gado e produção de biodiesel (PETROVIC et al., 2016). O consumo de grãos tem sido recomendado por especialistas para melhorar o sistema digestivo devido à alta quantidade de fibras, ação anti-inflamatória e antioxidante (LUZARDO-OCAMPO et al., 2017). O milho apresenta grande importância no âmbito da agricultura

familiar, contribuindo para que as famílias produzam seu próprio alimento de consumo e fortalecendo o cultivo de subsistência (COSTA et al., 2012).

A incorporação de biochar nos solos cultivados com milho é eficiente na absorção de nutrientes, aumento da produtividade (UZOMA et al., 2011), melhora das características químicas e físicas do solo (CORNELISSEN et al., 2013). De acordo com Gonzaga et al. (2018), a taxa de aplicação do biochar em diferentes doses produzido a partir de resíduos orgânicos (cascas de coco, bagaço de laranja e poda de pinheiro) apresentou diferença significativa no cultivo do milho e melhorou a disponibilidade de nitrogênio e fósforo para as plantas. Além de melhorar as características químicas e físicas do solo, o uso de biochar associado com fertilizantes orgânicos aumenta a produtividade da cultura, a absorção de fósforo e reduz os custos com fertilizantes químicos (ARIF et al., 2017; LIMA et al., 2018).

## **2.9 A cultura do feijão**

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma espécie amplamente consumida nas Américas do Sul e Central, sendo, originária do México e ao longo do tempo expandiu-se para a América do Sul dividindo-se entre as regiões: Mesoamérica e dos Andes (BAGINSKY et al., 2015; BITOCCHI et al., 2012). A leguminosa pertence à família Fabaceae (ou família Leguminosae) (EVANGELHO et al., 2017), apresenta em sua composição altos teores de fibra, proteínas e amido e faz parte da alimentação básica de grande parte das populações de baixa renda do mundo todo (DEMIATE et al., 2016). O fato de fornecer elementos essenciais (vitaminas, minerais e ácidos graxos insaturados) para a nutrição humana, torna o feijão um alimento fundamental na alimentação dos países de renda baixa e média (BENEVIDES et al., 2013; YAO et al., 2016).

O Brasil é considerado o maior produtor e consumidor de feijão no mundo (HEINEMANN et al., 2016), sendo o consumo diário estimado em aproximadamente 183g por pessoa (BRIGIDE et al., 2014). O feijão é plantado na estação chuvosa (HEINEMANN et al., 2017), mas, embora seja bastante consumido pela população brasileira, a baixa produtividade pode ser explicada pela baixa fertilidade dos solos e adubação mineral inadequada (LOPES et al., 2016).

Em solos cultivados com feijão, estudos demonstram que a aplicação de biochar é capaz de reduzir a disponibilidade dos metais pesados no solo e nas plantas, devido a porosidade do produto e capacidade de reter compostos tóxicos respectivamente (PUGA et al., 2015). Os solos tratados com biochar podem reduzir a toxidez por alumínio e aumentar a absorção de fósforo

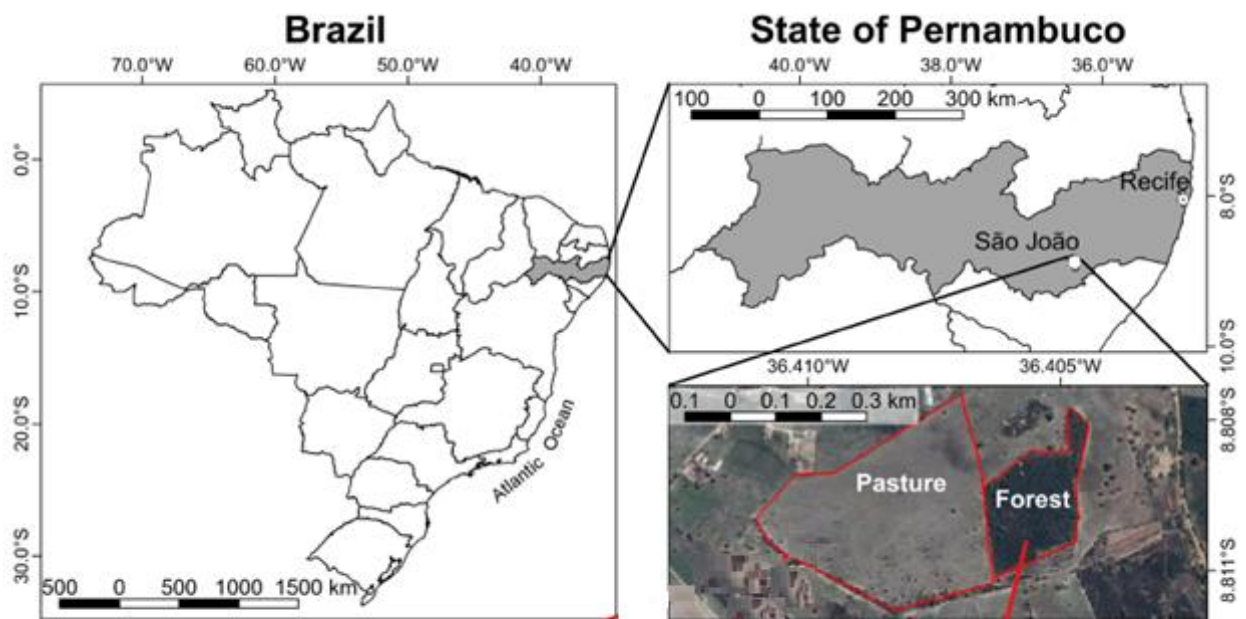
no cultivo do feijão (ZWIETEN et al., 2015). Diferentes tipos de biochar têm sido utilizados no cultivo do feijão, para aumentar o rendimento da cultura, produção de biomassa, proteger a planta contra o estresse oxidativo e salino (SAXENA; RANA; PANDEY, 2013; FARHANGI-ABRIZ; TORABIAN, 2017). Além disso, por melhorar as características químicas, físicas e biológicas do solo, o biochar favorece também uma melhor disponibilidade de nutrientes que auxilia no desenvolvimento das plantas e fixação biológica de nitrogênio (RONDON et al., 2007).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo e amostragem de solo e esterco

O solo que foi utilizado nos dois experimentos foi coletado na profundidade de 0-20 cm em uma área de floresta tropical seca, não antropizada na mesorregião do Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, no município de São João (Latitude  $8^{\circ} 52' 30''$  S e Longitude  $36^{\circ} 22' 00''$  O, com 705 m de altitude) (Figura 1), classificado como Neossolo Regolítico eutrófico típico apresentando uma textura arenosa (SILVA et al., 2014) e caracterizado de acordo com a metodologia da EMBRAPA (2009) (Tabela 1).

O esterco bovino utilizado foi obtido da Clínica de Bovinos da UFRPE, localizada na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE) no município de Garanhuns, PE e, foi incorporado ao solo nos dois experimentos, em todos os tratamentos, com exceção do controle (solo de referência).



**Figura 1.** Mapa de localização e imagens da área de floresta tropical seca onde foi coletado o Neossolo Regolítico eutrófico típico para os experimentos



### 3.2 Obtenção dos biochars

Os biochars foram produzidos por meio de pirólise lenta, num forno térmico caseiro, o qual foi baseado num modelo utilizado pelos agricultores tailandeses (PRAKONGKEP et al., 2015). Os dois tipos de resíduos orgânicos utilizados na produção dos biochars são de alta disponibilidade na região e, deram origem ao biochar de casca de café (BC) e biochar de borra de café (BB). A borra de café foi cedida pelas cafeterias do município de Garanhuns-PE e antes de submetê-la a pirólise, o produto foi seco a fim de reduzir sua umidade. A casca de café foi cedida pela Estação Experimental do IPA, localizada no município de Brejão, e não necessitou de preparo prévio, podendo ser colocada diretamente no forno para queima. Lima et al. (2018) descreveu todo o processo de obtenção desses biochars.



**Figura 2.** Resíduos de casca de café (A), obtida no IPA de Brejão, e de borra de café, obtida numa cafeteria de Garanhuns-PE

### 3.3 Caracterização do solo e biochars antes do experimento

Para determinação dos atributos físicos e químicos do solo, as amostras foram secas ao ar, homogêneas e passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha. Os biochars e o solo foram caracterizados conforme a metodologia da EMBRAPA (2009), onde foram determinados os teores de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , P e o pH em água (1:5; 1:2,5). Foi necessária uma maior diluição para leitura do pH dos biochars porque o produto ficou muito concentrado (uma pasta) e reteve muita água.

O  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  foram extraídos por KCl a  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ; o  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , P, por Mehlich-1. O  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, o  $\text{K}^+$  e o  $\text{Na}^+$

foram determinados por fotometria de chama, o P por colorimetria e o  $\text{Al}^{3+}$  por titulação. O carbono orgânico total (COT) foi realizado segundo a metodologia de Yeomans e Bremner (1988). A partir dos resultados obtidos, foi calculada a soma de bases (SB) e a capacidade de troca catiônica (CTC) (Tabela 1).

Os teores de carbono (C) e nitrogênio (N) foram determinados via combustão em analisador elementar CHNS-O (Perkin Elmer PE-2400) a uma temperatura de 925 °C. A análise foi realizada a partir de 3 mg de solo. O padrão de acetonalamida foi utilizado apresentando os seguintes valores de referência: C = 71,09 %; H = 6,71 %; N = 10,36 % e o equipamento foi padronizado a cada vinte amostras.

Para a determinação da área de superfície específica (ASE) dos biochars foi utilizada a metodologia do azul de metileno via método colorimétrico, seguindo o protocolo descrito por Kahr e Madsen (1995). As análises foram realizadas na Central de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG) da UAG/UFRPE.

**Tabela 1.** Características físico-químicas dos biochars e do solo utilizados nos experimentos

	pH	P	Ca	Mg	K	Al	Na	SB	CTC	C	N	C/N	ASE
		mg kg <sup>-1</sup>	-----cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> -----			-----			-----%	-----		m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	
	1:5												
	1:2,5												
<b>CC</b>	10,31	470,65	0,14	0,12	22,17	0,00	0,06	22,49	22,54	67,11	2,05	32,7	244,0
<b>BC</b>	9,65	311,46	1,56	0,72	2,68	0,00	0,50	5,5	5,56	68,81	4,30	16,0	23,5
<b>Solo</b>	5,1	16,6	0,8	0,8	0,15	0,15	0,28	2,8	3,98	1,68	0,24	6,7	---

SB= Somas de bases, CTC = capacidade de troca de cátions, C= carbono, N= nitrogênio, C/N= relação carbono/nitrogênio e ASE= área superficial específica

### 3.4 Implantação do experimento em casa de vegetação e delineamento experimental

Os experimentos com milho e feijão foram conduzidos em vasos na casa-de-vegetação que está localizada na área experimental da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE) no município de Garanhuns-PE. As coordenadas geográficas são: 08° 53' 25" de latitude S e 36° 29' 34" de longitude O, com altitude média de 896 m. O clima predominante é o Mesotérmico Tropical de Altitude (Cs'a), de acordo com a

classificação climática de Köppen (MELO; ALMEIDA, 2013), temperatura e precipitação média anual foi de 20°C e 1.300 mm respectivamente.

Foram realizados dois experimentos, um com cada planta teste: milho e feijão. O delineamento experimental de cada experimento foi inteiramente casualizado, distribuído em esquema fatorial 2 x 3 + 2 sendo dois tipos de biochar (BC e CC), 3 doses (4, 8 e 16 t ha<sup>-1</sup>) e dois tratamentos adicionais (um com esterco e outro apenas solo). Todos os tratamentos receberam 3 x 10<sup>-5</sup> t ha<sup>-1</sup> de adubação orgânica (esterco bovino).

Para a incorporação dos biochars ao solo foram utilizados cadinho e pistilo para maceração do biochar e vasos de 5 kg, onde o solo foi dividido em duas partes iguais. Após adicionar metade do solo foi incorporada metade da respectiva dose de biochar e o restante misturado gradativamente junto ao solo.

Para o cultivo do milho (variedade comercial 1058) foram utilizadas quatro sementes por vaso e uma semana após a semeadura foi feito o desbaste deixando somente uma planta por vaso. A capacidade de campo foi controlada pela pesagem dos vasos e na irrigação foi utilizada água destilada a cada dois dias de acordo com o peso do vaso. Após 45 dias da semeadura, o solo foi coletado para as análises químicas e microbiológicas e uma parte foi armazenada em micro-tubos de 2 mL para as análises moleculares em freezer a -20 °C.

As sementes de feijão (variedade BRS estilo) foram distribuídas na proporção de quatro para cada vaso, e uma semana após a emergências das plântulas foi realizado o desbaste, deixando somente uma planta por vaso. A irrigação foi realizada a cada dois dias com água destilada de acordo com a capacidade de campo, por meio de pesagem, e após 45 dias da semeadura, o solo foi coletado da mesma forma que o experimento anterior.

### **3.5 Análises químicas dos solos após coleta dos experimentos**

As características de pH, e os teores de P, C, N, Mg, Ca, K, Al, H+Al e COT foram determinados após 45 dias pelos métodos utilizados nas análises de solo antes dos experimentos, como mencionado anteriormente.

### **3.6 Análises microbiológicas**

Os valores de carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa microbiana foram estimados pelo método de irradiação-extração (MENDONÇA; MATOS, 2017) que tem como princípio a lise celular através de energia eletromagnética para quantificação (por diferença entre as

amostras de solo irradiada e não irradiada) de C, N e P liberados pelos micro-organismos. Para todas as análises foi determinada a umidade das amostras, a partir de 10 g de solo pesado em placas de Petri e seco em estufa à 105 °C por 24 horas. O fator de correção (F) foi utilizado no ajuste das umidades dos solos.

Para a determinação do carbono da biomassa microbiana (C-BMS) e do nitrogênio da biomassa microbiana (N-BMS), o extrator utilizado foi o sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) 0,5 mol  $L^{-1}$ , 80 mL por amostra, com pH ajustado para 6,5-6,8. As amostras foram submetidas a agitação horizontal por 30 minutos. Em seguida as amostras foram deixadas em repouso por 1 hora e posteriormente o sobrenadante foi filtrado em papel quantitativo. Após filtrar as amostras, 10 mL do extrato foi adicionado em um erlenmeyer de 125 mL, seguido de 2 mL da solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 0,066 mol  $L^{-1}$  e 10 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). Após esfriar, foi adicionado 50 mL de água destilada e três gotas do indicador ferroin, procedendo-se a titulação do excesso de dicromato com uma solução de sulfato ferroso amoniacal 0,03 mol  $L^{-1}$ , onde as amostras passam da coloração amarelo para vermelho “tijolo”. Os valores do C-BMS foram calculados a partir da seguinte equação:

$$C_{I,NI} = \frac{(Vb - Vam)(molaridadedo\ sulfato\ ferroso)(3)(1000)(volume\ do\ extrator)}{(volume\ do\ extrato^*)(peso\ do\ solo)}$$

\*volume utilizado para a determinação do carbono (mL);

Vb = volume do branco (mL);

Vam = volume da amostra (mL);

3 = resultado da relação entre o número de mols de  $Cr_2O_7$  que reagem com  $Fe^{2+}$  (1/6), multiplicado pelo número de mols de  $Cr_2O_7$  que reagem com o  $C^0$  (3/2), multiplicado pelo peso equivalente do C (12);

1000 = fator de conversão de umidade.

$C_{mic} = (C_i - C_{\tilde{n}i}) / K_c = \mu g\ g^{-1}$  de C no solo

$C_i$  = amostra irradiada

$C_{\tilde{n}i}$  = amostra não irradiada

Sendo que  $K_c = 0,33$  para o método de irradiação extração de C-BMS.

O N-BMS foi determinado a partir do mesmo extrato utilizado para o C-BMS. O procedimento consistiu em: pipetar 20 mL do extrato em tubos de digestão de 100 mL, em seguida foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 30 % e 2 mL de ácido sulfúrico

(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após esfriar foi adicionado 0,7 g da mistura digestora (Sulfato de Sódio; Sulfato de cobre heptahidratado e selênio). As amostras foram levadas ao bloco digestor e a temperatura foi elevada paulatinamente até o volume abaixar e ser atingida a temperatura de 350 °C. Após clarear (verde claro) as amostras foram mantidas no bloco por 2 horas em temperatura controlada. Depois da digestão, foi adicionado 5 mL de água destilada em cada amostra e o tubo foi conectado ao destilador Kjeldahl e vagarosamente foi liberada a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 mols L<sup>-1</sup>. Um erlenmeyer com 5 mL da solução indicadora de ácido bórico (utilizado para aprisionar o nitrogênio evitando que ele seja perdido por volatilização) foi colocado no equipamento a fim de coletar 35-40 mL de destilado e em seguida procedeu-se a titulação com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,005 mol L<sup>-1</sup>. O ácido foi padronizado e sua concentração calculada a partir da seguinte fórmula:

$$H^+ (mol_c L^{-1}) = \frac{10 \times 0,050}{mL H^+}$$

O teor de N presente na biomassa microbiana foi calculado a partir da equação abaixo descrita:

$$Ni (mg \cdot L^{-1}) = \frac{(mL H^+ am - mL H^+ br) \times [H^+] \times 14}{Volume (L)}$$

Em que:

V<sub>am</sub> = volume de HCl gasto na titulação da amostra;

V<sub>br</sub> = volume de HCl gasto na titulação do branco;

[H<sup>+</sup>] = concentração real do ácido clorídrico

14 = peso equivalente do N

$$N_{I, \bar{N}I} (mg \cdot kg^{-1}) = \frac{N_I (vol. extrator (L)) \times 1000}{peso da amostra (g)}$$

Em que:

1000 = fator de conversão de umidade.

$$N_{mic} (mg \cdot kg^{-1}) = (N_I - N_{\bar{N}I}) / Kn$$

Em que:

$N_I$  = nitrogênio da amostra irradiada

$N_{\bar{N}I}$  = nitrogênio da amostra não irradiada

$K_n = 0,54$  para o método de irradiação-extração do N-BMS.

Na determinação do fósforo da biomassa microbiana (P-BMS) o extrator utilizado foi o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A quantidade de solo, volume do extrator, agitação e filtração seguiu o mesmo padrão utilizado na determinação do C-BMS e N-BMS. Após essas etapas foi pipetado 5 mL do extrato das amostras irradiadas e não irradiadas em copos descartáveis de 50 mL, adicionado 5,5 mL de água destilada e 2,0 mL do reagente de trabalho – RT. Decorridos 40 minutos de repouso das amostras (para formação da cor azul) foi realizada a leitura no colorímetro utilizando o comprimento de onda de 882 nm. Antes de proceder a leitura no colorímetro foi necessário o preparo de uma curva padrão para calibrar o equipamento com concentrações conhecidas de fósforo.

Para a determinação do fósforo recuperado (P-SPIKE) foi pesado 5 g de solo em tubos de centrífuga de 50 mL, adicionado 1 mL de solução padrão de fósforo  $25 \text{ mg L}^{-1}$  e 30 mL da solução de bicarbonato de sódio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . As amostras foram submetidas a agitação horizontal por 60 minutos, depois centrifugadas por 10 minutos a 3.000 RPM, filtradas em papel quantitativo lento e seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a determinação do P-BMS. Os teores de fósforo presente na biomassa microbiana foram calculados a partir das equações abaixo descritas:

$$P_{liq} = P_I - P_{\bar{N}I}$$

Em que:

$P_{liq}$  = P líquido

$P_I$  = teor de P na amostra irradiada

$P_{\bar{N}I}$  = teor de P na amostra não-irradiada

$$P_{mic} (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = \frac{P_{liq}}{K_p} \times \frac{100}{\%P_{rec}}$$

Em que:

$K_p = 0,40$  para o método de irradiação-extração do fósforo da biomassa microbiana.

$\%P_{rec}$  = percentual de P recuperado após agitação do solo de mL de solução  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de P.

$$\%P_{rec} = \frac{P_{ad} - P_{NI}}{5} \times 100$$

Em que:

$P_{ad}$  = 1 mL contendo 25 mg L<sup>-1</sup> de P, equivalente a 5 mg.kg<sup>-1</sup> P no solo.

A respiração basal do solo, tem como princípio medir a quantidade de C respirado pela microbiota do solo e baseia-se na captura de CO<sub>2</sub> emitido de uma amostra de solo, quando incubado em um ambiente fechado por determinado período de tempo. O solo foi pesado (75 g) em potes plásticos e umedecido com o auxílio de um borrifador contendo água destilada para ativação dos micro-organismos, em seguida foi adicionado um copo de 50 mL, em cada pote, contendo 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M para incubação em potes hermeticamente fechados. Decorridos 6 dias de incubação foi feita a leitura das amostras por titulação com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,25 M, após a adição da solução de cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) 0,05 M para precipitação do carbonato e 3 gotas da solução indicadora de fenolftaleína 1 % (MENDONÇA; MATOS, 2005). Foi necessário realizar a padronização do ácido conforme descrito acima na determinação de N-BMS. A taxa de CO<sub>2</sub> da respiração do solo foi calculada de acordo com a equação abaixo descrita:

$$\mu g CO_2 \cdot g \text{ solo}^{-1} \cdot dia^{-1} = \frac{(Vb - Vam) \times (conc. HCl) \times 22 \times 1000}{\text{peso do solo seco (g)} \times n^{\circ} \text{ de dias}}$$

Onde:

Vb = média dos volumes gastos na titulação dos brancos;

Vam = volume gasto na titulação das amostras;

Conc. HCl = 0,5 M;

22 = massa atômica do CO<sub>2</sub> (44) dividido pelo número de moles de CO<sub>2</sub> que reagem com NaOH (2);

1000 = fator de conversão de unidades;

Nº de dias = 6 (5-7 conforme período de incubação)

O quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>), foi obtido pela razão entre a respiração basal e o carbono da biomassa microbiana do solo.

### 3.7 Extração do DNA total do solo

O DNA foi extraído a partir de 0,5 g de solo utilizando o kit PureLink™ Microbiome DNA Purification (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). O solo foi adicionado em microtubos contendo granada finamente moída e as células foram lisadas por agitação horizontal a 4.000 rpm por 5 segundos. Após a lise celular, o DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. Para observar a integridade do DNA e quantificá-lo, uma alíquota de 4 µL foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1x (Tris, Ácido acético, EDTA) adicionado ao corante *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). O gel foi submetido a um campo eletroforético de 100 volts por 30 minutos. A imagem do gel foi capturada sob luz ultravioleta em um transluminador UV E-BOX VX2.

### 3.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A abundância de bactérias totais, fungos totais e diazotróficos foi quantificada por qPCR, utilizando como alvo os genes 16S rRNA, 18S rRNA e *nifH*, respectivamente. Os iniciadores e as condições das reações estão descritos na Tabela 2. Um controle negativo foi adicionado em todas as quantificações visando o monitoramento de contaminações.

As reações foram realizadas em duplicata, no volume final de 10 µL contendo 5 µL do kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), 1 µL de cada primer, 2 µL de H<sub>2</sub>O livre de nucleases e 1 µL de DNA, usando o equipamento Light Cycler 480 (Roche Applied Science). As curvas padrões foram obtidas utilizando diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) de amostras de DNA metagenômico com concentrações conhecida. Todas as reações de amplificação apresentaram valores de eficiência entre 98 e 100 %, e os valores de  $R^2$  das curvas padrão foram sempre maiores que 0,98.



**Tabela 2.** Primers e condições de ciclagem utilizados para amplificar os genes alvo qPCR

Gene Alvo	Primer	Sequência	Condições para ciclagem
<b>16S rRNA de (Bactéria total)</b>	341f <sup>1</sup>	5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3'	95°C 5 min, 1 ciclo; 95°C
	518r <sup>1</sup>	5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'	10 s, 60°C 10 s, 72°C 30 s, 40 ciclos
<b>18S rRNA de (Fungo total)</b>	ITS1f <sup>2</sup>	5' TCCGTAGGTGAACCTGCG G 3'	95°C 15 min, 1 ciclo; 95°C
	5.8S <sup>2</sup>	5' CGCTGCGTTCTTCATCG 3'	1 min, 53°C 30 s, 72°C 1 min, 40 ciclos
<b><i>nifH</i> (Diazotróficos)</b>	FGPH19 <sup>3</sup>	5' TACGGCAARGGTGGNATHG 3'	95°C 5 min, 1 ciclo; 94°C
	POLR <sup>4</sup>	5' ATSGCCATCATYTCRCCGGA 3'	1 min, 57°C 45 s, 72°C 1 min, 30 ciclos; 72°C 7 min, 1 ciclo

<sup>1</sup>Muyzer et al. (1993); <sup>2</sup>Fierer et al. (2005); <sup>3</sup>Simonet et al. (1991); <sup>4</sup>Poly, Monrozier e Bally (2001)

### 3.9 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

A análise de PCR-DGGE foi utilizada para avaliar a estrutura das comunidades microbianas do solo (fungos, bactérias e diazotróficos). Na amplificação dos genes, foram adicionados aos primers os grampos (sequências ricas em guanina e citosina). Para bactéria total foi utilizado o fragmento do gene 16S rRNA como marcador molecular, amplificado usando os primers 341f-GC e 518R. Na amplificação do gene *nifH* foram utilizados os primers FGPH19 e PolR na amplificação inicial, realizando-se a segunda reação (NESTED) com os primers POLF-GC e AQER S. Para fungo total foi utilizado o fragmento da região ITS1 do gene 18S rRNA como marcador molecular, amplificado usando para a primeira reação os primers EF4 e ITS4 e para segunda reação (NESTED) ITS1-F-GC e ITS2. As condições para reações estão descritas na Tabela 3.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 %. Posteriormente, os amplicons foram analisados por DGGE utilizando-se um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad). Para a análise, foram preparados géis de poliacrilamida 8% (w/v), com gradiente desnaturante de 15 a 55 % para 16S rRNA (bactéria total), 20 a 55 % para *nifH* e 30 a 45 % para 18S rRNA (fungo total). 100 % de desnaturação consistiu na concentração de 7 M de ureia e 40 % de formamida. Os géis para bactéria total e *nifH* foram submetidos à eletroforese por 3 horas a 200 Volts com temperatura de 60 °C, enquanto para fungo total, os géis foram submetidos a eletroforese por 16 horas a 100 Volts. Após eletroforese, os géis foram lavados com ácido acético 10 % durante 15 minutos, seguido de três lavagens

sucessivas de 5 minutos com água destilada, uma lavagem com metanol 50 % v/v por 15 minutos, mais três lavagens sucessivas de 5 minutos com água destilada e em seguida corados com SYBR-Gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands) em TAE (Tris, Acetato, EDTA) 0,5 x no escuro por 40 minutos e fotografados sob luz ultravioleta usando um transiluminador UV E-BOX VX2.

A estrutura das comunidades microbianas foi avaliada a partir da similaridade entre os micro-organismos, pertencentes ao mesmo grupo, vista pela presença ou ausência de amplicons após o DGGE. Os géis foram analisados utilizando o software Geljv2 para a determinação do padrão de amplicons e a partir das matrizes geradas foram realizadas as análises de nMDS (*non-Metric Multidimensional Scaling*) com o programa Primer 5 (Phymouth Marine, Primer, Reino Unido). A ANOSIM foi aplicada para testar a diferença entre os valores médios de similaridade entre os tratamentos, sendo adotado como coeficiente de similaridade o modelo Jaccard. Desta forma, interpretam-se os valores de  $R > 0,75$  como indicativos de grupos bem separados;  $R > 0,5$  como grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados e  $R < 0,25$  como grupos pouco separados, de acordo com o manual do programa Primer5 (CLARKE; GORLEY, 2001).

A análise de NMDS baseia-se na representação gráfica dos tratamentos em diferentes dimensões, permitindo uma melhor visualização dos agrupamentos formados. A confiabilidade da regressão é dada pelo seu nível de *estresse*. De acordo com Clarke (1993) valores de estresse  $> 0,20$  (não se agrupam, totalmente randômicos),  $< 0,15$  (boa separação, com alguma sobreposição),  $< 0,10$  (separação ideal, grupos totalmente diferentes).

**Tabela 3.** Primers e condições de ciclagem para PCR-DGGE

Gene Alvo	Primer	Sequência 5' – 3'	Condições para ciclagem
<b>16S rRNA de (Bactéria total)</b>	341f-GC <sup>1</sup>	CGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG	95°C 10 min, 1 ciclo; 95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 3 min, 30 ciclos; 72°C 10 min, 1 ciclo
	518r <sup>1</sup>	ATTACCGCGGCTGCTGG	
<b>18S rRNA de (Fungo total)</b>	EF4 <sup>2</sup>	AAGGG(G/A)TGTATTTATTAG	94°C 5 min, 1 ciclo; 94°C 5 min, 55°C 30 s, 72°C 90 s, 34 ciclos; 72°C 5 min, 1 ciclo
	ITS4 <sup>3</sup>	CAGGAGACTTCTACACGGTCCAG	
	ITS1f-GC <sup>4</sup>	CCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGG GCACGGGCCGCTTGGTCATTTAGAGGAGTAA	
	ITS2 <sup>5</sup>	GCTGCGTTCATCGATGC	
<b><i>nifH</i> (Diazotróficos)</b>	FGPH19 <sup>6</sup>	TACGGCAARGGTGGNATH	95°C 5 min, 1 ciclo; 94°C 1 min, 57°C 45 s, 72°C 1 min, 30 ciclos; 72°C 7 min, 1 ciclo
	POLR <sup>7</sup>	ATSGCCATCATYTCRCCG	
	PolF-GC <sup>7</sup>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCG CCCCCGCCCCTCCGAYCCSAARGCBGACTC	
	AQER <sup>7</sup>	ACTATGTAGATYTCCTG	

<sup>1</sup>Muyzer et al. (1993); <sup>2</sup>Smit et al. (1999); <sup>3</sup>White et al. (1990); <sup>4</sup>Gardes; Bruns (1993); <sup>5</sup>Anderson et al. (2003) <sup>6</sup> Simonet et al. (1991); <sup>7</sup>Poly; Monrozier; Bally (2001)

### 3.10 Análise estatística e interpretação dos resultados

Todas as análises foram efetuadas através do software R v.3.4.3. As médias das variáveis isoladas foram calculadas através da biblioteca doBy e os testes de normalidade dos resíduos foram feitos pela estatística de Shapiro-Wilk a 5% de significância. Os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância seguindo um modelo fatorial duplo com 2 tratamentos adicionais (2 x 3 + 2), realizando-se o teste F e a comparação múltipla de médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. O biochar apresentou variação linear significativa com relação a variação nas doses e a regressão foi calculada juntamente com a sua correlação (R<sup>2</sup>). Para comparação múltipla das variáveis com o tratamento controle (solos sem biochar e sem esterco) foi aplicado o teste de Dunnett, ao nível de significância de 5%. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste Scheirer-Ray-

Hare, sendo uma extensão do teste de Kruskal-Wallis, utilizado para experimentos com 2 fatores. O teste post-hoc foi aplicado para comparação múltipla e entre os tratamentos foi utilizado o teste de Dunn, que leva em conta as medianas, adotando um limiar  $\alpha = 0.05$ . Os testes de Scheirer-Ray-Hare e de Dunnett foram feitos com auxílio das bibliotecas `r companion` e `FSA`, respectivamente.

No presente trabalho, a análise canônica de coordenadas principais (CAP) foi calculada através da biblioteca `vegan`. A partir dela, foi possível obter um modelo de análise de redundância com uma ordenação multivariada que eliminou variáveis pouco explicativas. A análise de heatmap é um gráfico que tem por trás uma análise de significância das correlações de suas respectivas variáveis, além disso, mostra o agrupamento das variáveis com base numa escala de cores que representa a correlação de Pearson. Para a construção desse gráfico, foi utilizada a biblioteca `heatmaply`. Tanto a CAP quanto a heatmap utilizaram como base os dados das matrizes geradas a partir da DGGE, e atributos químicos do solo e tiveram como objetivo observar os agrupamentos dos tratamentos com os atributos do solo. Na análise de heatmap as correlações foram feitas pelo coeficiente de Pearson para dados paramétricos. A partir dessas análises, foi possível revelar a interação entre a estrutura das comunidades microbianas com os nutrientes inorgânicos, relação C: N, pH e mudanças nas características metabólicas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos químicos de um Neossolo Regolítico cultivado com milho

A adição de biochar ao solo cultivado com milho apresentou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) quanto ao pH entre as doses  $4t\ ha^{-1}$  e  $8t\ ha^{-1}$ , variando entre 5,02 e 6,04, respectivamente. Os valores de pH mais elevado foram observados nos solos tratados com biochar CC (Tabela 4). O pH dos solos que receberam apenas esterco (E), foi considerado ácido (4,43) sendo estatisticamente diferente e inferior quando comparado aos solos tratados com ambos os biochars (5,37), independente da dose. O nitrogênio total não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos e doses. O carbono lábil diferiu entre os tipos de biochar, sendo maior nos solos que receberam todas as doses de CC ( $132,46\ g\ kg^{-1}$ ). De modo geral, até mesmo quando comparado aos solos tratados com adubação orgânica (E), o teor de C foi superior nos solos com adição de ambos os biochars ( $106,64\ g\ kg^{-1}$ ).

A relação C:N dos solos que receberam ambos biochars foi considerada maior de que no controle, sendo os solos que receberam  $4t\ ha^{-1}$  do CC os que apresentaram maior relação (5,18). Quando adicionado  $8t\ ha^{-1}$  de biochar, a relação C:N foi maior (5,25) nos solos com BC. Todos os solos que receberam biochar apresentaram relação C:N maior (3,75) de que os solos que receberam apenas esterco (1,51). Esses valores de relação C:N, considerados baixos, indicam, que o biochar, quando incorporado ao solo contribui para o processo de mineralização.

De modo geral, os teores mais elevados de sódio foram observados nos solos que receberam a adição de ambos os biochars ( $0,12\ Cmol_c\ kg^{-1}$ ) quando comparado aos solos tratados com esterco ( $0,10\ Cmol_c\ kg^{-1}$ ). Mas a adição da dose  $8\ t\ ha^{-1}$ , apresentou diferença estatística significativa, sendo BC ( $0,14\ Cmol_c\ kg^{-1}$ ) superior a CC ( $0,02\ Cmol_c\ kg^{-1}$ ). O teor de potássio nos solos que receberam CC foi maior ( $0,46\ Cmol_c\ kg^{-1}$ ) de que nos solos com BC ( $0,19\ Cmol_c\ kg^{-1}$ ). Entretanto, os solos com as doses de BC foram considerados estatisticamente iguais ao solo com esterco no teor de potássio diferindo daqueles que receberam as doses de CC, apresentando assim teores mais elevados de  $K^+$ . O fósforo disponível foi estatisticamente diferente e superior após a adição da dose  $8\ t\ ha^{-1}$  de CC ( $15,25\ mg\ kg^{-1}$ ) quando comparado aos solos tratados com BC na mesma dose. Na dose  $16t\ ha^{-1}$  ocorreu o inverso, sendo os teores de P disponível mais elevado ( $10,21\ mg\ kg^{-1}$ ) nos solos tratados com BC. Os solos tratados com

adubação orgânica, apresentaram teores de P inferior ( $7,06 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aos solos que receberam ambos os biochars ( $9,71 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

A acidez trocável foi superior ( $4,32$ ) nos solos com adição de  $16 \text{ t ha}^{-1}$  de CC, em relação a mesma dose de BC. Os solos sob adição de esterco apresentaram diferença estatística, sendo neles, a acidez trocável maior ( $4,37$ ) de que nos solos tratados com BC e CC ( $4,08$ ). O cálcio e o magnésio não apresentaram diferença estatística entre as doses e tratamentos adicionados ao solo. Já o alumínio foi estatisticamente diferente nos solos que receberam  $4 \text{ t ha}^{-1}$  e  $8 \text{ t ha}^{-1}$  sendo os maiores valores apresentados com adição de BC ( $0,15$  e  $0,13 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ). Além disso, os solos tratados com esterco apresentaram maior teor de  $\text{Al}^{+3}$  ( $0,22 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) quando comparados aos solos sob adição dos dois tipos de biochar ( $0,14 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ). O carbono orgânico total (COT) foi influenciado positivamente pela adição dos biochars ao solo, uma vez que apresentou teor superior ( $11,68 \text{ g kg}^{-1}$ ) em relação aos solos tratados com esterco ( $10,11 \text{ g kg}^{-1}$ ).

**Tabela 4.** Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058)

9.pH						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	5,02 b	5,08 b	5,27	5,12	f(x) = 5.12	ns
CC	5,62 a	6,04 a	5,17	5,61	f(x) = -0.047x + 6.05	0,45
Med.	5,32	5,56	5,22	5,37 A		
E = 4,43 B						
7.N (g kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	40,95	16,82	26,17	27,98	f(x) = 27.98	ns
CC	33,91	69,06	38,85	47,27	f(x) = 47.27	ns
Med.	37,43	42,94	32,51	37,63		
E = 42,39						
8.C (g kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	82,02	83,86	76,57	80,82 b	f(x) = 80.82	ns
CC	153,10	122,13	122,15	132,46 a	f(x) = 132.46	ns
Med.	117,56	103,00	99,36	106,64 A		
E = 51,08 B						
3.C:N						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	2,55 b	5,25 a	3,45	3,75	f(x) = 3.75	ns
CC	5,81 a	2,22 b	3,22	3,75	f(x) = 3.75	ns
Med.	4,18	3,74	3,34	3,75 A		
E = 1,51 B						
10.Na (Cmolc kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,14	0,14 a	0,14	0,14	f(x) = 0.14	ns
CC	0,16	0,02 b	0,13	0,10	f(x) = 0.10	ns
Med.	0,15	0,08	0,14	0,12 A		
E = 0,10 B						
11.K (Cmolc kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,13	0,18	0,26	0,19 bB	f(x) = 0.011x + 0.086	0,99
CC	0,43	0,63	0,33	0,46 aA	f(x) = 0.46	ns
Med.	0,28	0,40	0,30	0,33		
E = 0,08 B						
12.P (mg kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	8,11	9,55 b	10,21 a	9,29	f(x) = 9.29	ns
CC	8,04	15,25 a	7,13 b	10,14	f(x) = 10.14	ns
Med.	8,08	12,40	8,67	9,71 A		
E = 7,06 B						
13.H+Al						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	3,93	4,21	3,66 b	3,93	f(x) = -0.029x + 4.21	0,43
CC	3,88	4,48	4,32 a	4,23	f(x) = 0.028x + 3.96	0,31
Med.	3,91	4,35	3,99	4,08 B		
E = 4,37 A						

(Continua)

**Tabela 4.** Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058)

(Conclusão)

14. Ca (Cmolc kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,65	0,79	0,58	0,67	f(x) = 0.67	ns
CC	0,67	0,72	0,63	0,67	f(x) = 0.67	ns
Med.	0,66	0,76	0,60	0,67		
E = 0,62						
15. Mg (Cmolc kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	1,07	1,07	1,01	1,05	f(x) = 1.05	ns
CC	1,01	1,07	0,99	1,03	f(x) = 1.03	ns
Med.	1,04	1,07	1,00	1,04		
E = 1,06						
16. Al (Cmolc kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,15 a	0,13 a	0,17	0,15	f(x) = 0.15	ns
CC	0,10 b	0,08 b	0,19	0,13	f(x) = 0.0087x + 0.044	0,79
Med.	0,13	0,11	0,18	0,14 B		
E = 0,22 A						
20. COT (g kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	10,65	11,30	12,25	11,40	f(x) = 11.40	ns
CC	11,69	10,94	13,27	11,96	f(x) = 11.96	ns
Med.	11,17	11,12	12,76	11,68 A	f(x) = 0.142x + 10.353	0,87
E = 10,11 B						

As diferenças significativas entre tratamentos numa mesma coluna foram representadas por letras minúsculas diferentes a direita de suas médias, e entre os tratamentos numa mesma linha foram representadas pela presença de um modelo linear seguido pela sua correção (R<sup>2</sup>), ambos adotando o nível de significância de 5%. A diferença significativa entre o fatorial Biochar x Dose com o tratamento adicional (esterco), foi sinalizada pela presença de letras maiúsculas diferentes entre ambas. A ausência de letras entre qualquer tratamento indica igualdade estatística ao nível de 5% de significância

## 4.2 Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos microbianos de um Neossolo Regolítico cultivado com milho

A maior quantidade de carbono da biomassa microbiana (CBM) foi encontrado em solos incorporados de CC na dose 4t ha<sup>-1</sup> (153,10 µg.g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>), sendo diferente (P ≤ 0,05) e quase três vezes maior, quando comparado ao controle absoluto (65,48 µg.g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>). Entretanto, os solos que receberam as doses de CC mostraram-se estatisticamente superior (132,46 µg.g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) aos solos com BC (80,82 µg.g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) quanto ao CBM (Tabela 5).

O nitrogênio da biomassa microbiana (N<sub>mic</sub>) acompanhou o mesmo comportamento do nitrogênio total (Nt), pois não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e doses de biochar. Quanto ao fósforo da biomassa microbiana (P<sub>mic</sub>), apresentou diferença (P ≤ 0,05) apenas com a adição da dose 8t ha<sup>-1</sup> do CC, sendo o menor valor (0,62 µg.g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) de P<sub>mic</sub> encontrado em todos os solos quando comparado ao controle absoluto (3,26 P µg.g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>).



Os solos tratados com os dois tipos de biochar em todas as doses e o tratamento com adição de esterco foram estatisticamente diferentes e superiores quando comparados ao controle absoluto em relação a respiração basal do solo ( $13,93 \text{ mg.C-CO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ). No entanto, entre os solos com biochars, BC apresentou RBS superior ( $31,41 \text{ mg.C-CO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) aos solos com CC ( $26,92 \text{ mg.C-CO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ). Quanto ao quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ), após a incorporação de BC e CC, BC apresentou  $q\text{CO}_2$  superior ( $39,51 \text{ mg.C-CO}_2.\text{g}^{-1} \text{ Cmic}.\text{dia}^{-1}$ ) a CC ( $21,91 \text{ mg.C-CO}_2.\text{g}^{-1} \text{ Cmic}.\text{dia}^{-1}$ ). Sendo que, de modo geral os solos tratados com ambos os biochars apresentaram quociente metabólico inferior ( $30,71 \text{ mg.C-CO}_2.\text{g}^{-1} \text{ Cmic}.\text{dia}^{-1}$ ) aos solos com adição de esterco ( $52,45 \text{ mg.C-CO}_2.\text{g}^{-1} \text{ Cmic}.\text{dia}^{-1}$ ).

**Tabela 5.** Carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa microbiana (CBM,  $N_{mic}$ ,  $P_{mic}$ ), respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058)

1.CBM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ solo-1)						
	<b>4 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>8 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>16 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>Med.</b>	<b>Modelo (x em t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>BC</b>	82,02	83,86	76,57	80,82 b	f(x) = 80.82	ns
<b>CC</b>	<b>153,10</b>	122,13	122,15	132,46 a	f(x) = 132.46	ns
<b>Med.</b>	117,56	103,00	99,36	106,64		
	S = 65,48	E = 72,73				
2.Nmic ( $\mu\text{g g}^{-1}$ solo-1)						
	<b>4 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>8 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>16 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>Med.</b>	<b>Modelo (x em t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>BC</b>	41,01	16,57	26,29	27,96	f(x) = 27.96	ns
<b>CC</b>	33,91	69,06	38,75	47,24	f(x) = 47.24	ns
<b>Med.</b>	37,46	42,82	32,52	37,60		
	S = 65,48	E = 48,78				
4.Pmic ( $\mu\text{g g}^{-1}$ solo-1)						
	<b>4 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>8 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>16 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>Med.</b>	<b>Modelo (x em t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>BC</b>	0,97	2,94	2,21	2,04	f(x) = 2.04	ns
<b>CC</b>	1,60	<b>0,62</b>	2,13	1,45	f(x) = 1.45	ns
<b>Med.</b>	1,29	1,78	2,17	1,75		
	S = 3,26	E = 2,96				
5.RBS (mg.C-CO <sub>2</sub> .kg-1.dia-1)						
	<b>4 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>8 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>16 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>Med.</b>	<b>Modelo (x em t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>BC</b>	<b>31,00</b>	<b>34,27</b>	<b>28,96</b>	31,41 a	f(x) = 31.41	ns
<b>CC</b>	<b>26,91</b>	<b>28,96</b>	<b>24,88</b>	26,92 b	f(x) = 26.92	ns
<b>Med.</b>	28,96	31,62	26,92	29,16		
	S = 13,93	E = <b>26,53</b>				
6.qCO <sub>2</sub> (mg.C-CO <sub>2</sub> .g-1 Cmic.dia-1)						
	<b>4 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>8 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>16 t ha<sup>-1</sup></b>	<b>Med.</b>	<b>Modelo (x em t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>BC</b>	39,01	41,48	38,05	39,51 a	f(x) = 39.51	ns
<b>CC</b>	17,91	27,49	20,33	21,91 b	f(x) = 21.91	ns
<b>Med.</b>	28,46	34,48	29,19	30,71 B		
	S = 38,59	E = 52,45	A			

As diferenças significativas entre tratamentos numa mesma coluna foram representadas por letras minúsculas diferentes a direita de suas médias, e entre os tratamentos numa mesma linha foram representadas pela presença de um modelo linear seguido pela sua correção ( $R^2$ ), ambos adotando o nível de significância de 5%. Os tratamentos com as médias em negrito foram significativamente diferentes do controle (S) e a diferença significativa entre o fatorial Biochar x Dose com o tratamento adicional (esterco = E), foi sinalizada pela presença de letras maiúsculas diferentes entre ambas. A ausência de letras entre qualquer tratamento indica igualdade estatística ao nível de 5% de significância

### **4.3 Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre a abundância de bactérias totais, diazotróficas e fungos totais de um Neossolo Regolítico cultivado com milho**

A abundância de bactérias totais, gene 16S rRNA, não apresentou diferença estatística entre o número de cópias encontrado nos tratamentos e as doses de biochar quando comparados ao controle e solo com esterco. Enquanto isso, o gene 18S rRNA, utilizado como alvo no estudo de fungos totais, apresentou diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) no solo que recebeu o tratamento com esterco sendo a quantidade de cópias do gene inferior (6,20) ao número de cópias encontradas no controle absoluto (6,48). Além disso, a maior dose dos biochars (16 t ha<sup>-1</sup>) exerceu influência sobre a abundância de genes 18S, uma vez que o biochar da borra de café apresentou um maior número de cópias (6,87) em relação ao biochar da casca de café (6,18) do respectivo gene. A abundância de diazotróficos foi verificada através do gene *nifH* e os resultados mostraram que todas as doses do CC diferiram estatisticamente do controle, sendo o número de cópias do gene em questão menor nos solos tratados com CC. Além disso, as maiores doses de ambos os biochars diferiram estatisticamente entre si, sendo que os solos tratados com BC apresentaram um maior número de cópias (4,73) do respectivo gene em relação a CC (4,22). Avaliando de modo geral, o biochar da borra de café exerceu maior influência sobre a abundância de diazotróficos e fungos totais.

**Tabela 6.** Análise de variância da abundância de genes em solo cultivado com plântulas de milho (variedade comercial 1058)

17. Log. nº de cópias do gene 16S rRNA (SRH - Não normal!)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	8,18	9,08	9,28	8,85	f(x) = 8.85	ns
CC	9,31	8,48	8,42	8,74	f(x) = 8.74	ns
Med.	8,74	8,78	8,85	8,79		
S = 9,02    E = 8,34						
18. Log. nº de cópias do gene 18S rRNA						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	6,05	6,52	6,87 a	6,48	f(x) = 0.065x + 5.875	0,93
CC	6,58	6,68	6,18 b	6,48	f(x) = 6.48	ns
Med.	6,32	6,60	6,53	6,48		
S = 6,48    E = 6,20						
19. Log. nº de cópias do gene nifH						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	4,41	4,76	4,73 a	4,63 a	f(x) = 0.065x + 5.875	0,93
CC	<b>4,46</b>	<b>4,40</b>	<b>4,22</b> b	4,36 b	f(x) = 6.48	ns
Med.	4,43	4,58	4,47	4,50		
S = 4,98    E = 4,62						

Para dados não normais, o método que substituiu o teste F (ANOVA) foi o Scheirer-Ray-Hare e a comparação múltipla entre as variáveis foi feita pelo teste de Dunnett, ambos ao nível de 5% de significância. Neste caso não houve efeito significativo de interação entre as variáveis e por isso foram feitas comparações entre os tratamentos gerais BC (0.3) e CC (0.5).

#### 4.4 Distribuição dos tratamentos levando em consideração a estrutura das comunidades microbianas em solos cultivados com milho sob aplicação de doses crescentes de biochar

A aplicação de dois tipos de biochar, BC e CC, em diferentes doses à um Neossolo Regolítico cultivado com milho, permitiu delinear o perfil das comunidades microbianas representando através da análise de escala multidimensional (NMDS), que se baseia na representação gráfica dos tratamentos em diferentes dimensões, permitindo uma melhor visualização dos agrupamentos formados.

##### - Bactérias totais

O nível de *estresse* aplicado para o gene 16S rRNA foi de 0,07, ou seja, houve a formação de grupos totalmente separados (Figura 3). A NMDS indicou que as amostras se agruparam de acordo com os tratamentos, havendo a formação de dois grupos. Em um dos

grupos estão os tratamentos: solo de referência; esterco; as doses 4 t ha<sup>-1</sup> e 8 t ha<sup>-1</sup> do biochar BC e no outro grupo ficaram todas as doses do biochar CC e a dose 16t ha<sup>-1</sup> de BC.

Complementando a representação da NMDS, a ANOSIM (Teste de *Pairwise*) foi aplicada (Apêndice A) para testar a diferença entre os valores médios de similaridade entre as amostras. Desta forma, o teste indicou um R global de 0,383 e os resultados do teste de *Pairwise* mostraram que apenas três tratamentos formaram grupos bem separados: solo, dose 8t CC; solo+esterco, dose 8t CC e dose 4t BC, dose 8t CC

### **- Fungos totais**

O gene 18S rRNA apresentou nível de *estresse* de 0,02, indicando que a representação bidimensional é válida e considerada como ideal, formando, assim, grupos bem separados e distintos (Figura 4). O biochar da borra de café agrupou-se com o solo de referência e o solo+esterco, enquanto o biochar da casca de café formou um grupo bem distinto e separado incluindo todas as doses

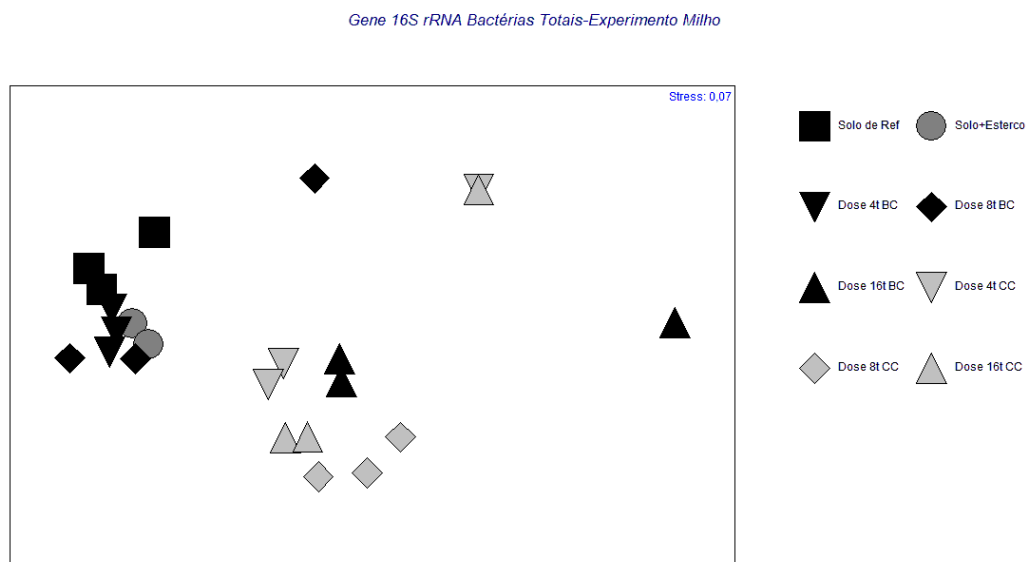
Para complementar a NMDS, o teste de *Pairwise* (Apêndice B) foi aplicado e apresentou um R global de 0,721, indicando, assim, a formação de grupos bem separados. Os resultados do teste de *Pairwise* mostraram que os tratamentos formaram grupos bem separados, com exceção dos tratamentos: dose 4t BC, dose 8t BC; dose 4t CC, dose 8t CC; dose 4t CC, dose 16t CC e dose 8t CC, dose 16t CC, que formaram grupos pouco separados.

### **- Diazotróficos**

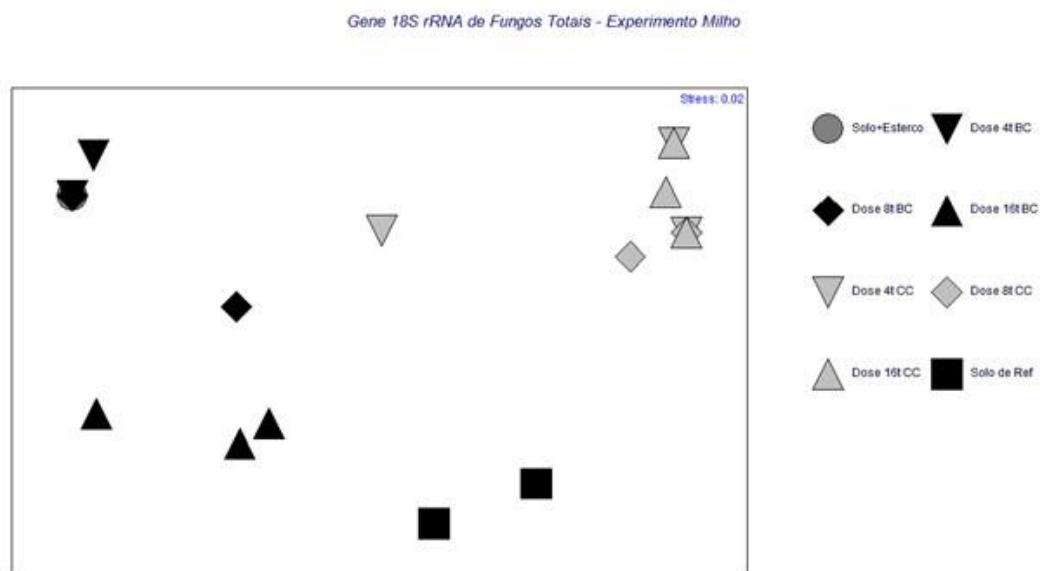
Em relação a comunidade de fixadoras de nitrogênio, o nível de *estresse* aplicado foi de 0,1, indicando que a representação bidimensional é válida e considerada como ideal formando assim grupos bem separados e distintos. A NMDS indicou que ocorreu a formação de dois grupos distintos, agrupados por tratamentos. Em um dos grupos formados ficaram os seguintes tratamentos: solo de referência; solo+esterco e as menores doses do biochar da borra de café (4t ha<sup>-1</sup> e 8t ha<sup>-1</sup>), enquanto no outro grupo ficaram todos os tratamentos do biochar da casca de café e a maior dose do biochar da borra de café (Figura 5).

Os resultados do teste de *Pairwise* (Apêndice C) mostraram um R global de 0,7 e a formação de grupos bem separados na maioria dos tratamentos, sendo dois grupos considerados como pouco separados (dose 4t BC, dose 8t BC e dose 8t CC, dose 16t CC) e seis com sobreposição, mas claramente distintos (solo, dose 4t BC; solo+esterco, dose 4t BC;

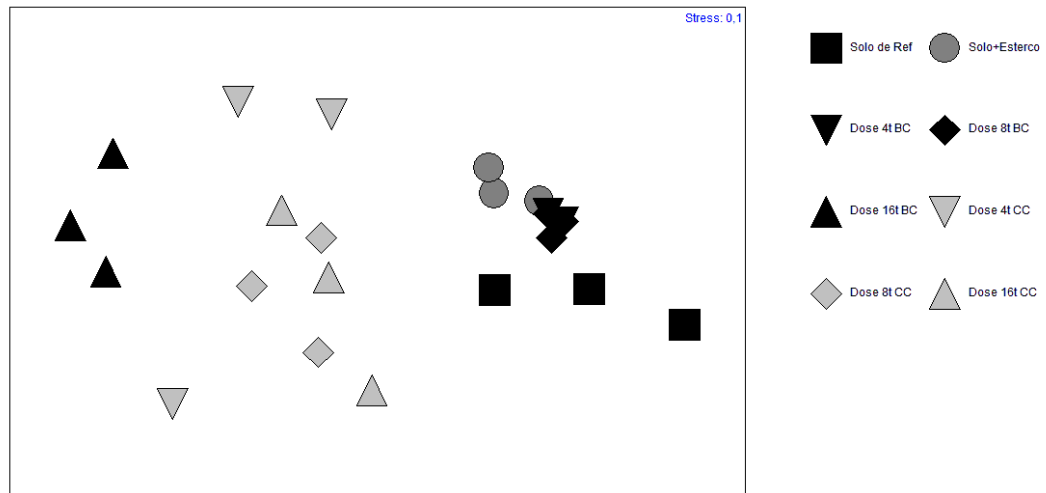
solo+esterco, dose 8t BC; dose 16t BC, dose 4t CC; dose 4t CC, dose 8t CC; dose 4t CC, dose 16t CC).



**Figura 3.** Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de bactérias totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058)



**Figura 4.** Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de fungos totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058)

Gene *nifH* - Experimento Milho

**Figura 5.** Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de fixadora de nitrogênio, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com milho (variedade comercial 1058)

#### 4.5 Análise canônica de coordenadas principais (CAP), HeatMap, correlação entre os atributos químicos do solo e as comunidades microbianas em solos tratados com biochar de café sob cultivado de milho

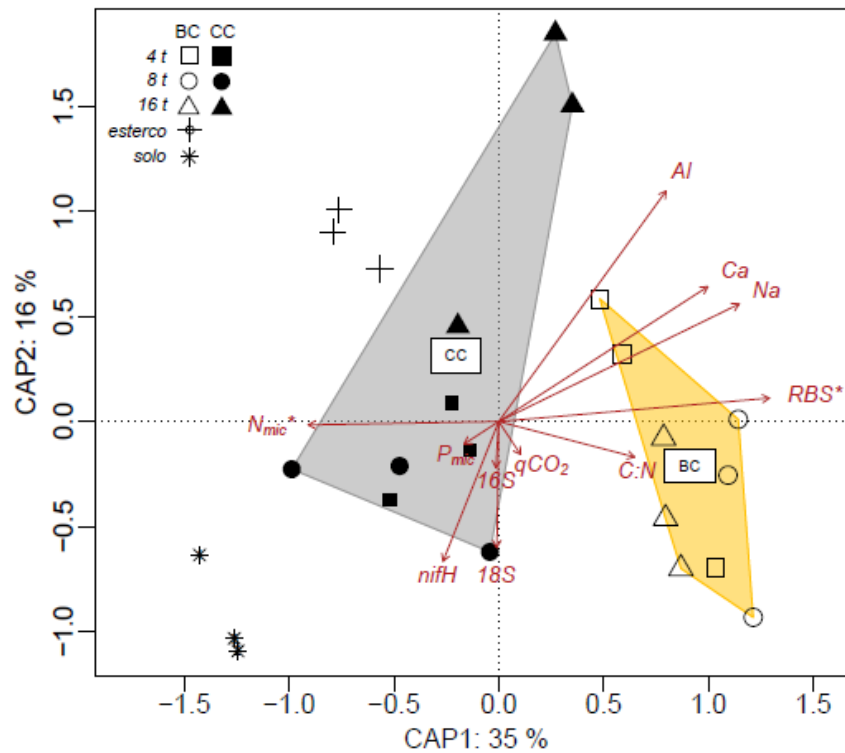
A análise canônica de coordenadas principais explicou 51 % da variação total dos vetores (variáveis) não sobrepostos e correlacionados à matriz de distância da DGGE para o gene 16S rRNA (Figura 6). Essa análise mostrou um forte distanciamento entre a estrutura das comunidades bacterianas do solo com a dose 16 t ha<sup>-1</sup> do biochar da casca de café. As menores doses de CC se correlacionaram positivamente com o número de cópias do gene 16S rRNA, 18S rRNA, *nifH*,  $P_{mic}$ ,  $qCO_2$  e  $N_{mic}$ , com diferenças significativas. A comunidade bacteriana do solo controle apresentou maior correlação com o número de cópias do gene *nifH*,  $N_{mic}$  e  $P_{mic}$ , sendo este último menos intenso, e assim distanciando-se do alumínio do solo. O Al apresentou maior proximidade com as comunidades bacterianas nas doses 16 t ha<sup>-1</sup> de CC e 4 t ha<sup>-1</sup> de BC. No tratamento com esterco, as comunidades microbianas correlacionaram-se com o  $N_{mic}$ . O biochar BC apresentou influência sobre  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $Al^{+3}$  e RBS, sendo essas variáveis correlacionadas negativamente com o número de cópias do gene 16S rRNA, o que significa que o número de bactérias diminuiu conforme o aumento dessas variáveis.

Em relação ao gene 18S rRNA a análise canônica de coordenadas principais explicou 60 % da variação total dos vetores (variáveis) não sobrepostos e correlacionados a matriz de

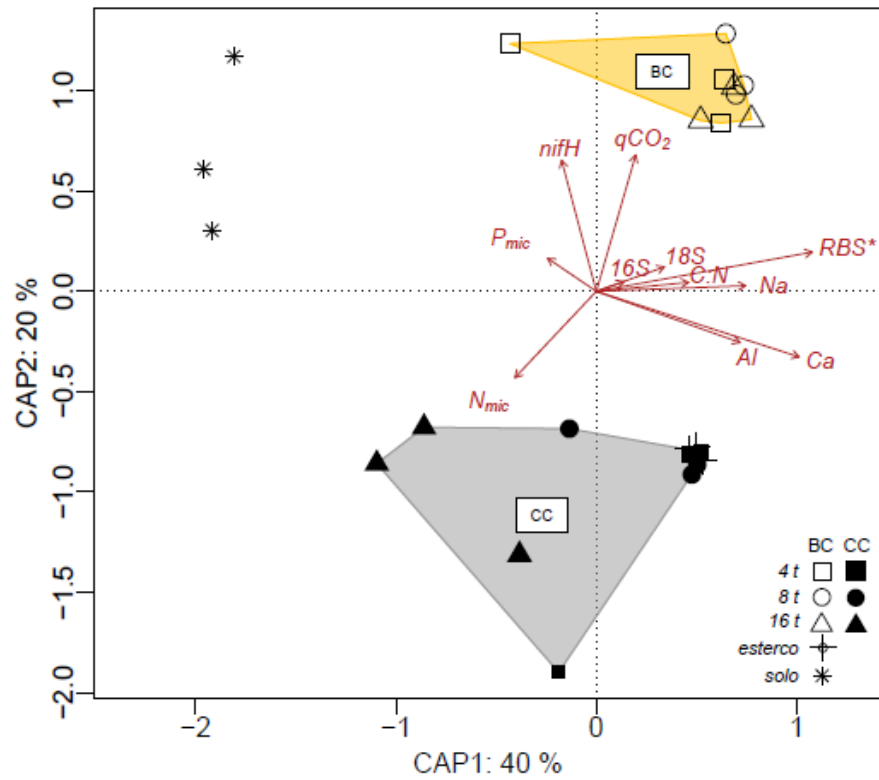
distância do DGGE (Figura 7). As comunidades fúngicas dos solos com biochars de casca e borra de café se distanciaram entre si, apresentando poucas sobreposições, e se afastaram também dos tratamentos controle. Na dose 16 t ha<sup>-1</sup> de CC, as comunidades fúngicas aproximam-se do N<sub>mic</sub>, enquanto as menores doses do mesmo biochar e o tratamento com esterco aproximam-se dos elementos Al<sup>+3</sup> e Ca<sup>+2</sup>. Todas as doses do biochar da borra de café foram mais favoráveis ao número de cópias do gene 18S rRNA correlacionando-se positivamente com RBS. Os solos com BC aproximaram-se também do qCO<sub>2</sub>, gene *nifH*, gene 16S rRNA e P<sub>mic</sub>, embora os dois últimos tenham sido menos intensos.

Já para o gene *nifH*, a análise canônica de coordenadas principais (Figura 8) explicou 53 % da variação total dos vetores (variáveis) não sobrepostos e correlacionados a matriz de distância do DGGE para o gene *nifH*. A comunidade de diazotróficos no solo controle apresentou maior correlação com o número de cópias do gene *nifH*. O solo controle correlacionou-se também com o gene 18S rRNA e o N<sub>mic</sub>. No biochar da casca de café e o tratamento com esterco, houve um distanciamento da comunidade de diazotróficos, desta forma esses tratamentos aproximaram-se do N<sub>mic</sub> (as menores doses e o tratamento com esterco) e do Ca<sup>+2</sup> e Al<sup>+3</sup> (maior dose de CC). A maior dose de BC aproximou-se do número de cópias do gene *nifH*, P<sub>mic</sub>, qCO<sub>2</sub> e gene 16S rRNA, sendo o último menos intenso. Quanto as menores doses de BC aproximaram-se da relação C:N, Na<sup>+</sup> e RBS.

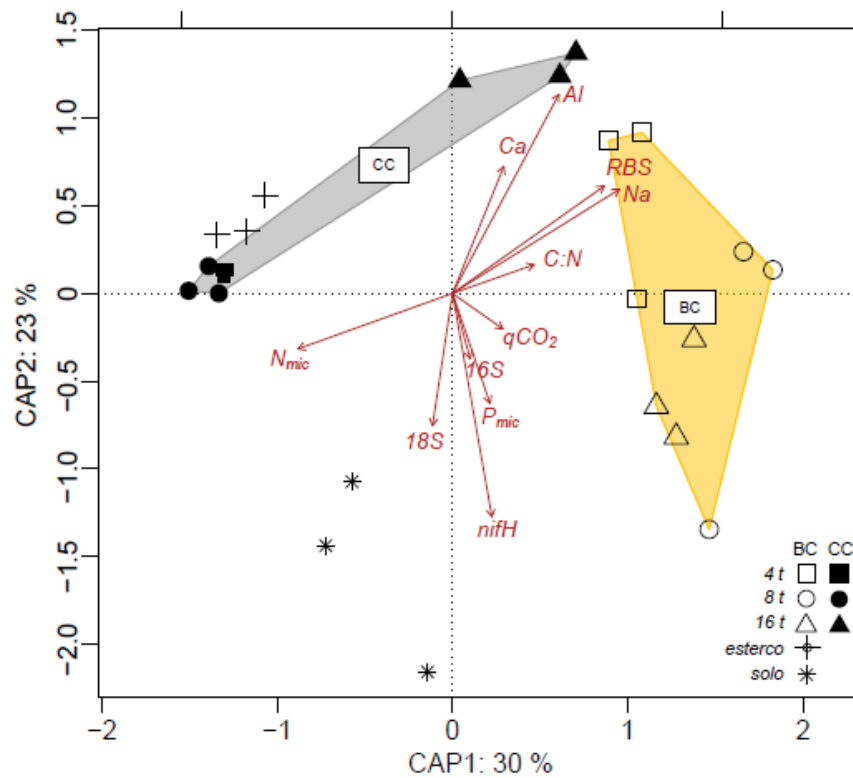




**Figura 6.** Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades bacterianas e as características bioquímicas de solos cultivados com milho (variedade comercial 1058) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $p < 0,05$ )

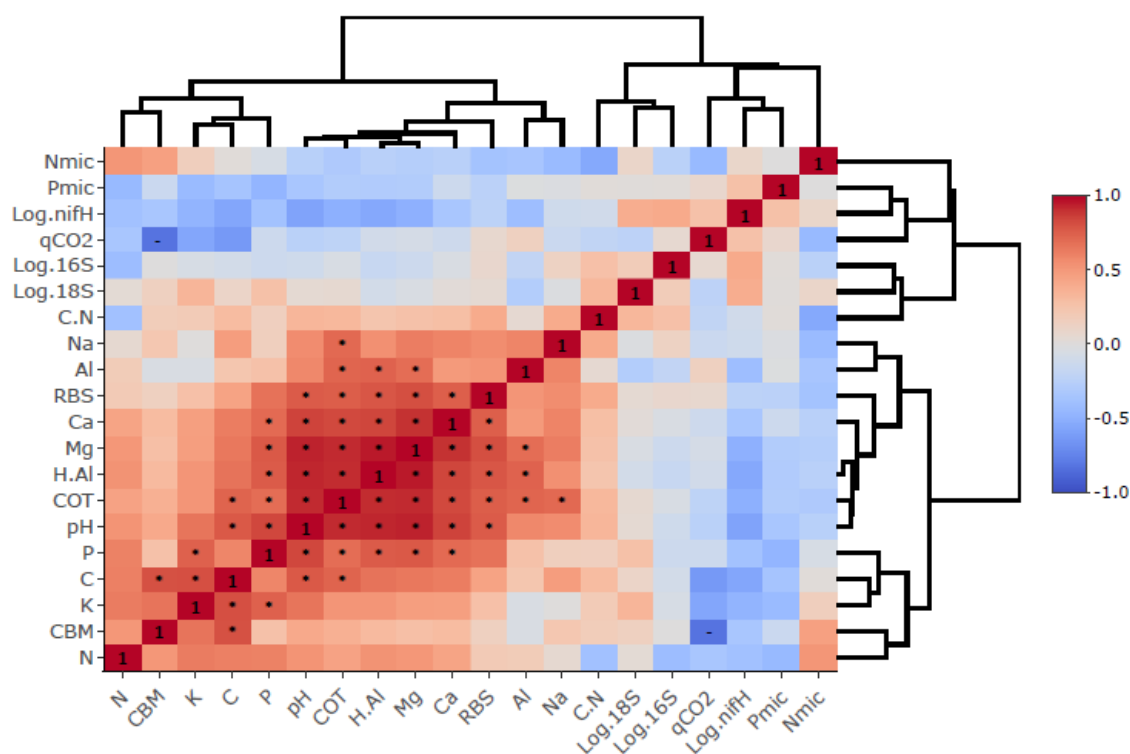


**Figura 7.** Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades fúngicas e as características bioquímicas de solos cultivados com milho (variedade comercial 1058) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $p < 0,05$ )



**Figura 8.** Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades de diazotróficos e as características bioquímicas de solos cultivados com milho (variedade comercial 1058) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $p < 0,05$ )

A análise de heatmap (Figura 9) revelou correlações lineares significativas ( $P \leq 0,05$ ) que foram detectadas entre as variáveis, principalmente as positivas entre o carbono orgânico total (COT) e o maior número de variáveis, sendo assim correlacionado com C, P, pH, H+Al, Mg, Ca, RBS, Al e Na do solo. O Mg e Al se correlacionaram com as mesmas variáveis no solo. A única correlação negativa foi observada entre o carbono da biomassa microbiana e a respiração basal no solo.



**Figura 9.** Análise de heatmap mostrando correlações entre as variáveis analisadas nos solos cultivados com milho (variedade comercial 1058). Os polígonos com asteriscos (\*) e traços (-) evidenciam, respectivamente, as correlações positivas e negativas significativas ( $p < 0.05$ ) com módulos maiores do que 0.7, de acordo com a estatística baseada no coeficiente de correlação produto-momento de Pearson ( $r$ ) seguindo a distribuição  $t$

#### 4.6 Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos químicos de um Neossolo Regolítico cultivado com feijão

Após a adição de ambos os biochars ao solo o pH foi superior nos solos tratados com CC, levando em consideração todas as doses. Entretanto, de modo geral, os biochars diferiram ( $P \leq 0,05$ ) dos solos tratados com esterco (5,30) apresentando valores de pH superior (5,74). A relação C:N foi superior nos solos que receberam 4 t ha<sup>-1</sup> de CC (22,94) diferindo significativamente do controle (1,58) e da mesma dose de BC (5,35).

Assim como, no experimento com milho, os teores mais elevados de sódio foram observados nos solos que receberam a adição de ambos os biochars (0,15 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) quando comparado aos solos tratados com esterco (0,09 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>). Mas a adição da dose 4 t ha<sup>-1</sup>, apresentou diferença estatística significativa, sendo BC (0,15 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) superior a CC (0,09 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>). A incorporação de biochar aos solos aumentou o teor de potássio, levando em consideração todas as doses do produto, os solos que receberam CC apresentaram teor do respectivo elemento superior (0,50 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) a BC (0,30 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>). Ambos os biochars

apresentaram teor de  $K^+$  superior aos solos com adição de esterco ( $0,14 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ). Mas apenas os solos com CC ( $0,50 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) apresentaram diferença estatística.

O teor de fósforo nos solos apresentou diferença significativa entre os que receberam esterco ( $2,34 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e biochars ( $4,42 \text{ mg kg}^{-1}$ ), que contém maior teor de P. Em relação a acidez trocável e magnésio, as doses e tratamentos não exerceram influência sobre esses elementos nos solos, e por isso não foi observada nenhuma diferença estatística. Quanto ao cálcio, apenas as doses  $8 \text{ t ha}^{-1}$  e  $16 \text{ t ha}^{-1}$  do biochar apresentaram diferença estatística, sendo CC ( $0,73$  e  $0,75 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) superior a BC ( $0,66$  e  $0,62 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) nas doses em questão, respectivamente.

O alumínio encontrado nos solos não apresentou interação entre as variáveis e por isso foram feitas comparações entre os tratamentos gerais BC (0.3) e CC (0.5). O teste de Dunnett também permitiu observar que o solo com esterco ( $0,22 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) foi igual ao com BC ( $0,19 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) e diferente (superior) ao com CC ( $0,15 \text{ Cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ). Diferente do experimento com milho, após adição de biochar aos solos sob cultivo de feijão, o carbono orgânico total não foi influenciado por nenhum dos tratamentos e suas respectivas doses.

**Tabela 7.** Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo)

7.pH						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	5,41	5,47	5,79	5,56 b	f(x) = 5.56	ns
CC	5,60	5,84	6,36	5,93 a	f(x) = 5.93	ns
Med.	5,51	5,65	6,08	5,74 A	f(x) = 0.048x + 5.3	0,99
E = 5,30 B						
3.C:N						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	5,35 b	8,89	3,73	5,99	f(x) = 5.99	ns
CC	22,94 a	2,69	3,69	9,78	f(x) = -1.3x + 22.4	0,52
Med.	14,14	5,79	3,71	7,88		
S = 1,58 E = 4,88						
8.Na (Cmolc kg-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,15 a	0,12	0,19	0,15	f(x) = 0.0044x + 0.113	0,54
CC	0,09 b	0,16	0,16	0,14	f(x) = 0.0052x + 0.092	0,57
Med.	0,12	0,14	0,18	0,15 A		
E = 0,09 B						
9.K (Cmolc kg-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,20	0,29	0,40	0,30 Bb	f(x) = 0.016x + 0.15	0,98
CC	0,30	0,42	0,79	0,50 Aa	f(x) = 0.041x + 0.11	0,99
Med.	0,25	0,36	0,59	0,40		
E = 0,14 B						
10.P (mg kg-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	3,94	4,77	4,50	4,40	f(x) = 4.40	ns
CC	3,74	4,04	5,54	4,44	f(x) = 4.44	ns
Med.	3,84	4,40	5,02	4,42 A	f(x) = 0.095x + 3.53	0,97
E = 2,34 B						
11.H+Al						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	3,88	3,49	3,91	3,76	f(x) = 3.76	ns
CC	3,82	3,49	3,49	3,60	f(x) = 3.60	ns
Med.	3,85	3,49	3,70	3,68		
E = 3,82						
12.Ca (Cmolc kg-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	0,66	0,66 b	0,62 b	0,65	f(x) = 0.65	ns
CC	0,65	0,73 a	0,75 a	0,71	f(x) = 0.0074x + 0.64	0,76
Med.	0,65	0,69	0,69	0,68		
E = 0,66						

(Continua)

**Tabela 7.** Atributos químicos de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo)

(Conclusão)						
13.Mg (Cmolc kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>BC</b>	1,06	1,06	1,03	1,05	f(x) = 1.05	ns
<b>CC</b>	0,99	0,99	1,08	1,02	f(x) = 1.02	ns
<b>Med.</b>	1,03	1,02	1,05	1,03		
E = 1,04						
14.Al (Cmolc kg <sup>-1</sup> ) (SRH - Não normal!)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>BC</b>	0,22	0,20	0,16	0,19 aA	f(x) = -0.0055x + 0.24	0,99
<b>CC</b>	0,15	0,15	0,14	0,15 bB	f(x) = 0.15	ns
<b>Med.</b>	0,19	0,18	0,15	0,17		
E = 0,22    A						
18.COT (g kg <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>BC</b>	12,77	12,97	13,01	12,92	f(x) = 12.92	ns
<b>CC</b>	11,88	10,93	13,42	12,08	f(x) = 12.08	ns
<b>Med.</b>	12,33	11,95	13,21	12,50		
E = 11,87						

Para dados não normais, o método que substituiu o teste F (ANOVA) foi o Scheirer-Ray-Hare e a comparação múltipla entre as variáveis foi feita pelo teste de Dunnett, ambos ao nível de 5% de significância

#### 4.7 Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre os atributos microbianos de um Neossolo Regolítico cultivado com feijão

A adição do biochar permitiu uma maior quantidade de CBM nas doses 4 t ha<sup>-1</sup> (303,21 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) e 8 t ha<sup>-1</sup> (226,35 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) do CC e no tratamento com esterco (186,38 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>), apresentando diferença estatística (superior) em relação ao controle absoluto (65,48 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>). A maior dose dos biochars testada, 16 t ha<sup>-1</sup>, apresentou diferenças entre si, onde o CBM no solo com BC (222,95 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) foi superior ao solo com CC (76,41 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>) CBM (Tabela 8).

O N<sub>mic</sub> foi maior no tratamento que recebeu apenas esterco (94,14 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>), mostrando-se estatisticamente diferente dos solos que receberam os dois tipos de biochar (45,86 µg g<sup>-1</sup> solo<sup>-1</sup>). Tanto no experimento com milho quanto com feijão, o P<sub>mic</sub> foi superior no solo controle.

Os solos que receberam o biochar CC apresentaram maiores valores de RBS em todas as doses e na maior dose de BC, sendo superior à respiração encontrada no tratamento controle absoluto (13,93 mg.C-CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). A RBS dos solos que receberam 4 t ha<sup>-1</sup> e 8 t ha<sup>-1</sup> do CC (25,42 e 25,81 mg.C-CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) foram superiores a mesma dose do solo com BC (19,69 e

14,98 mg.C-CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). O qCO<sub>2</sub> calculado nos solos com adição de BC (11,73 mg.C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> C-mic.dia<sup>-1</sup>) diferiu estatisticamente do solo controle (35,59 mg.C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> C-mic.dia<sup>-1</sup>), que apresentou maior quociente metabólico.

**Tabela 8.** Carbono, nitrogênio e fósforo da biomassa microbiana (CBM, N<sub>mic</sub>, P<sub>mic</sub>), respiração basal do solo, (RBS) e quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo)

1.CBM (µg g <sup>-1</sup> solo-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	201,00	160,75	222,95 a	194,90	f(x) = 194.9	ns
CC	<b>303,21</b>	<b>226,35</b>	76,41 b	201,99	f(x) = -18.9x + 378.2	0,99
Med.	252,11	193,55	149,68	198,44		
	S = 65,48	E = <b>186,38</b>				
2.Nmic (µg g <sup>-1</sup> solo-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	40,85	30,74	68,04	46,54	f(x) = 46.54	ns
CC	13,28	91,94	30,33	45,18	f(x) = 45.18	ns
Med.	27,06	61,34	49,18	45,86 B		
	S = 50,25	E = 94,14	A			
4.Pmic (µg g <sup>-1</sup> solo-1)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	<b>5,02</b>	<b>3,07</b>	<b>1,52</b>	3,20	f(x) = 3.20	ns
CC	<b>2,87</b>	<b>2,82</b>	<b>2,75</b>	2,81	f(x) = 2.81	ns
Med.	3,95	2,94	2,14	3,01		
	S = 10,88	E = 3,21				
5.RBS (mg.C-CO <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	19,69 b	14,98 b	<b>34,03</b>	22,90	f(x) = 1.36x + 10.17	0,70
CC	<b>25,42</b> a	<b>25,81</b> a	<b>29,11</b>	26,78	f(x) = 26.78	ns
Med.	22,55	20,40	31,57	24,84		
	S = 13,93	E = 26,04				
6.qCO <sub>2</sub> (mg.C-CO <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> C-mic.dia <sup>-1</sup> ) (SRH - Não normal!)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	7,97	9,71	17,51	<b>11,73</b>	f(x) = 0.82x + 4.1	0,97
CC	8,62	11,41	33,19	17,74	f(x) = 2.14x - 2.27	0,94
Med.	8,29	10,56	25,35	14,74		
	S = 38,59	E = 14,42				

Para dados não normais, o método que substituem o teste F (ANOVA) foi o Scheirer-Ray-Hare e a comparação múltipla entre as variáveis foi feita pelo teste de Dunnett, ambos ao nível de 5% de significância



#### 4.8 Impacto do biochar provenientes de resíduos de café sobre a abundância de bactérias totais, diazotróficas e fungos totais de um Neossolo Regolítico cultivado com feijão

A adição de biochar aos solos não exerceu influência sobre a abundância dos genes 16S rRNA, 18S rRNA e *nifH*, avaliados no presente trabalho. Desta forma nenhum dos tratamentos, incluindo o solo controle e tratado com esterco, apresentaram diferença estatística entre si. Mas é possível perceber que para o gene 16S rRNA e 18S rRNA, os solos controle e com adição de esterco apresentaram o maior número de cópias dos genes em questão. Em relação ao gene *nifH* os solos controle e com esterco também apresentaram o maior número de cópias, sendo inferior apenas a dose 16 t ha<sup>-1</sup> de BC.

**Tabela 9.** Análise de variância da abundância de genes em solo cultivado com plântulas de feijão (variedade BRS estilo)

15. Log. nº de cópias do gene 16S (SRH - Não normal!)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	8,56	8,60	8,58	8,58	f(x) = 8.58	ns
CC	8,77	9,22	7,97	8,65	f(x) = 8.65	ns
Med.	8,66	8,91	8,28	8,62		
S = 9,04      E = 9,41						
16. Log. nº de cópias do gene 18S (SRH - Não normal!)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	6,98	7,26	6,89	7,04	f(x) = 7.04	ns
CC	7,26	7,19	6,68	7,05	f(x) = 7.05	ns
Med.	7,12	7,23	6,78	7,04	f(x) = -0.031x + 7.34	0,70
S = 7,82      E = 7,58						
17. Log. nº de cópias do gene <i>nifH</i> (SRH - Não normal!)						
	4 t ha <sup>-1</sup>	8 t ha <sup>-1</sup>	16 t ha <sup>-1</sup>	Med.	Modelo (x em t ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
BC	4,92	5,69	6,80	5,80	f(x) = 5.8	ns
CC	5,38	5,76	5,07	5,40	f(x) = 5.4	ns
Med.	5,15	5,72	5,93	5,60		
S = 6,65      E = 6,24						

Para dados não normais, o método que substituem o teste F (ANOVA) foi o Scheirer-Ray-Hare e a comparação múltipla entre as variáveis foi feita pelo teste de Dunnett, ambos ao nível de 5% de significância

#### **4.9 Distribuição dos tratamentos levando em consideração a estrutura das comunidades microbianas em solos cultivados com feijão sob aplicação de doses crescentes de biochar**

##### **-Bactérias totais**

O perfil da comunidade de bactérias totais apresentou nível de estresse de 0,08, indicando que houve a formação de grupos bem separados (Figura 10). A partir da análise de NMDS observou-se que os tratamentos se agruparam da mesma forma que no experimento com milho, sendo, portanto, essa separação do gene 16S rRNA independente da cultura teste e muito sensível ao biochar e doses aplicadas.

A ANOSIM (Apêndice D) foi aplicada para complementar a NMDS apresentando R global de 0,494, indicando que houve uma separação com sobreposição e grupos claramente diferenciados entre os tratamentos. Desta forma, os resultados mostraram a formação de grupos bem separados na maioria dos tratamentos: solo, solo+esterco; solo, dose 4t BC; solo+esterco, dose 16t BC; solo+esterco, dose 4t CC; solo+esterco, dose 8t CC; dose 4t BC, dose 4t CC; dose 4t BC, dose 8t CC; dose 8t BC, dose 16t BC; dose 8t BC, dose 4t CC; dose 8t BC, dose 8t CC. Em relação aos demais tratamentos houve a formação de grupos pouco separados e grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados.

##### **-Fungos totais**

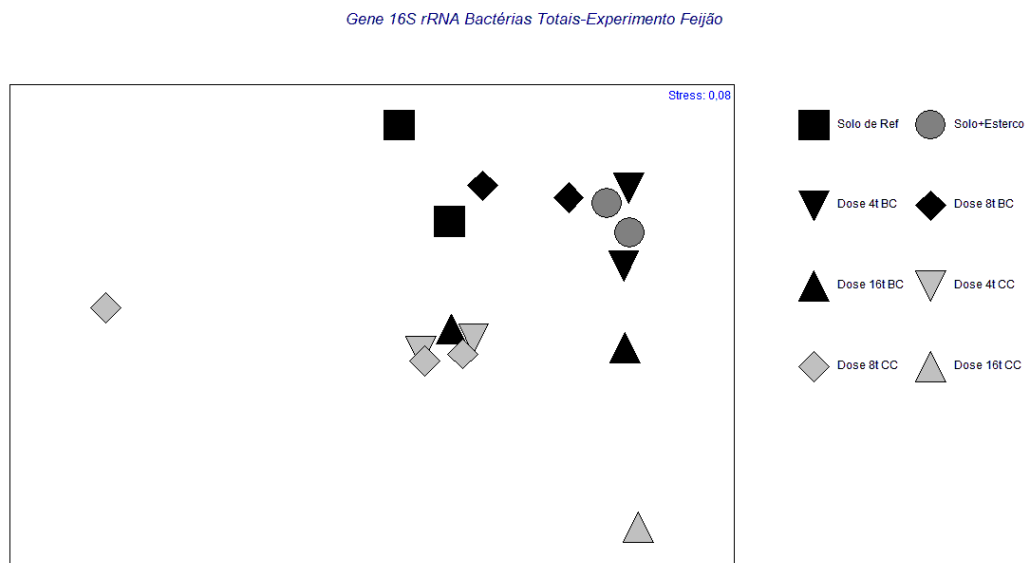
Para o gene 18S rRNA correspondente a comunidade de fungos totais, o nível de *estresse* aplicado foi de 0,13, o que indicou uma boa separação, mas com sobreposição entre os grupos formados. A NMDS (Figura 11) mostrou que, embora os grupos não tenham separado bem, devido a sobreposição, é possível perceber que as menores doses de biochar agrupam-se com o solo de referência e as maiores com o solo+esterco.

O teste de *Pairwise* (Apêndice E) apresentou R global de 0,429 mostrando que a interação entre os tratamentos promoveu a formação de grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados e grupos pouco separados na maior parte das amostras, sendo apenas oito grupos considerados bem separados (solo, dose 16t BC; solo, dose 16t CC; solo+esterco, dose 16t BC; solo+esterco, dose 16t CC; dose 4t BC, dose 16t CC; dose 8t BC, dose 16t BC; dose 8t BC, dose 4t CC; dose 8t BC, dose 16t CC) dentro do mesmo experimento.

## - Diazotróficos

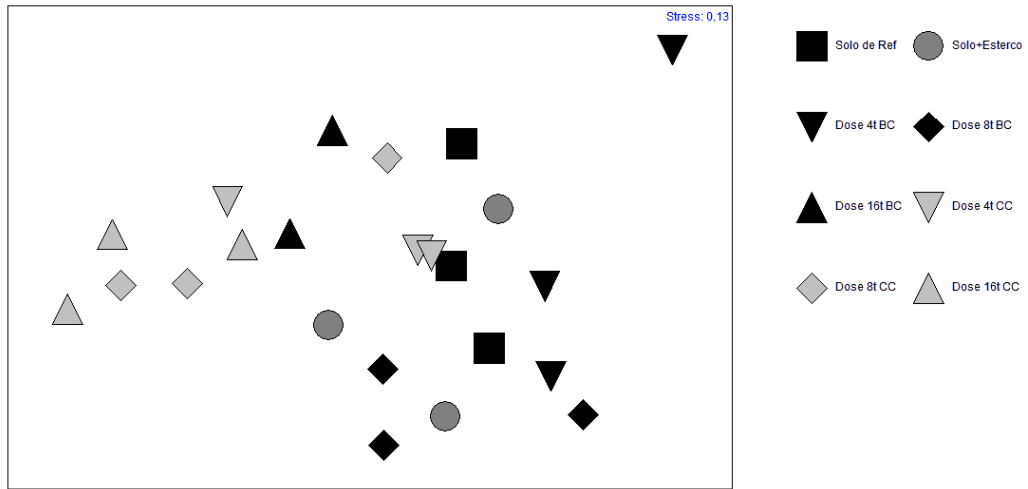
A comunidade de diazotróficos foi avaliada a partir do gene *nifH* e assim como no experimento com milho, apresentou nível de estresse de 0,1, o que indica uma representação bidimensional válida e ideal para formação de grupos bem separados e distintos. A análise de NMDS (Figura 12) mostrou o mesmo comportamento das amostras em relação ao experimento do milho, revelando que não houve influência das culturas utilizadas como teste na estrutura da comunidade de diazotróficos.

Para complementar a NMDS o teste de *Pairwise* (Apêndice F) foi aplicado mostrando um R global de 0,731 e a formação de grupos bem separados na maioria dos tratamentos, sendo oito com sobreposição, mas claramente distintos (solo, dose 4t BC; solo+esterco, dose 4t BC; dose 4t BC, dose 8t BC; dose 4t BC, dose 8t CC; dose 16t BC, dose 8t CC; dose 16t BC, dose 16t CC; dose 4t CC, dose 8t CC; dose 8t CC, dose 16t CC) e apenas três considerado pouco separado (solo, solo+esterco; dose 8t BC, dose 8t CC; dose 16t BC, dose 4t CC).



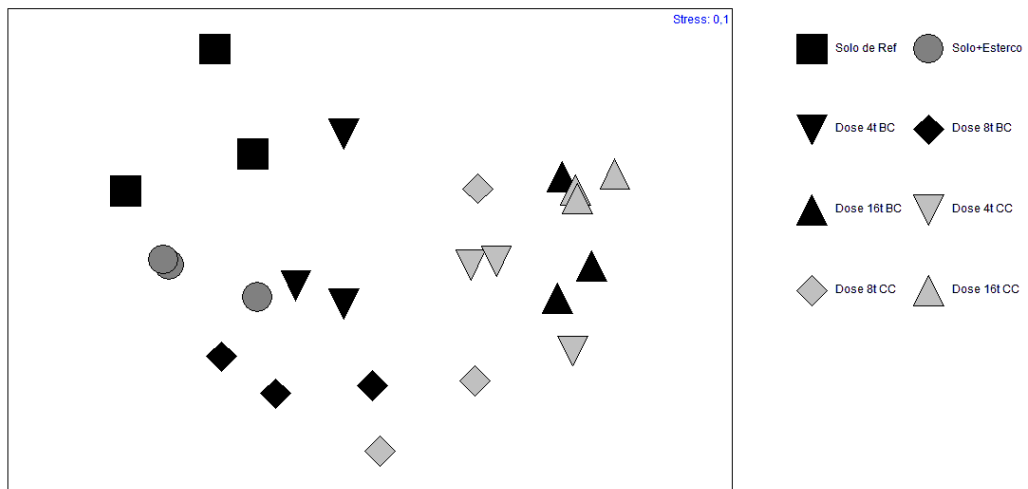
**Figura 10.** Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de bactérias totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo)

Gene 18S rRNA Fungos Totais-Experimento Feijão



**Figura 11.** Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de Fungos totais, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo)

Gene nifH-Experimento Feijão



**Figura 12.** Escala multidimensional (NMDS) dos perfis de diazotróficos, obtida após DGGE, de um Neossolo Regolítico que recebeu diferentes doses de biochar provenientes de borra de café (BC) e casca de café (CC) e cultivado com feijão (variedade BRS estilo)

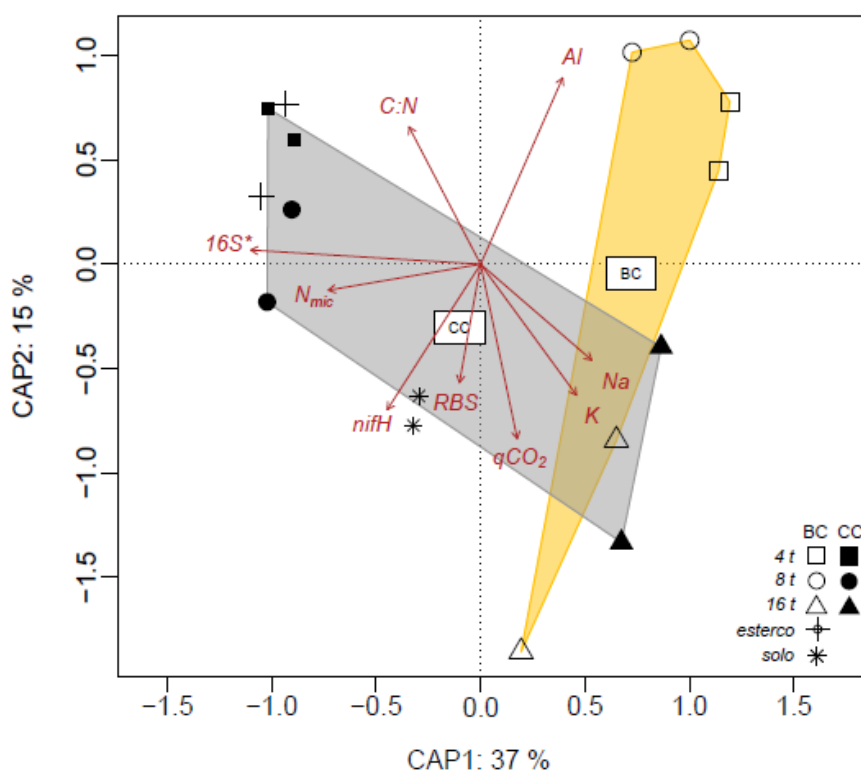
#### **4.10 Análise canônica de coordenadas principais (CAP), HeatMap, correlação entre os atributos químicos do solo e as comunidades microbianas em solos tratados com biochar de café sob cultivado de feijão**

A análise canônica de coordenadas principais (Figura 13) explicou 52 % da variação total dos vetores (variáveis) não sobrepostos e correlacionados a matriz de distância do DGGE para o gene 16S rRNA. Essa análise demonstrou um forte distanciamento entre estrutura das comunidades bacterianas de solos com 16 t ha<sup>-1</sup> de biochar e os demais tratamentos, independentemente do tipo. Na dose maior, o biochar demonstrou forte influência sobre as comunidades bacterianas em solos cultivados com feijão, principalmente devido aos incrementos nos teores de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e do qCO<sub>2</sub>. Neste caso, essas variáveis se correlacionaram negativamente com o número de cópias do gene 16S rRNA, sendo a variável mais significativa detectada pela CAP. O gene 16S rRNA foi mais detectado em solos com esterco e biochar de casca de café até 8 t ha<sup>-1</sup>, sendo as condições mais favoráveis também para o crescimento de organismos mais dependentes de N<sub>org</sub>. A comunidade bacteriana dos solos controle (sem biochar) mostrou maior correlação com o número de cópias do gene *nifH* e com a respiração basal microbiana (RBS), ambos se distanciando dos teores de Al<sup>+3</sup> do solo. Esse elemento também se destacou por sua relação próxima com as comunidades bacterianas de solos tratados com biochar de borra de café até as 8 t ha<sup>-1</sup>.

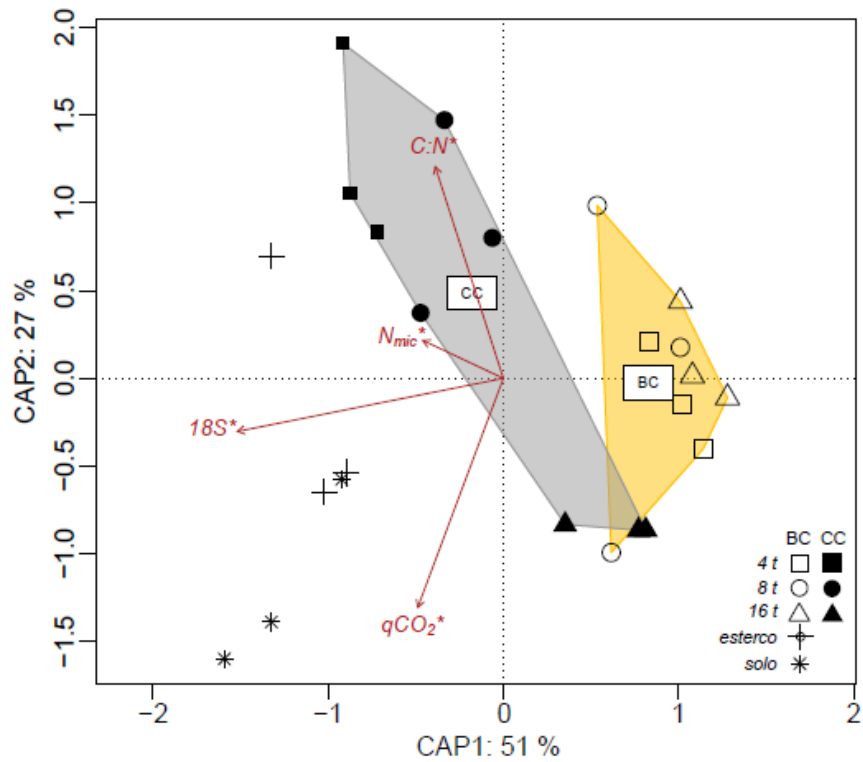
Já o para o gene 18S rRNA a análise canônica de coordenadas principais (Figura 14) explicou 78 % da variação total dos vetores (variáveis) não sobrepostos e correlacionados a matriz de distância do DGGE. As comunidades fúngicas dos solos com biochars de casca e borra de café se distanciaram entre si, apresentando poucas sobreposições, e se afastaram também dos tratamentos controle e do solo com esterco. Estes dois últimos tratamentos foram mais favoráveis ao número de cópias dos genes 18S rRNA e ao qCO<sub>2</sub>, variáveis menos expressas pelas comunidades fúngicas em solos tratados com borra de café, independentemente da dosagem. Os solos com biochar de casca de café com 8 t ha<sup>-1</sup> e, principalmente, 4 t ha<sup>-1</sup> demonstram comunidades de fungos significativamente associadas com uma maior relação C:N. Embora menos intenso, porém também significativo, os teores de N<sub>mic</sub> demonstraram uma maior aproximação com as comunidades de fungos crescidas no solo cultivado com feijão tratado com 4 t ha<sup>-1</sup> de CC.

Em relação ao gene *nifH*, a análise canônica de coordenadas principais (Figura 15) explicou 67 % da variação dos vetores (variáveis) não sobrepostos e correlacionados a matriz de distância do DGGE. Neste caso, o número de cópias do gene *nifH* não foi uma variável

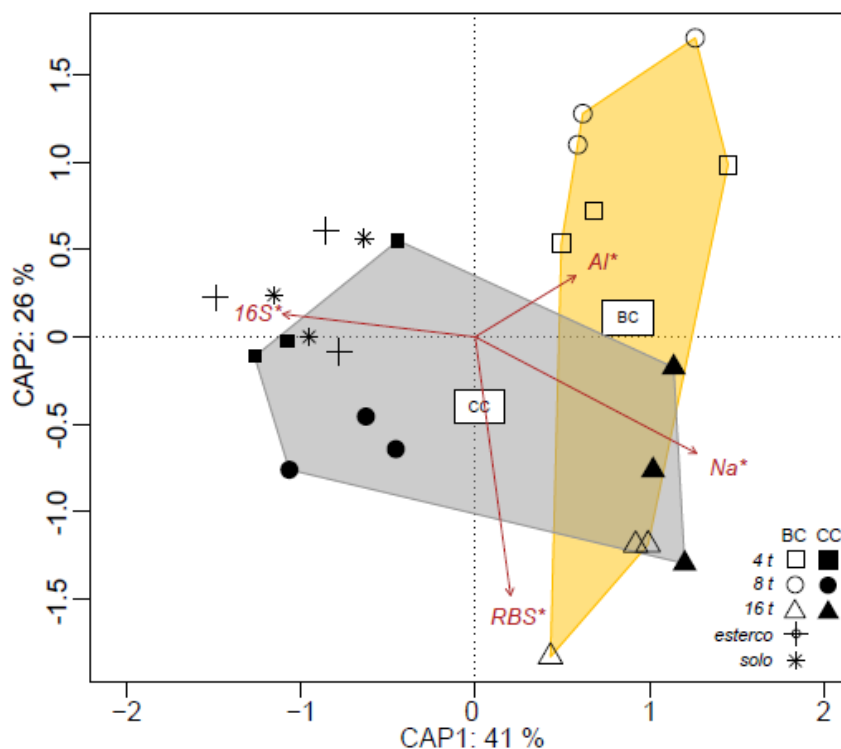
relevante para a construção de um modelo multivariado explicativo da mudança das comunidades microbianas que expressam esse gene no solo. Desta forma, de todas as variáveis estudadas apenas quatro foram necessárias para explicar a não expressão gênica na estrutura da comunidade de diazotróficos. O gene 16S rRNA, teve uma forte influência na estruturação dessas comunidades, onde o solo controle, o tratamento com esterco e as menores doses do biochar da casca correlacionaram-se com o respectivo gene, mostrando que bactérias são as principais representantes dos organismos possuidores do gene *nifH* nos solos estudados. As maiores doses dos biochars correlacionaram-se com a RBS e  $\text{Na}^+$ , enquanto as menores doses do biochar da borra de café correlacionaram-se com o alumínio.



**Figura 13** Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades bacterianas e as características bioquímicas de solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $\rho < 0,05$ )



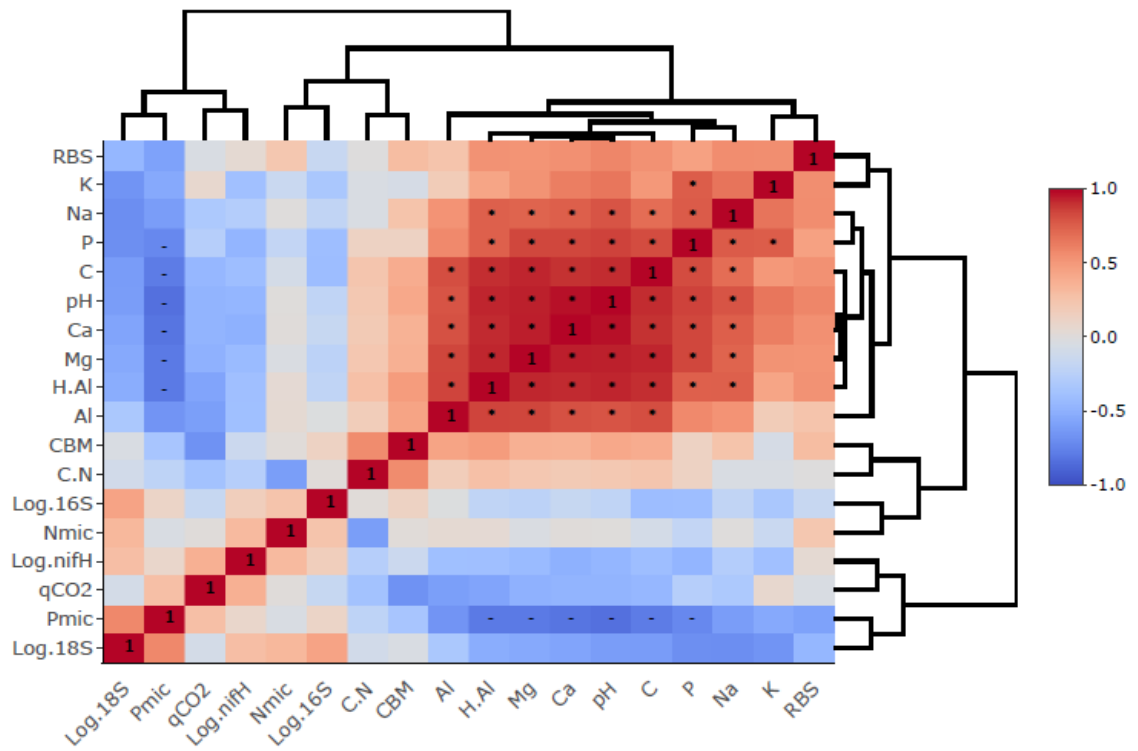
**Figura 14.** Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades fúngicas (B) e as características bioquímicas de solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $p < 0,05$ )



**Figura 15.** Análise canônica de coordenadas principais (CAP) entre as estruturas das comunidades diazotróficas e as características bioquímicas de solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo) submetidos a diferentes dosagens de substratos. As variáveis redundantes foram removidas gerando modelos simplificados para realização da ANOVA multivariada com base na estatística do “pseudo-F”, apenas os vetores com asterisco foram significativos ( $p < 0,05$ )

A análise de heatmap (Figura 16) evidenciou correlações lineares significativas ( $p < 0,05$ ) que foram detectadas entre as variáveis, principalmente as positivas entre C, pH, Ca, Mg e H+Al que se correlacionaram com o maior número de variáveis (Al, H+Al, Mg, Ca, pH, C, P e Na) do solo. Os resultados mostraram que a diminuição do Pmic foi acompanhada pelo aumento de alguns atributos químicos do solo, como pH, C, P, Ca, Mg, H+Al, pois apresentou correlação negativa com todos esses atributos químicos.





**Figura 16.** Análise de heatmap mostrando correlações entre as variáveis analisadas nos solos cultivados com feijão (variedade BRS estilo). Os polígonos com asteriscos (\*) e traços (-) evidenciam, respectivamente, as correlações positivas e negativas significativas ( $\rho < 0.05$ ) com módulos maiores do que 0.7, de acordo com a estatística baseada no coeficiente de correlação produto-momento de Pearson ( $r$ ) seguindo a distribuição t

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Influência do biochar nos atributos químicos do solo

A incorporação do biochar de café ao solo promoveu um aumento significativo no pH e atributos químicos do solo. Isso pode ser explicado pela temperatura utilizada na pirólise, que é considerada um fator determinante para o aumento do pH do solo. O aumento da CTC dos solos em ambos os experimentos, pode ser relacionado a elevada área de superfície específica dos biochars, isso porque a superfície específica do biochar da casca de café e da borra de café são  $244 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e  $23,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. O fato do biocarvão elevar o pH do solo justifica os baixos valores de alumínio, encontrados tanto nos solos cultivados com milho quando com feijão, evitando a toxicidade provocada pela presença desse elemento em elevadas quantidades no solo (PENG et al., 2011; ZWIETEN et al., 2010). Além disso, os altos teores dos elementos químicos determinados nos biochars antes da implantação dos experimentos, comprovam que, após os solos receberem as doses de biochar, o produto serve como fonte para os microorganismos presentes no solo facilitando assim a ciclagem e solubilização de nutrientes (LIU et al., 2017).

Após a adição dos biochars de café, a fertilidade dos solos melhorou com aumento significativo dos principais cátions e nutrientes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , C, N, P, C:N). De acordo com Uzoma et al. (2011) e Lima et al. (2018) os solos tratados com biochar apresentam melhora nos teores de C, P e relação C:N, tendo seu teor de N reduzido. A relação C:N apresentou valores superiores em ambos os experimentos, assim como o carbono no experimento com milho. Esses aumentos podem ser justificados pela adição do biochar de café, levando em consideração a temperatura de pirólise, tipo de matéria prima utilizada na produção e elevado conteúdo de carbono existente no produto pirolisado, que neste caso foi de 68,81% no biochar BC e 67,11% no biochar CC, demonstrando assim, que ambos os biochars são uma excelente fonte de carbono (LIMA et al., 2018; SUN et al., 2014; WU et al., 2012).

No presente trabalho, o biochar afetou as propriedades químicas do solo em ambos os experimentos, mas não exerceu influência sobre o conteúdo de magnésio. Apenas no experimento com feijão, após a incorporação das doses  $8 \text{ t ha}^{-1}$  e  $16 \text{ t ha}^{-1}$ , houve um aumento significativo no teor de cálcio, influenciado pela adição do biochar da casca de café, corroborando com Laird et al. (2010) que em seu experimento utilizou biochar de madeira em

doses crescentes e esterco verificando que as propriedades químicas e fertilidade do solo foram melhoradas, mas o teor de magnésio não foi influenciado pelo biocarvão.

## **5.2 Efeitos da aplicação de biochar ao solo na biomassa microbiana**

O solo é considerado o habitat de inúmeros de micro-organismos que desempenham diferentes funções contribuindo para o funcionamento dos ecossistemas e tem a capacidade de adaptar-se facilmente as condições do ambiente, através de mecanismos desenvolvidos ao longo do tempo e interações com outros organismos (NUNAN, 2017). Entretanto, ao adicionar biochar aos solos, ocorrem mudanças em suas propriedades físicas e químicas que refletem na dinâmica das comunidades microbianas (LIU et al., 2017).

Nos experimentos com milho e feijão do presente trabalho, houve um aumento no carbono da biomassa microbiana e redução do quociente metabólico, sendo consistente com o relato de Zhou et al. (2017), que em uma meta-análise utilizou dados de diferentes trabalhos com adição de biochar levando em consideração tipo de resíduo, temperatura de pirólise, tipo e condições do solo utilizados nos experimentos. E a partir disso pôde concluir que os solos tratados com biochar apresentaram maiores teores de CBM, enquanto o  $qCO_2$  foi reduzido. Esse relato reafirma a importância do biochar para o carbono no solo e atividade microbiana.

Zheng et al. (2016), em seu estudo com aplicação de biochar da palha de trigo em duas doses (20 e 40 t ha<sup>-1</sup>) no cultivo de arroz também relataram um aumento no CBM após a adição de biochar ao solo em suas maiores doses, em comparação ao controle e um decréscimo no quociente metabólico ( $qCO_2$ ), esses dados ajustam-se com o presente trabalho. Além disso, a adição de biochar promove um aumento na relação C:N favorecendo o aumento do CBM (AMELOOT et al., 2014), assim como ocorreu no experimento com milho e feijão após a incorporação do biochar de café.

A incorporação de biochar da casca de café na menor dose (4 t ha<sup>-1</sup>) nos experimentos com milho e feijão contribuiu para o aumento do CBM e relação C:N e a maior dose (16 t ha<sup>-1</sup>) reduziu o teor dessas variáveis, assim como, o  $N_{mic}$  no experimento com milho não foi influenciado por nenhum dos tratamentos. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Dempster et al. (2012), que avaliaram a influência da incorporação de biochar na atividade microbiana de solos arenosos. Enquanto isso, o nitrogênio da biomassa não apresentou alterações após a incorporação do biocarvão ao solo. Essas variações na biomassa microbiana podem ser explicadas pelo tipo de solo utilizado no experimento, tipo e taxa de aplicação do biochar (ZHANG et al., 2014; ZHU et al., 2017).

Os ciclos biogeoquímicos são bastante influenciados pela biota do solo, desta forma, a adição de biochar em diferentes ambientes afeta a ciclagem de nutrientes através das modificações que o produto pirolisado causa no solo. Dentre essas modificações, pH, umidade e teor de nutrientes presente no substrato são as mais evidentes (GUL; WHALEN, 2015; NGUYEN et al., 2017). Em ambos os experimentos, a adição do biochar de café mostrou-se mais eficiente na disponibilidade de nutrientes quando comparado aos solos tratados apenas com esterco, isso pode ser justificado pelo pH (5,02 – 6,36) que variou dentro da faixa considerada como ótima para a disponibilidade, principalmente, dos macronutrientes. No presente estudo, foram utilizados dois tipos diferentes de matéria prima, a borra, que já passou por um processo industrial de produção e de utilização para a produção do café, e a casca de café que é um resíduo inicial na produção do café e que não passa por tantos processos como o outro, o que explica tal variação na eficiência e disponibilidade de nutrientes. Uma vez que, em ambos os experimentos, os solos tratados com biochar da casca de café, apresentaram maior influência no aumento do teor de nutrientes. De acordo com Ronsse et al. (2013) a incorporação de biochar produzido a partir de diferentes resíduos apresentou variações no pH do solo, apoiando os resultados do presente trabalho, tendo em vista que os biochars foram produzidos a partir de diferentes fontes apresentando também variação no pH do solo 45 dias após a aplicação dos biochars nos solos cultivados com milho e feijão.

A incorporação de biochar ao solo facilita a mineralização de nutrientes como nitrogênio, carbono e fósforo (CASTALDI et al., 2011). O tamanho das partículas do biocarvão influenciam na mineralização do produto, onde partículas mais finas são mineralizadas mais rapidamente do que as partículas grossas. Os biochars produzidos a partir de matéria-prima rica em lignina e compostos complexos tendem a ser de difícil mineralização. O biochar da casca do café, provavelmente, tem um teor mais elevado de lignina uma vez que não foi processado como a borra de café. Embora a borra seja uma fonte de ataque mais rápido para os micro-organismos, a casca pode ser considerada uma fonte mais eficiente na mineralização de nutrientes ao longo do tempo. Além disso, quanto mais elevada a temperatura de pirólise do biochar, menor é a quantidade de elementos prontamente disponíveis (AMELOOT et al., 2013). Os biochars obtidos através da pirólise lenta de resíduos de café, foram feitos numa temperatura de 530 °C, considerada intermediária (LIMA et al., 2018). No experimento de Ronsse et al. (2013), ao utilizar diferentes tipos de matéria prima (madeira, palha de trigo e algas secas) e realizar a pirólise do biochar entre 300-750 °C, observou mudanças nos valores de pH de acordo com o tipo de resíduo utilizado para produção do biochar e temperatura de conversão

termoquímica, reafirmando a hipótese de que a temperatura de pirólise é um forte fator influenciador das mudanças na quantidade de elementos prontamente disponíveis.

Neste sentido, o  $P_{mic}$  no solo também pode atuar como fonte e dreno de P, disponibilizando o nutriente para as plantas. O aumento do  $P_{mic}$  pode ser relacionado as propriedades do biochar que após ser incorporado ao solo melhoram o ambiente para a colonização de micro-organismos (ZHAI et al., 2015). No entanto, para os experimentos com milho e feijão houve um aumento no teor de fósforo disponível, sendo o fósforo da biomassa microbiana reduzido pela adição de biochar em ambos os experimentos.

Após a incorporação de biochar ao solo, trabalhos tem relatado um aumento na liberação de C na forma de  $CO_2$  e isso pode variar de acordo com a matéria-prima utilizada na sua produção, com a porosidade e área de superfície específica (BRUUN et al., 2014; CZEKAŁA et al., 2016; SIGUA et al., 2014). Nos biochars utilizados nos experimentos, a área de superfície específica foi estudada por Lima et al. (2018) que mostraram que o biochar BC tinha uma área de superfície específica de  $23,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e o CC de  $244 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Levando em consideração a influência da porosidade do biochar na atividade microbiana, um estudo realizado por Dempster et al. (2012) em um solo arenoso, mostrou que o biocarvão não exerceu influência sobre a respiração basal do solo, esses dados contrastam com o presente trabalho, uma vez que após a adição de biochar da borra de café, a RBS foi superior no experimento com milho.

Belyaeva e Haynes (2012) em um experimento utilizando diferentes fontes de matéria orgânica, como por exemplo, esterco e biochar constatou que o carbono e o nitrogênio da biomassa aumentaram nos tratamentos com biochar em comparação ao controle sem apresentar diferença estatística significativa. Enquanto o esterco mostrou-se eficiente no aumento da biomassa microbiana e respiração basal do solo (RBS). Além disso, o controle apresentou maior quociente metabólico, assim como verificado no experimento com feijão. Esse aumento na RBS pode ser consequência do aumento na disponibilidade de nutrientes e pH conforme verificado no experimento sob cultivo de milho e feijão.

### **5.3 Impacto do biochar na estrutura e abundância das comunidades microbianas do solo**

As técnicas moleculares como PCR-DGGE e qPCR têm sido aplicadas afim de facilitar o acesso aos micro-organismos não cultiváveis, reduzir o tempo de espera (necessário para o crescimento em meio de cultura) e o entendimento de como as comunidades de Bactérias, Fungos e Archaeas respondem a mudanças ambientais, tais como: adição de fertilizantes

minerais, adição de biochar, rotação de culturas, mudanças no uso da terra, condições extremas etc (CENCIAN et al., 2009; FRACETTO et al., 2013; OTERO 2014; SUN et al., 2017). Os trabalhos têm demonstrado que, a adição de biochar ao solo favorece mudanças na estrutura das comunidades e aumento na abundância do número de genes de bactérias, fungos e diazotróficos, confirmando que a porosidade do produto serve como habitat e esconderijo para esses grupos de micro-organismos contra predadores (CHEN et al., 2013; HARTER et al., 2014; LU et al., 2015; XU et al., 2016).

A adição de biochar em diferentes doses apresenta um impacto benéfico no manejo agrícola do solo a partir do estímulo da fixação biológica de nitrogênio. E isso foi comprovado através do aumento na abundância de genes *nifH* no presente trabalho. Esse fato pode ser atribuído ao conteúdo de carbono presente no biocarvão e a relação C:N (DUCEY et al., 2013; HARTER et al., 2014). A abundância de genes *nifH* em um Neossolo Regolítico, utilizado no presente trabalho, sob cultivo de milho aumentou com a adição de biochar de café, mas no experimento com feijão a abundância do respectivo gene não foi influenciada pela adição de biochar. Quanto a estrutura da comunidade de diazotróficos em ambos os experimentos foi possível verificar a influência do tipo de biochar e doses aplicadas a partir dos grupos formados. Essa variação na abundância de genes pode ser devido à compostos liberados pela raiz de diferentes culturas, alterações no pH do solo, disponibilidade de nutrientes e capacidade de adesão das células microbianas, desta forma, a adição de biochar, pode beneficiar alguns tipos específicos de micro-organismos (LEHMANN et al., 2011).

A adição de biochar aos solos sob cultivo de milho e feijão influenciaram as comunidades de bactérias totais mostrando a formação de grupos separados, agrupando-se de acordo com o tratamento e doses. Mas não houve influência do biocarvão sob a abundância do gene 16S rRNA em ambos os experimentos. Esses resultados contrastam com outros trabalhos (CHEN et al., 2013; DUCEY et al., 2013), que tem demonstrado um aumento na abundância de genes bacterianos após a adição de biochar ao solo, isso porque, o biocarvão pode ser considerado como fonte de carbono prontamente disponível para os micro-organismos. Além disso, a porosidade do biochar contribui para a retenção de água, aumento da atividade de água e conseqüentemente maior atividade biológica (LI-LI; ZHE-KE; HUI-MIN, 2017; LU et al., 2015).

Após a incorporação de biochar ao solo, alguns trabalhos relataram que a comunidade de fungos não se mostrou muito afetada pela adição do produto, não houve mudança na estrutura da comunidade (LIN-LIN et al., 2017; CHEN et al., 2016). Chen et al. (2013) relataram que, após a adição de biochar ao solo, as comunidades fúngicas sofrem alterações na

sua estrutura, ocorrendo também um aumento na diversidade. No presente estudo, a incorporação de biochar não exerceu influência na abundância de genes 18S rRNA no experimento com feijão. Já no experimento com milho a dose 16 t ha<sup>-1</sup> de BC apresentou maior número de cópias de que CC, enquanto o menor número de cópias foi observado nos solos tratados com esterco quando comparados ao tratamento controle. Isso pode ser explicado por uma comunidade pré-estabelecida no solo utilizado como referência. Em relação a estrutura das comunidades, mesmo havendo sobreposição no experimento com feijão é possível perceber uma separação de grupos de acordo com o tipo de biochar e dose. Observando os grupos formados após a separação dos grupos de acordo com o tipo e dose de biochar, é possível concluir que o biochar da casca de café exerceu maior influência sobre a estrutura das comunidades de fungos totais, tanto no experimento com feijão, quanto com milho. Esse fato pode ser justificado, levando em consideração a porosidade do produto e a composição da matéria-prima utilizada na produção do biochar, uma vez que os fungos têm a capacidade de degradar matérias mais recalcitrantes (DAI et al., 2017; GUL et al.; 2015; JINDO et al., 2012).

Lehmann et al. (2011), demonstraram que as bactérias respondem mais rápido as mudanças de pH, enquanto os fungos podem se mostrar inertes, pois toleram uma ampla faixa de pH, não sendo afetados pelas mudanças que o biochar exerce no solo. Desta forma, o pH do biochar pode exercer grande influência sobre a abundância das comunidades microbianas no solo, confirmando os relatos do presente trabalho, em que os solos cultivados com milho e feijão, o pH dos biochars utilizados nos experimentos oriundo de BC foi inicialmente de 9,65 e o de CC foi de 10,31. Após a adição de biochar aos solos, BC (menor pH) exerceu influencia (aumentou) sob a abundância de dizotróficos, enquanto CC (maior pH) reduziu a abundância do respectivo gene no experimento com milho, tendo em vista que foi avaliado o pH do conjunto solo e biochar, houve o benefício dos diazotróficos por BC devido a proximidade de seu pH (5,27) com a faixa considerada como ótima (5,5 – 6,0) para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio.

Huang et al. (2017) demonstraram que após a adição de biochar ao solo em doses crescentes, as comunidades microbianas mostraram-se influenciadas pela menor dose (aumentando a abundância de genes) e na maior dose ocorreu um decréscimo. Esse relato confirma que as doses de biochar aplicadas ao solo podem ser um fator determinante para a comunidade microbiana. Alguns compostos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos – HAPs, fenóis, benzenos, entre outros, encontrados na matéria-prima pirolisada podem apresentar níveis tóxicos para as comunidades microbianas, inibindo seu desenvolvimento ou

suprimindo suas funções. Esses compostos estão presentes principalmente em biochars onde a temperatura de pirólise foi considerada moderada (300 e 400 ° C) Zhu et al. (2017).

## 6. CONCLUSÕES

Os biochars derivados da borra e casca de café influenciam nos atributos químicos de solos arenosos cultivados com milho e feijão;

As comunidades de fungos nos solos cultivados com milho são beneficiadas quando se utiliza biochar da borra de café, favorecendo a biomassa microbiana e influenciando nos indicadores biológicos dos Neossolos Regolíticos;

O biochar atua na abundância dos micro-organismos presentes em solos cultivados com milho e feijão, sem causar possíveis estresses metabólicos, sendo ideal para os atributos biológicos dos Neossolos Regolíticos;

Nos solos cultivados com feijão, os micro-organismos provavelmente utilizam mecanismos biológicos que independem do biochar para o metabolismo microbiano;

O biochar de café, em solos cultivados com milho e feijão, foi capaz de estruturar as comunidades de bactérias totais, fungos totais e diazotróficos de acordo com suas respectivas doses;

Pela análise canônica de coordenadas principais, foi possível revelar a interação entre a estrutura das comunidades microbianas com os nutrientes inorgânicos, relação C:N, pH e mudanças nas características metabólicas.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.; RAJAPAKSHA, A. U.; LIM, J. E; ZHANG, M.; BOLAN, N.; MOHAN, D.; VITHANAGE, M.; LEE, S. S. OK, Y. S. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. **Chemosphere**, Oxford, v. 99, p. 19-33, 2014.
- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant Soil**, Crawley, v. 387, p. 307-321, 2015.
- AMELOOT, N.; GRABER, E. R.; VERHEIJEN, F. G A.; DENEVE, S.; Interactions between biochar stability and soil organisms: review and research needs. **European Journal of Soil Science**, Aberystwyth, v. 64, p. 379-390, 2013.
- AMELOOT, N.; SLEUTEL, S.; CASE, S. D. C.; ALBERTI, G.; McNAMARA, N. P.; ZAVALLONI, C.; VERVISH, B.; VEDOVE, G. D.; NEVE, S. C mineralization and microbial activity in four biochar field experiments several years after incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 78, p. 196-203, 2014.
- ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 5, p. 1121-1132, 2003.
- 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 - International Journal of Soil Biology**, Jena, v. 54, p. 309-320, 2011.
- ARAÚJO FILHO, J. C.; Relação solo e paisagem no Bioma Caatinga. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA FÍSICA APLICADA, 14., 2011, Dourados. **Artigo em anais de congresso (ALICE)**. "Dinâmicas socioambientais das inter-relações às interdependência". Dourados: UFGD, 2011. p. 24.
- ARIF, M.; ILYAS, M.; RIAZ, M.; ALI, K.; SHAH, K.; HAQ, I. U.; SHAH FAHAD, S. Biochar improves phosphorus use efficiency of organic-inorganic fertilizers, maize-wheat productivity and soil quality in a low fertility alkaline soil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 214, p. 25-37, 2017.
- AZEEM, M.; HAYAT, R.; HUSSAIN, Q.; AHMED, M.; PAN, G.; TAHIR, M. I.; IMRAN, M.; IRFAN, M.; HASSAN, M. Biochar improves soil quality and N<sub>2</sub>-fixation and reduces net ecosystem CO<sub>2</sub> exchange in a dryland legume-cereal cropping system. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 186, p. 172-182, 2019.
- BAGINSKY, C.; BRITO, B.; SCHERSON, R.; PERTUZÉ, R.; SEGUEL, O.; CAÑETE, A.; ARANEDA, C.; JOHNSON, W. E. Genetic diversity of *Rhizobium* from nodulating beans grown in a variety of Mediterranean climate soils of Chile. **Archives of Microbiology**, Braunschweig, v. 197, p. 419-429, 2015.

BANERJEE, S.; KIRKBY, C. A.; SCHMUTTER, D.; BISSETT, A., KIRKEGAARD, J. A.; RICHARDSON, A. E. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 97, p. 188-198, 2016.

BARROW, C. J. Biochar: Potential for countering land degradation and for improving agriculture. **Applied Geography**, Oxford, v. 34, p. 21-28, 2012.

BELYAEVA, O. N.; HAYNES, R. J. Comparison of the effects of conventional organic amendments and biochar on the chemical, physical and microbial properties of coal fly ash as a plant growth médium. **Environmental Earth Sciences**, New York, v. 66, p. 1987-1997, 2012.

BENEVIDES, C. D. J.; SOUZA, R. D. B.; SOUZA, M.; SILVA, M. Efeito do processamento sobre os teores de oxalato e tanino em maxixe (*Cucumis anguria* L.), JILÓ (*Solanum gilo*), feijão verde (*Vigna unguiculata* (L.) E feijão andu (*Cajanus cajan* (L.) Mill SP). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 24, p. 328, 2013.

BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; GIARDINI, A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; SANTILOCCHI, R.; ZEULI, P. S.; GIOIA, T.; LOGOZZO, G.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, Hoboken, v. 197, p. 3003-313, 2012.

BRESSAN, M.; GATTIN, I.T.; DESAIRE, S.; CASTEL, L.; GANGNEUX, C.; LAVAL, K. A rapid flow cytometry method to assess bacterial abundance in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 88, p. 60–68, 2015.

BRIGIDE, P.; ATAIDE, T. D. R.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; BAPTISTA, A. S.; ABDALLA, A. L.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; SANTANA, A. E. Iron bioavailability of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) intrinsically labeled with <sup>59</sup>Fe. **Journal of trace elements in medicine and biology**, Jena, v. 28, p. 260-265, 2014.

BRUUN, S.; CLAUSON-KAAS, S.; BOBULSKÁ, L.; THOMSEN, I. K. Carbon dioxide emissions from biochar in soil: role of clay, microorganisms and carbonates. **Environmental Earth Sciences**, New York, v. 65, p. 52-59, 2014.

CANTRELL, K. B.; HUNT, P. G.; UCHIMIY, M.; NOVAK, J. M.; RO, K. S. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 107, p. 419-428, 2012.

CARMO, D. A. B.; VAL, B. H. P. Classificação dos Neossolos e Nitossolos quanto a natureza física, químicas e morfológicas. **Fazu em revista**, Uberaba, n.10, p. 17-26, 2013.

CASTALDELLI, G.; COLOMBANI, N.; SOANA, E.; VINCENZI, F.; FANO, E. A. MASTROCICCO, M. Reactive nitrogen losses via denitrification assessed in saturated agricultural soils. **Geoderma**, Amsterdam, v. 337, p. 91-98, 2019.

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**, Oxford, v. 85, p. 1464-1471, 2011.

CENCIANI, K.; LAMBAIS, M. R.; CERRI, C. C.; AZEVEDO, L. C. B.; FEIGI, B. J. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 907-916, 2009.

CHA, J. S.; PARK, S. H.; JUNG, S. C.; RYU, C.; JEON, J. K.; SHIN, M. C.; PARK, Y. K. Production and utilization of biochar: a review. **Journal of industrial and Engineering Chemistry**, New York, v. 40, p. 1-15, 2016.

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**, Amsterdam, v. 71, p. 33-44, 2013.

CHEN, J.; SUN, X.; LI, L.; LIU, X.; ZHANG, B.; ZHENG, J.; PAN, G. Change in active microbial community structure, abundance and carbon cycling in an acid rice paddy soil with the addition of biochar. **European Journal of Soil Science**, Aberystwyth, v. 67, p. 857-867, 2016.

CHEN, X.; CHEN, G.; CHEN, L.; CHEN, Y.; LEHMANN, J.; MCBRIDE, M. B.; HAY, A. G. Adsorption of copper and zinc by biochars produced from pyrolysis of hardwood and corn straw in aqueous solution. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, p. 8877-8884, 2011.

CHERKASOV, N.; IBHADON, A. O.; FITZPATRICK, P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. **Chemical Engineering and Processing**. Lausanne, v. 90, p. 24-33, 2015.

CHINTALA, R.; SCHUMACHER, T. E.; KUMAR, S.; MALO, D. D.; RICE, J. A.; BLEAKLEY, B; CHILOM, G.; CLAY, D. E.; JULSOND, J. L.; PAPIERNIK, S. K.; GU, Z. R. Molecular characterization of biochars and their influence on microbiological properties of soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 279, p. 244-256, 2014.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Austral Ecology**, Hoboken, v. 18, p. 117-143. 1993.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER v5.2.9**: user manual/tutorial, Primer-E. Plymouth UK. 2001.

COLE, E. J.; ZANDVAKILI, O. R.; BLANCHARD, J.; XING, B.; HASHEMI, M.; ETEMADI, F. Investigating responses of soil bacterial community composition to hardwood biochar amendment using high-throughput PCR sequencing. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, in press, 2018.

CORNELISSEN, G.; MARTINSEN, V.; SHITUMBANUMA, V.; ALLING, V.; BREEDVELD, G. D.; RUTHERFORD, D. W.; SPARREVIK, M.; HALE, S. E.; OBIA, A.; MULDER, J. Biochar Effect on Maize Yield and Soil Characteristics in Five Conservation Farming Sites in Zambia. **Agronomy**, Madison, v. 3 p. 256-274, 2013.

COSTA, M. S.; COSTA, Z. V. B.; ALVES, S. M. C.; NETO, M. F.; MARINHO, M. J. C. Avaliação nutricional do milho cultivado com diferentes doses de efluente doméstico tratado. **Irriga**, Botucatu, v. 1, p. 12- 26, 2012.

CZEKAŁA W.; MALINSKA, K.; CÁCERES, R.; JANCZAK, D.; DACH, J.; LEWICKI, A. Co-composting of poultry manure mixtures amended with biochar – The effect of biochar on temperature and C-CO<sub>2</sub> emission. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 200, p. 921-927, 2016.

DADALTO, J. P.; FERNNADES, H. C.; TEIXEIRA, M. M.; CECON, P. R.; MATOS, A. T. Sistema de preparo do solo e influência na atividade microbiana. **Revista Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 506-513, 2015.

DAI, Z.; BARBERÁN, A.; LI, Y.; BROOKES, P. C.; XU, J. Bacterial Community Composition Associated with Pyrogenic Organic Matter (Biochar) Varies with Pyrolysis Temperature and Colonization Environment. **American Society for Microbiology Journals**, Urbana-Champaign, v. 2, 2017.

DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 103, p. 80-100, 2014.

DEENIK, J. L.; COONEY, M. J. The Potential Benefits and Limitations of Corn Cob and Sewage Sludge Biochars in an Infertile Oxisol. **Sustainability**, Basileia, v. 8, p. 131-148, 2016.

DEMIATE, I. M.; FIGUEROA, A. M.; GUIDOLIN, M. E. B. Z.; SANTOS, T. P. R.; YANGCHENG, H.; CHANG, F.; JANE, J. L. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 61, p. 812-820, 2016.

DEMISIE, W.; LIUA, Z.; ZHANG, M. Effect of biochar on carbon fractions and enzyme activity of red soil. **Catena**, Amsterdam, v. 121, p. 214-221, 2014.

DEMPSTER, D. N.; GLEESON, D. B.; SOLAIMAN, Z. M.; JONES, D. L.; MURPHY, D. V. Decreased soil microbial biomass and nitrogen mineralisation with Eucalyptus biochar addition to a coarse textured soil. **Plant Soil**, Crawley, v. 354, p. 311-324, 2012.

DIAS, B. O.; SILVA, C. A.; HIGASHIKAWA, F. S.; ROIG, A.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: Effect on organic matter degradation and humification. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 1239–1246, 2010.

DOMENE, X.; MATTANA, S.; HANLEY, K.; ENDERS, A.; LEHMANN, J. Medium-term effects of corn biochar addition on soil biota activities and functions in a temperate soil cropped to corn. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 72, p. 152-162, 2014.

DUCEY, T. F.; IPPOLITO, J. A.; CANTRELL, K. B.; NOVAK, J. M.; LENTZ, R. D. Addition of activated switchgrass biochar to an aridic subsoil increases microbial nitrogen cycling gene abundances. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 65-72, 2013.

DUKU, M. H.; GU, S.; HAGAN, E. B. Biochar production potential in Ghana—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford v. 15, p. 3539–3551, 2011.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 2º Ed., p. 627, 2009.

EVANGELHO, J. A.; VANIER, N. L.; PINTO, V. Z.; BERRIOS, J. J.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, Oxford, v. 214, p. 460-467, 2017.

FARHANGI-ABRIZA, S.; TORABIAN, S. Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 137, p. 64-70, 2017.

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4117-4120, 2005.

FRACETTO, G. G. M.; AZEVEDO, L. C. B.; FRACETTO, F. J. C.; ANDREOTE, F. D.; LAMBAIS, M. R.; PFENNING, L. H. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. **Scientia Agricola**, Cerqueira César, v. 70, n. 2, p. 59-67, 2013.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C.; SILVA, A.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, Recife, v. 8, n. 1, p. 585-597, 2015.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. **Molecular Ecology**, Malden, v. 2, p. 113-118, 1993.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 54-63, 2014.

GEISSELER, D.; LINQUIST, B. A.; LAZICKI, P. A. Effect of fertilization on soil microorganisms in paddy rice systems - A meta-analysis. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 115, p. 452-460, 2017.

GOMES, S. B. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; BIONDI, C. M. Produtividade e composição mineral de plantas de milho em solo adubado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 5, p.459–465, 2007.

GONZAGA, M. I. S.; MACKOWIAK, C.; ALMEIDA, A. Q.; JUNIOR, J. I. T. C.; ANDRADE, K. R. Positive and negative effects of biochar from coconut husks, orange bagasse and pine wood chips on maize (*Zea mays* L.) growth and nutrition. **Catena**, Amsterdam, v. 162, p. 414-420, 2018.

GUL, S.; WHALEN, J. K.; THOMAS, B. W.; SACHDEVA, V.; DENG, H. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Nanning, v. 206, p. 49-59, 2015.

HARTER, J.; KRAUSE, H.; SCHUETTLER, S.; RUSER, R.; FROMME, M.; SCHOLTEN, T.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Linking N<sub>2</sub>O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. **ISME Journal**, Londres, v. 8, p. 660–674, 2014.

HARTER J.; WEIGOLD, P.; EL-HADIDI, M.; HUSON, D. H.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Soil biochar amendment shapes the composition of N<sub>2</sub>O-reducing microbial communities. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 562, p. 379-390, 2016.

HE, L. L.; ZHONG, Z. K.; YANG, H. M. Effects on soil quality of biochar and straw amendment in conjunction with chemical fertilizers. **Journal of Integrative Agriculture**, Oxford, v. 16, p. 704-712, 2017.

HEINEMANN, A. B.; RAMIREZ-VILLEGAS, J.; SOUZA, T. L. P. O.; DIDONET, A. D.; STEFANO, J. G.; BOOTE, K. J.; JARVIS, A. Drought impact on rainfed common bean production areas in Brazil. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 225, p. 57-74, 2016.

HEINEMANN, A. B.; RAMIREZ-VILLEGAS, J.; STONE, L. F.; DIDONET, A. D. Climate change determined drought stress profiles in rainfed common bean production systems in Brazil. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam v. 246, p. 64-77, 2017.

HELFRICH, M.; LUDWIG, B.; THOMS, C.; GLEIXNER, G.; FLESSA, H. The role of soil fungi and bacteria in plant litter decomposition and macroaggregate formation determined using phospholipid fatty acids. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 96, p. 261-264, 2015.

HERATH, H. M. S. K.; CAMPS-ARBESTAIN, M.; HEDLEY, M. Effect of biochar on soil physical properties in two contrasting soils: An Alfisol and an Andisol. **Geoderma**, Amsterdam, v. 209-210, p. 188-197, 2013.

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 878-887, 2010.

HUANG, D.; LIU, L.; ZENG, G.; XU, P.; HUANG, C.; DENG, L.; WAN, J. The effects of rice straw biochar on indigenous microbial community and enzymes activity in heavy metal-contaminated sediment. **Chemosphere**, Oxford, v. 174, p. 545-553, 2017.

HUNG, C. Y.; TSAI, W. T.; CHEN, J. W.; LIN, Y. Q.; CHANG, Y. M. Characterization of biochar prepared from biogas digestate. **Waste Management**, Oxford, v. 66, p. 53-60, 2017.

- JINDO, K.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C.; FURUKAWA, T.; MATSUMOTO, K.; SONOKI, T.; BASTIDA, F. Biochar influences the microbial community structure during manure composting with agricultural wastes. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 416, p. 476-481, 2012.
- KAHR, G., MADSEN, F. T. Determination of the cation exchange capacity and surface area of bentonite, illite and kaolinite by methylene blue adsorption. **Applied Clay Science**, Amsterdam, n. 9, p. 327-336, 1995.
- KEUTER, A.; VELDKAMP, E.; CORRE, M. D.; Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 70, p. 38-46, 2014.
- KHORRAM, M. S.; ZHANG, Q.; LIN, D.; ZHENG, Y.; FANG, H.; YU, Y. Biochar: A review of its impact on pesticide behavior in soil environments and its potential applications. **Journal of Environmental Sciences**, Pequim, v. 44, p. 269-279, 2017.
- KUYPERS, M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 16, p. 263- 276, 2018.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 83, p. 184-199, 2015.
- LAIRD, D. A.; FLEMING, P.; DAVIS, D. D.; HORTON, R.; WANG, B.; KARLEN, D. L.; Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 158, p. 443-440, 2010.
- LEE, Y.; PARK, J.; RYU, C.; GANG, K. S.; YANG, W.; PARK, Y.; JUNG, J.; HYUN, S. Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500 °C. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 148, p. 196-201, 2013.
- LEE, J.; KIM, K.; KWON, E. E. Biochar as a Catalyst. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 77, p. 70-79, 2017.
- LEHMANN, J.; GAUNT, J.; RONDON, M. Biochar sequestration in terrestrial ecosystems- a review. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Dordrecht, v. 11, p. 403-427, 2006.
- 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**, Oxford, v. 43, p. 1812-1836, 2011.
- LI, H.; DONG, X.; SILVA, E. B.; OLIVEIRA, L. M.; CHEN, Y. MA, L. Q. Mechanisms of metal sorption by biochars: Biochar characteristics and modifications. **Chemosphere**, Oxford, v. 178, p. 466-478, 2017.
- LI, H.; SHANG, J.; AI, Z.; ZHANG, L. Efficient Visible Light Nitrogen Fixation with BiOBr Nanosheets of Oxygen Vacancies on the Exposed {001} Facets. **Jornal of the American Chemical Society**, New York, v. 137, p. 6393-6399, 2015.

LI-LI, H.; ZHE-KE, Z.; HUI-MIN, Y. Effects on soil quality of biochar and straw amendment in conjunction with chemical fertilizers. **Journal of Integrative Agriculture**, Oxford, v. 16(3), p. 704-712, 2017.

LIMA, J. R. S.; SILVA, W. M.; MEDEIROS, E. V.; DUDA, G. P.; CORRÊA, M. M.; FILHO, A. P. M.; CLERMONT-DAUPHIN, C.; ANTONINO, A. C. D.; HAMMECHER, C. Effect of biochar on physicochemical properties of a sandy soil and maize growth in a greenhouse experiment. **Geoderma**, Amsterdam, v. 319, p. 14-23, 2018.

LIMA, R. P.; ROLIM, M. M.; DANTAS, M. S. M.; COSTAS, A. R. F. C.; DUARTE, A. S.; SILVA, A. R. Atributos químicos de um Neossolo Regolítico distrófico em função das doses e tempos de aplicação de vinhaça. **Revista Agro@ambiente**, v. 7, n. 3, p. 262-268, 2013.

LIMA, S. L.; TAMIOZZO, S.; PALOMINO, E. C. Interactions of biochar and organic compound for seedlings production of *Magonia pubescens* A. St.-Hil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 04, p.655-661, 2015.

LIN-LIN, J.; GUANG-MING, H.; YU, L.; SAI-NAN, L.; JI-PING, G.; XU, Y.; JUN, M.; WEN-FU, C. Corn cob biochar increases soil culturable bacterial abundance without enhancing their capacities in utilizing carbon sources in Biolog Eco-plates. **Journal of Integrative Agriculture**, Oxford, v. 16(3), p. 713-724, 2017.

LIU, S.; MENG, J.; JIANG, L.; YANG, X. LAN, Y.; CHENG, X.; CHEN, W. Rice husk biochar impacts soil phosphorous availability, phosphatase activities and bacterial community characteristics in three different soil types. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 116, p. 12-22, 2017.

LIU, Z.; DUGAN, B.; MASIELLO, C. A.; BARNES, R. T.; GALLAGHER, M. E.; GONNERMANN, H. Impacts of biochar concentration and particle size on hydraulic conductivity and DOC leaching of biochar–sand mixtures. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 533, p. 461-472, 2016.

LLORACH-MASSANA, P.; LOPEZ-CAPEL, E., PEÑA, J.; RIERADEVALL, J.; MONTERO, J. I.; PUY, N. Technical feasibility and carbon footprint of biochar co-production with tomato plant residue. **Waste Management**, Oxford, v. 67, p. 1-10, 2017.

LLORET, E.; PASCUAL, J. A.; BRODIE, E. L.; BOUSKILL, N. J.; INSAM, H.; JUÁREZ, M. F.; GOBERNA, M. Sewage sludge addition modifies soil microbial communities and plant performance depending on the sludge stabilization process. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 101, p. 37-46, 2016.

LOPES, J. F.; COELHO, F. C.; RABELLO, W. S.; RANGEL, O. J. P.; GRAVINA, G. A.; VIEIRA, H. D. Produtividade e composição mineral do feijão em resposta às adubações com molibdênio e níquel. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, p. 419-426, 2016.

LU, H.; LASHARI, M. S.; LIU, X.; JI, H.; LI, L.; ZHENG, J.; KIBUE, G. W.; JOSEPH, S.; PAN, G. Changes in soil microbial community structure and enzyme activity with amendment of biochar-manure compost and pyroligneous solution in a saline soil from Central China. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 70, p. 67-76, 2015.



LUZARDO-OCAMPO, I.; CAMPOS-VEGA, R.; GAYTÁN-MARTÍNEZ, M.; PRECIADO-ORTIZ, R.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during in vitro gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. **Food Research International**, Campinas, v. 100, p. 304-311, 2017.

MAHYARUDIN; RUSMANA, I.; LESTARI, Y. Metagenomic of Actinomycetes Based on 16S rRNA and *nifH* Genes in Soil and Roots of Four Indonesian Rice Cultivars Using PCR-DGGE. **HAYATI Journal of Biosciences**, Bogor, v. 22, p. 113-121, 2015.

MANTOVIA, P.; BALDONI, G.; TODERI, G. Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. **Water Research**, Oxford, v. 39, p. 289-296, 2005.

MARCHETTI, M. M.; BARP, E. A.; Efeito rizosfera: A importância de bactérias microorganismos diazotróficos para o solo/planta – revisão. **Ignis: Periódico Científico de Arquitetura e Urbanismo, Engenharias e Tecnologia da Informação**, Caçador, v. 4, n. 1, p. 61-71, 2015.

MEDEIROS, R. F.; PEREIRA, W. E.; RODRIGUES, R. M.; NASCIMENTO, R.; SUASSUNA J. F.; DANTAS, T. A. G. Growth and yield of strawberry plants fertilized with nitrogen and phosphorus. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 9, p. 865-870, 2015.

MEIER, S.; CURAQUEO, G.; KHAN, N.; BOLAN, N.; RILLING, J.; VIDAL, C.; FERNÁNDEZ, N.; ACUÑA, J.; DONZÁLEZ, M.; CORNEJO, P.; BORIE, F. Effects of biochar on copper immobilization and soil microbial communities in a metal-contaminated soil. **Journal of Soils and Sediments**, Haren, v. 17, p. 1237-1250, 2017.

MELO, F. P., ALMEIDA, J. P. Análise das feições geomorfológicas e dos processos morfodinâmicos do sítio urbano de Garanhuns-PE. **Revista Ambivalências**, São Cristóvão, v. 1, p. 103-114, 2013.

MÉNDEZ, A.; GÓMEZ, A.; PAZ-FERREIRO, J.; GASCÓ, G. Effects of sewage sludge biochar on plant metal availability after application to a Mediterranean soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 89, p. 1354-1359, 2012.

MÉNDEZ, A.; TERRADILLOS, M.; GASCÓ, G. Physicochemical and agronomic properties of biochar from sewage sludge pyrolysed at different temperatures. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 102, p.124–130, 2013.

MENDONÇA, E. S.; MATOS, E. S. **Matéria Orgânica do Solo: Métodos de Análises**. Viçosa, UFV, p. 49-52, 2005.

MENDONÇA, E. S.; MATOS, E. S. **Matéria Orgânica do Solo: Métodos de Análises**. Viçosa, UFV, 2ª Ed., p. 154-169, 2017.

MENEZES, R. S. C; SILVA, T. O. Mudanças na fertilidade de um Neossolo Regolítico após seis anos de adubação orgânica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 3, p. 251-257, 2008.

MIA, S.; DIJKSTRA, F. A.; SINGH, B.; Enhanced biological nitrogen fixation and competitive advantage of legumes in mixed pastures diminish with biochar aging. **Plant Soil**, Crawley, v. 424, p. 639-651, 2018.

MITCHELL, P. J.; SIMPSON, A. J.; SOONG, R.; SIMPSON, M. J. Shifts in microbial community and water-extractable organic matter composition with biochar amendment in a temperate forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 81, p. 244-254, 2015.

MONDAL, S.; SINGH, R. D.; PATRA, A. K.; DWIVEDI, B. S. Changes in soil quality in response to short-term application of municipal sewage sludge in a typical haplustept under cowpea-wheat cropping system. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, Miami, v. 4, p. 37-41, 2015.

MORAES, M. C. H. S.; MEDEIROS, E. V.; ANDRADE, D. S.; LIMA, L. D.; SANTOS, I. C. S.; MARTINS FILHO, A. P. Microbial biomass and enzymatic activities in sandy soil cultivated with lettuce inoculated with plant growth promoters. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 860-870, 2018.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for rRNA 16S. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NARZARI, R.; BORDOLOI, N.; SARMA, B.; GOGOI, L.; GOGOI, N.; BORKOTOKI, B.; KATAKI, R. Fabrication of biochars obtained from valorization of biowaste and evaluation of its physicochemical properties. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 242, p. 324-328, 2017.

NASCIMENTO, C. W. A.; BARROS, D. A. S.; MELO, E. E. C.; OLIVEIRA, A. B. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p.385-392, 2004.

NASCIMENTO, A. L.; SAMPAIO, R. A.; CRUZ, S. F.; ZUBA JUNIO, G. R.; BARBOSA, C. F.; FERNANDES, L. A. Metais pesados em girassol adubado com lodo de esgoto submetido a diferentes processos de estabilização. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 7, p.694–699, 2014.

NGUYEN, T. T. N.; XU, C.; TAHMASBIAN, I.; CHE, R.; XU, Z.; ZHOU, X.; WALLACE, H. M.; BAI, S. H. Effects of biochar on soil available inorganic nitrogen: A review and meta-analysis. **Geoderma**, Amsterdam, v. 288, p. 79-96, 2017.

NUNAM N. The microbial habitat in soil: Scale, heterogeneity and functional consequences. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 180, p. 425-429, 2017.

OJEDA, G.; MATTANA, S.; ÀVILA, A.; ALCANIZ, J. M.; VOLKMANN, M.; BACHMANN, J. Are soil–water functions affected by biochar application? **Geoderma**, Amsterdam, v. 249-250, p. 1-11, 2015.

OLESZCZUK, P.; JOŚKO, I.; FUTA, B.; PASIECZNA-PATKOWSKA, S.; PAŁYS, E.; KRASKA, P. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 214, p. 10–18, 2014.

- ORTIZ, N.; ARMADA, E.; DUQUE, E.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 174, p. 87-96, 2015.
- OTERO, X. L.; LUCHETA, A. R.; FERREIRA, O. T.; HUERTA-DÍAZ, M. A.; LAMBAIS, M. R. Archaeal diversity and the extent of iron and manganese pyritization in sediments from a tropical mangrove creek (Cardoso Island, Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Norfolk, v. 146, p. 1-13, 2014.
- PANKIEVICZ, V. C. S.; AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, M. B. R.; SOUSA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, Oxford, v. 81, p. 907-919, 2015.
- PARK, J.; OK, Y. S.; KIM, S.; CHO, J.; HEO, J.; DELAUNE, R. D.; SEO, D. Competitive adsorption of heavy metals onto sesame straw biochar in aqueous solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 142, p. 77-83, 2016.
- PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. Molecular markers in phylogenetic studies-A review. **Phylogenetics & Evolutionary Biology**, Chicago, v. 2, p. 100-131, 2014.
- PENG, X.; YE, L. L.; WANG, C. H.; ZHOU, H.; SUN, B. Temperature- and duration-dependent rice straw-derived biochar: Characteristics and its effects on soil properties of an Ultisol in southern China. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 112, p. 159-166, 2011.
- PETROVIC, M.; SOSTARIC, T.; STOJANOVIC M.; MILOJKOVIC, J.; MIHAJLOVIC, M.; STANOJEVIC, M.; STANKOVIC, S. Removal of Pb<sup>2+</sup> ions by raw corn silk (*Zea mays* L.) as a novel biosorbent. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Taoyuan, v. 58, p. 407-416, 2016.
- POLESE, V.; SOARES, C. P.; SILVA, P. R. A.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I.; VIDAL, M. S. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR indicates that juice of sugarcane varieties modulate the expression of C metabolism genes in the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum rubrisubalbicans* strain HCC103. **Antonie van Leeuwenhoek**, Louvain-la-Neuve, v. 110, p. 1555-1568, 2017.
- POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 152, p. 95-103, 2001.
- PRAKONGKEP, N., GILKES, R. J., WIRIYAKITNATEEKUL, W. Forms and solubility of plant nutrient elements in tropical plant waste biochars. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 178, p. 732-740, 2015.
- PRANAGAL, J.; OLESZCZUK, P.; TOMASZEWSKA-KROJAŃSKA, D.; KRASKA, P.; RÓŻYŁO, K. Effect of biochar application on the physical properties of Haplic Podzol. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 174, p. 92-103, 2017.

PUGA, A. P.; ABREU, C. A.; MELO, L. C. A.; BEESLEY, L. Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. **Journal of Environmental Management**, Londres, v. 159, p. 86-93, 2015.

PURAKAYASTHA, T. J.; KUMARI, S.; PATHAK, H. Characterization, stability, and microbial effects of four biochars produced from crop residues. **Geoderma**, Amsterdam, v. 239–240, p. 293–303, 2015.

RASHID, M. I.; MUJAWAR, L. H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I. M. I.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 26-41, 2016.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E. S.; PASSAGLIA, L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p.924-927, 2005.

ROLEY, S. S.; XUE, C.; HAMILTON, S. K.; TIEDJE, J. M.; ROBERTSON, G. P. Isotopic evidence for episodic nitrogen fixation in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 129, p. 90-98, 2019.

RONDON, M. A.; LEHMANN, J.; RAMÍREZ, J.; HURTADO, M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 43, p. 699–708, 2007.

RONSSSE, F.; van HECKE, S.; DICKINSON, D.; PRINS, W. Production and characterization of slow pyrolysis biochar: influence of feedstock type and pyrolysis conditions. **Global Change Biology Bioenergy**, Hoboken, v. 5, p. 104-115, 2013.

ROUSK, K.; SORENSEN, P. L.; MICHELSEN, A. Nitrogen Transfer from Four Nitrogen-Fixer Associations to Plants and Soils. **Ecosystems**, Verona, v. 19, p. 1491-1504, 2016.

SANDHU, S. S.; USSIRI, D. A. N.; KUMAR, S.; CHINTALA, R.; PAPIERNIK, S. K.; MALO, D. D.; SCHUMACHER, T. E. Analyzing the impacts of three types of biochar on soil carbon fractions and physiochemical properties in a corn-soybean rotation. **Chemosphere**, Oxford, v. 184, p. 473-481, 2017.

SANTOS, J. C. B.; SOUZA JÚNIOR, V. S.; CORRÊA, M. M.; RIBEIRO, M. R.; ALMEIDA, M. C.; BORGES, L. E. P. Caracterização de Neossolos Regolíticos da Região Semiárida do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, nº 3, p. 683-695, 2012.

SANTOS, S. S.; NUNES, I.; NIELSEN, T. K.; JACQUIOD, S.; HANSEN, L. H.; WINDING, A. Soil DNA Extraction Procedure Influences Protist 18S rRNA Gene Community Profiling Outcome. **Protist**, Köln, v. 168, p. 283-293, 2017.

SAXENA, J.; RANA, G.; PANDEY, M. Impact of addition of biochar along with *Bacillus* sp. on growth and yield of French beans. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 162, p. 351-356, 2013.

- SCHEIFELE, M.; HOBI, A.; BUEGGER, F.; GATTINGER, A.; SCHULIN, R.; BOLLER, T.; MÄDER, P. Impact of pyrochar and hydrochar on soybean (*Glycine max* L.) root nodulation and biological nitrogen fixation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 180, p. 199-211, 2017.
- SIGUA, G. C.; NOVAK, J. M.; WATTS, D. W.; CANTRELL, K. B.; SHUMAKER, P. D.; SZÖGI, A. A.; JOHNSON, M. G. Carbon mineralization in two ultisols amended with different sources and particle sizes of pyrolyzed biochar. **Chemosphere**, Oxford, v. 103, p. 313-321, 2014.
- SILVA, R. A. B.; LIMA, J. R. S.; ANTONINO, A. C. D.; GONDIM, P. S. S.; SOUZA, E. S.; JÚNIOR, G. B. Balanço hídrico em Neossolo regolítico cultivado com braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, p. 147-157, 2014.
- SILVA, K. J.; VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M. R. Bacterial and Archaeal Communities in Bleached Mottles of Tropical Podzols. **Microbial Ecology**, New York, v. 69, p. 372-382, 2015.
- SILVA, J. J.; VIARO, H. P.; FERRANTI, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; FERREIRA, J. M.; RUAS, C. F.; ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in Southern Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 99, p. 160-167, 2017.
- SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A.K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. *Frankia* genus specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3278-3286, 1991.
- SINGH, C.; TIWARI, S.; GUPTA, V. K.; SINGH, J. S. The effect of rice husk biochar on soil nutrient status, microbial biomass and paddy productivity of nutrient poor agriculture soils. **Catena**, Amsterdam, v. 171, p. 485-493, 2018.
- SINGH, R. P.; ARAUJO, P. S. A. S. F.; IBRAHIM, M. H.; SULAIMAN, O. Management of urban solid waste: Vermicomposting a sustainable option. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 55, p. 719-729, 2011.
- SMEBYE, A.; ALLING, V.; VOGT R. D.; GADMAR, T. C.; MULDER, J.; CORNELISSEN, G.; HALE, S. E. Biochar amendment to soil changes dissolved organic matter content and composition. **Chemosphere**, Oxford, v. 142, p. 100-105, 2016.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; Van ELSAS, J. D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing cloned pcr-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614-2621. 1999.
- SOUZA, J.A.; BUZETTI, S.; TARSITANO, M. A. A.; VALDERRAMA, M. Corn costs and profitability as a function of source, rate and application time of nitrogen. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, p. 321-329, 2012.

SRINIVASAN, P.; SARMAH, A. K.; SMERNIK, R.; DAS, O.; FARID, M.; GAO, W. A feasibility study of agricultural and sewage biomass as biochar, bioenergy and biocomposite feedstock: Production, characterization and potential applications. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 512-513, p. 495–505, 2015.

SULIMAN, W.; HARSH, J. B.; ABU-LAIL, N. I.; FORTUNA, A.; DALLMEYER, I.; PROFESSOR, M. G. The role of biochar porosity and surface functionality in augmenting hydrologic properties of a sandy soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 574, p. 139-147, 2017.

SUN, Y.; GAO, B.; YAO, Y.; FANG, J.; ZHANG, M.; ZHOU, Y.; CHEN, H.; YANG, L. Effects of feedstock type, production method, and pyrolysis temperature on biochar and hydrochar properties. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 240, p. 574-578, 2014.

SUN, Z.; SÄNGER, A.; REBENSBURG, P.; LENTZSCH, P.; WIRTH, S.; KAUPENJOHANN, M. MEYER-AURICH, A. Contrasting effects of biochar on N<sub>2</sub>O emission and N uptake at different N fertilizer levels on a temperate sandy loam. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 578, p. 557-565, 2017.

TAN, X.; LIU, Y.; ZENG, G.; WANG, X.; HU, X.; GU, Y.; YANG, Z. Application of biochar for the removal of pollutants from aqueous solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 125, p. 70-85, 2015.

TAN, Z.; LIN, C. S.; JI, X.; RAINEY, T. J. Returning biochar to fields: A review. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 116, p. 1-11, 2017.

THIES, J. E.; RILLIG, M. C. Characteristics of biochar: biological properties. In: Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. **Earthscan**, Londres, pp. 183-205, 2009.

TSAI, W.; LIU, S.; HSIEH, C. Preparation and fuel properties of biochars from the pyrolysis of exhausted coffee residue. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 93, p. 63–67, 2012.

UZOMA, K. C.; INOUE, M.; ANDRY, H.; FUJIMAKI, H.; ZAHOOR, A.; NISHIHARA, E. Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. **Soil Use and Management**, Hoboken, v. 27, p. 205–212, 2011.

van ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 47, p. 77-87, 2011.

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

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 2, p. e57923, 2013.

VIEIRA, A. C.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P.; GUIMARÃES, M. C.; FREITAS, M. S.; PECORARO, D. Fogo e seus efeitos na qualidade do solo de pastagem. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 09, n. 06, p. 1703-1711, 2016.

WANG, H.; ZHENG, H.; JIANG, Z.; DAI, Y.; LIU, G.; CHEN, L.; WANG, Z. Efficacies of biochar and biochar-based amendment on vegetable yield and nitrogen utilization in four consecutive planting seasons. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 593, p. 124-133, 2017.

WANG Y.; YING, H.; YIN, Y.; ZHENG, H. CUI, Z. Estimating soil nitrate leaching of nitrogen fertilizer from global meta-analysis. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 657, p. 96-102, 2019.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WU, F.; JIA, Z.; WANG, S.; CHANG, S. X.; STARTSEV, A. Contrasting effects of wheat straw and its biochar on greenhouse gas emissions and enzyme activities in a Chernozemic soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 49, p. 555–565, 2013.

WU, L.; PENG, M.; QIAO, S.; MA, X.; Assessing impacts of rainfall intensity and slope on dissolved and adsorbed nitrogen loss under bare loessial soil by simulated rainfalls. **Catena**, Amsterdam, v. 170, p. 51-63, 2018.

WU, W.; YANG, M.; FENG, Q.; MCGROUTHER, K.; WANG, H.; LU, H.; CHEN, Y. Chemical characterization of rice straw-derived biochar for soil amendment. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 47, p. 268-276, 2012.

XU, N.; TAN, G.; WANG, H.; GAI, X. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 74, p. 1-8, 2016.

YANARDAĞ, I. H.; ZORNOZA, R.; BASTIDA, F.; BÜYÜKKILIÇ-YANARDAĞ, A.; GARCÍA, C.; FAZ, A.; MERMUT, A. R. Native soil organic matter conditions the response of microbial communities to organic inputs with different stability. **Geoderma**, Amsterdam, v. 295, p. 1-9, 2017.

YAO, Y.; GAO, B.; FANG, J.; ZHANG, M.; CHEN, H.; ZHOU, Y.; CREAMER, A. E.; SUN, Y.; YANG, L. Characterization and environmental applications of clay–biochar composites. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 242, p. 136-143, 2014.

YAO, Y.; HU, Y.; ZHU, Y.; GAO, Y.; REN, G. Comparisons of phaseolin type and  $\alpha$ -amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in China. **The Crop Journal**, Pequim, v. 4, p. 68-72, 2016.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Filadélfia, v. 19, p. 1467-1476, 1988.

YOSEPH, T.; SHANKO, S. Growth, symbiotic and yield response of N-fertilized and Rhizobium inoculated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **African Journal of Plant Science**, Konya, v. 11 (6), p. 197-202, 2017.

ZAGO, L. F.; LIMA, C. R.; CRUZ, R. M. S.; ALBERTON, O. Inoculação de diferentes doses de *Bradyrhizobium* por cobertura e seu efeito na cultura da soja. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 21, n. 2, p. 65-69, 2018.

ZHAI, L.; CAIJI, Z.; LIU, J.; WANG, H.; REN, T.; GAI, X.; XI, B.; LIU, H. Short-term effects of maize residue biochar on phosphorus availability in two soils with different phosphorus sorption capacities. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 51, p. 113-122, 2015.

ZHANG, J.; HUSSAIN, S.; ZHAO, F.; ZHU, L.; CAO, X.; YU, S.; JIN, Q. Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on nitrogen transformation and enzyme activity in the rice rhizosphere. **Journal of Soils and Sediments**, Haren, v. 18, p. 1453-1465, 2018.

ZHANG, Q.; DIJKSTRA, F. A.; LIU, X.; WANG, Y.; HUANG, J.; LU, N. Effects of Biochar on Soil Microbial Biomass after Four Years of Consecutive Application in the North China Plain. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, 2014.

ZHANG, Z.; ZHU, Z.; SHUEN, B.; LIU, L. Insights into Biochar and Hydrochar Production and Applications: A Review. **Energy**, Aalborg, in press, 2019.

ZHENG, A.; ZHANG, B.; ZHOU, L.; WANG, S. Application of radio frequency pasteurization to corn (*Zea mays* L.): Heating uniformity improvement and quality stability evaluation. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 68, p. 63-72, 2016.

ZHENG, J.; CHEN, J.; PAN, G.; LIU, X.; ZHANG, X.; LI, L.; BIAN, R.; CHENG, K.; ZHENG, J. Biochar decreased microbial metabolic quotient and shifted community composition four years after a single incorporation in a slightly acid rice paddy from southwest China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 571, p. 206-217, 2016.

ZHOU, H.; ZHANG, D.; WANG, P.; LIU, X.; CHENG, K.; LI, L.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; CROWLEY, D.; van ZWIETEN, L. PAN, G. Changes in microbial biomass and the metabolic quotient with biochar addition to agricultural soils: A Meta-analysis. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Nanning, v. 239, p. 80-89, 2017.

ZHU, X.; CHEN, B.; ZHU, L.; XING, B. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 277, p. 98-115, 2017.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZIMMER, S.; MESSMER, M.; HAASE, T.; PIEPHO, H. P.; MINDERMANN, A.; SCHULZ, H.; HABEKUß, A.; ORDON, F.; WILBOIS, K.; HEß, J. Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool



growing conditions in Germany. **European Journal of Agronomy**, Helsinki, v. 72, p. 38-46, 2016.

ZWIETEN, L.V.; ROSE, T.; HERRIDGE, D.; KIMBER, S.; RUST, J.; COWIE, A.; MORRIS, S. Enhanced biological N<sub>2</sub> fixation and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) in an acid soil following biochar addition: dissection of causal mechanisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 395, p. 7-20. 2015.

**APÊNDICE A** - Resultado do teste de *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 16S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com milho (variedade comercial 1058)

<b>Amostras</b>	<b>Teste <i>Pairwise</i></b>	<b>Nível de Significância (%)</b>
Solo, Solo+Esterco	0,593	10
Solo, Dose 4t BC	0,333	20
Solo, Dose 8t BC	0,315	20
Solo, Dose 16t BC	0,556	10
Solo, Dose 4t CC	0,556	10
Solo, Dose 8t CC	1	10
Solo, Dose 16t CC	0,593	10
Solo+Esterco, Dose 4t BC	0,444	10
Solo+Esterco, Dose 8t BC	0,074	30
Solo+Esterco, Dose 16t BC	0,556	10
Solo+Esterco, Dose 4t CC	0,556	10
Solo+Esterco, Dose 8t CC	1	10
Solo+Esterco, Dose 16t CC	0,556	10
Dose 4t BC, Dose 8t BC	0,148	30
Dose 4t BC, Dose 16t BC	0,556	10
Dose 4t BC, Dose 4t CC	0,556	10
Dose 4t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 4t BC, Dose 16t CC	0,556	10
Dose 8t BC, Dose 16t BC	0,185	40
Dose 8t BC, Dose 4t CC	-0,037	60
Dose 8t BC, Dose 8t CC	0,704	10
Dose 8t BC, Dose 16t CC	0,074	50
Dose 16t BC, Dose 4t CC	-0,148	70
Dose 16t BC, Dose 8t CC	0,315	10
Dose 16t BC, Dose 16t CC	-0,019	60
Dose 4t CC, Dose 8t CC	0,185	20
Dose 4t CC, Dose 16t CC	-0,111	60
Dose 8t CC, Dose 16t CC	0,167	20

**APÊNDICE B** - Resultado do teste de *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 18S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com milho (variedade comercial 1058)

<b>Amostras</b>	<b>Teste <i>Pairwise</i></b>	<b>Nível de Significância (%)</b>
Solo+Esterco, Dose 4t BC	0	100
Solo+Esterco, Dose 8t BC	0	100
Solo+Esterco, Dose 16t BC	1	10
Solo+Esterco, Dose 4t CC	0,833	10
Solo+Esterco, Dose 8t CC	1	10
Solo+Esterco, Dose 16t CC	1	10
Solo+Esterco, Solo	1	10
Dose 4t BC, Dose 8t BC	-0,037	100
Dose 4t BC, Dose 16t BC	1	10
Dose 4t BC, Dose 4t CC	0,889	10
Dose 4t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 4t BC, Dose 16t CC	1	10
Dose 4t BC, Solo	1	10
Dose 8t BC, Dose 16t BC	0,778	10
Dose 8t BC, Dose 4t CC	0,815	10
Dose 8t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 8t BC, Dose 16t CC	1	10
Dose 8t BC, Solo	1	10
Dose 16t BC, Dose 4t CC	0,852	10
Dose 16t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 16t BC, Dose 16t CC	1	10
Dose 16t BC, Solo	1	10
Dose 4t CC, Dose 8t CC	0,074	40
Dose 4t CC, Dose 16t CC	-0,148	100
Dose 4t CC, Solo	1	10
Dose 8t CC, Dose 16t CC	0,185	40
Dose 8t CC, Solo	1	10
Dose 16t CC, Solo	1	10

**APÊNDICE C** - Resultado do teste de *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene *nifH* (Micro-organismos diazotróficos) em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com milho (variedade comercial 1058)

<b>Amostras</b>	<b>Teste <i>Pairwise</i></b>	<b>Nível de Significância (%)</b>
Solo, Solo+Esterco	0,889	10
Solo, Dose 4t BC	0,667	10
Solo, Dose 8t BC	0,722	10
Solo, Dose 16t BC	1	10
Solo, Dose 4t CC	0,926	10
Solo, Dose 8t CC	1	10
Solo, Dose 16t CC	0,852	10
Solo+Esterco, Dose 4t BC	0,593	10
Solo+Esterco, Dose 8t BC	0,519	10
Solo+Esterco, Dose 16t BC	1	10
Solo+Esterco, Dose 4t CC	0,722	10
Solo+Esterco, Dose 8t CC	0,963	10
Solo+Esterco, Dose 16t CC	0,796	10
Dose 4t BC, Dose 8t BC	-0,093	100
Dose 4t BC, Dose 16t BC	1	10
Dose 4t BC, Dose 4t CC	0,889	10
Dose 4t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 4t BC, Dose 16t CC	0,778	10
Dose 8t BC, Dose 16t BC	1	10
Dose 8t BC, Dose 4t CC	0,889	10
Dose 8t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 8t BC, Dose 16t CC	0,778	10
Dose 16t BC, Dose 4t CC	0,519	10
Dose 16t BC, Dose 8t CC	1	10
Dose 16t BC, Dose 16t CC	0,87	10
Dose 4t CC, Dose 8t CC	0,556	10
Dose 4t CC, Dose 16t CC	0,481	10
Dose 8t CC, Dose 16t CC	0,241	40

**APÊNDICE D** - Resultado do teste de *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 16S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com feijão (variedade BRS estilo)

<b>Amostras</b>	<b>Teste <i>Pairwise</i></b>	<b>Nível de Significância (%)</b>
Solo, Solo+Esterco	1	33,3
Solo, Dose 4t BC	0,75	33,3
Solo, Dose 8t BC	0	66,7
Solo, Dose 16t BC	0,5	33,3
Solo, Dose 4t CC	0,5	33,3
Solo, Dose 8t CC	0,5	33,3
Solo, Dose 16t CC	0	100
Solo+Esterco, Dose 4t BC	0	100
Solo+Esterco, Dose 8t BC	0,625	33,3
Solo+Esterco, Dose 16t BC	0,75	33,3
Solo+Esterco, Dose 4t CC	1	33,3
Solo+Esterco, Dose 8t CC	1	33,3
Solo+Esterco, Dose 16t CC	0,5	33,3
Dose 4t BC, Dose 8t BC	0,625	33,3
Dose 4t BC, Dose 16t BC	0,5	33,3
Dose 4t BC, Dose 4t CC	1	33,3
Dose 4t BC, Dose 8t CC	1	33,3
Dose 4t BC, Dose 16t CC	0,5	33,3
Dose 8t BC, Dose 16t BC	1	33,3
Dose 8t BC, Dose 4t CC	1	33,3
Dose 8t BC, Dose 8t CC	1	33,3
Dose 8t BC, Dose 16t CC	0,25	66,7
Dose 16t BC, Dose 4t CC	0,375	33,3
Dose 16t BC, Dose 8t CC	0,25	33,3
Dose 16t BC, Dose 16t CC	0,25	66,7
Dose 4t CC, Dose 8t CC	0	100
Dose 4t CC, Dose 16t CC	0	100
Dose 8t CC, Dose 16t CC	0	100

**APÊNDICE E** - Resultado do teste de *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene 18S rRNA em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com feijão (variedade BRS estilo)

<b>Amostras</b>	<b>Teste <i>Pairwise</i></b>	<b>Nível de Significância (%)</b>
Solo, Solo+Esterco	0,333	20
Solo, Dose 4t BC	0,056	50
Solo, Dose 8t BC	0,537	10
Solo, Dose 16t BC	0,963	10
Solo, Dose 4t CC	0,056	40
Solo, Dose 8t CC	0,593	10
Solo, Dose 16t CC	0,963	10
Solo+Esterco, Dose 4t BC	0,37	10
Solo+Esterco, Dose 8t BC	0,148	30
Solo+Esterco, Dose 16t BC	0,741	10
Solo+Esterco, Dose 4t CC	0,167	40
Solo+Esterco, Dose 8t CC	0,444	20
Solo+Esterco, Dose 16t CC	0,926	10
Dose 4t BC, Dose 8t BC	0,056	40
Dose 4t BC, Dose 16t BC	0,537	10
Dose 4t BC, Dose 4t CC	0,278	10
Dose 4t BC, Dose 8t CC	0,574	10
Dose 4t BC, Dose 16t CC	0,889	10
Dose 8t BC, Dose 16t BC	0,833	10
Dose 8t BC, Dose 4t CC	0,796	10
Dose 8t BC, Dose 8t CC	0,611	10
Dose 8t BC, Dose 16t CC	0,889	10
Dose 16t BC, Dose 4t CC	0,296	30
Dose 16t BC, Dose 8t CC	-0,019	40
Dose 16t BC, Dose 16t CC	0,37	20
Dose 4t CC, Dose 8t CC	-0,093	50
Dose 4t CC, Dose 16t CC	0,444	20
Dose 8t CC, Dose 16t CC	-0,204	100

**APÊNDICE F** - Resultado do teste de Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene *nifH* (Micro-organismos diazotróficos) em solos com doses crescentes de biochar e cultivados com feijão (variedade BRS estilo)

<b>Amostras</b>	<b>Teste <i>Pairwise</i></b>	<b>Nível de Significância (%)</b>
Solo, Solo+Esterco	0,37	10
Solo, Dose 4t BC	0,444	10
Solo, Dose 8t BC	0,722	10
Solo, Dose 16t BC	1	10
Solo, Dose 4t CC	0,926	10
Solo, Dose 8t CC	0,944	10
Solo, Dose 16t CC	1	10
Solo+Esterco, Dose 4t BC	0,63	10
Solo+Esterco, Dose 8t BC	0,833	10
Solo+Esterco, Dose 16t BC	1	10
Solo+Esterco, Dose 4t CC	1	10
Solo+Esterco, Dose 8t CC	0,944	10
Solo+Esterco, Dose 16t CC	1	10
Dose 4t BC, Dose 8t BC	0,574	10
Dose 4t BC, Dose 16t BC	1	10
Dose 4t BC, Dose 4t CC	0,926	10
Dose 4t BC, Dose 8t CC	0,481	10
Dose 4t BC, Dose 16t CC	1	10
Dose 8t BC, Dose 16t BC	1	10
Dose 8t BC, Dose 4t CC	1	10
Dose 8t BC, Dose 8t CC	0,352	10
Dose 8t BC, Dose 16t CC	1	10
Dose 16t BC, Dose 4t CC	0,315	20
Dose 16t BC, Dose 8t CC	0,407	20
Dose 16t BC, Dose 16t CC	0,407	10
Dose 4t CC, Dose 8t CC	0,167	20
Dose 4t CC, Dose 16t CC	1	10
Dose 8t CC, Dose 16t CC	0,63	10