



**LUCAS GUEDES SILVA**

**ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO, PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO E CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM  
EM TOMATEIRO INFLUENCIADOS POR FINOS DE  
CARVÃO**

**LAVRAS – MG  
2018**

**LUCAS GUEDES SILVA**

**ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM EM TOMATEIRO INFLUENCIADOS  
POR FINOS DE CARVÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

Dr. Wagner Bettiol  
Orientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Lucas Guedes.

Atividade microbiana do solo, promoção de crescimento e controle da murcha de Fusarium em tomateiro influenciados por finos de carvão / Lucas Guedes Silva. - 2018.

68 p.

Orientador(a): Wagner Bettiol.

Coorientador(a): Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Biocarvão. 2. Fusarium. 3. Controle Alternativo. I. Bettiol, Wagner. II. Medeiros, Flávio Henrique Vasconcelos de. III. Título.

**LUCAS GUEDES SILVA**

**ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM EM TOMATEIRO INFLUENCIADOS  
POR FINOS DE CARVÃO**

**SOIL MICROBIAL ACTIVITY, GROWTH PROMOTION AND CONTROL OF  
FUSARIUM WILT IN TOMATO PLANTS INFLUENCED BY BIOCHAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de Abril de 2018

Dr. Cristiano Alberto de Andrade

Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi

Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva

Embrapa Meio Ambiente

Embrapa Meio Ambiente

UFLA

Dr. Wagner Bettiol  
Orientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2018**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me iluminar em mais uma etapa de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao CNPq pela concessão da bolsa para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, pela coorientação, suporte e amizade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade e apoio concedidos para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Jaime e Sônia, e a minha irmã Karen.

Aos companheiros de Laboratório na Embrapa Meio Ambiente: Marina, Mírian, Michelli, Thiago, Lílian, Lucas Lago, Martinha, Laura, Josi, Érica, Gabriela, Jorge, João e Carol.

Aos amigos de Laboratório e estudo na Universidade Federal de Lavras: Marcela; Moysa, Paul, Pablo, Larissa, Victor, Gustavo, Gabi, Rafa, Luísa e Kize.

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente: Anamaria, Rosely, Marcia, Elke, Gabriel, Juliana, Rafaela e Abrahão, pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos, Rafael, Thiago, Guilherme, Rubens, Eduardo, Breno, Rodrigo, Renato, Gustavo e Pedro, pela valiosa amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**OBRIGADO!**

## RESUMO

A utilização de biomassas carbonizadas (biocarvão) como um meio de melhorar as características físicas e químicas dos solos foram muito estudadas nos últimos vinte anos. No entanto, os efeitos do biocarvão (BC) sobre a microbiota do solo e seus impactos sobre as doenças de plantas, especialmente as de solo, não receberam a atenção devida e ainda são poucos compreendidos. O presente trabalho avaliou os impactos do fino de carvão (FC) sobre a atividade microbiana do solo e como agentes de promoção de crescimento de plantas e indução de supressividade a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (fol), em tomateiro, evidenciando a possibilidade da indução de respostas de defesa em plantas. No campo, foi realizada a incorporação de FC (0-20 cm) nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 t ha<sup>-1</sup> seguido do plantio de milho; após a colheita, o solo foi amostrado e avaliado quanto a sua atividade microbiana (liberação de CO<sub>2</sub>, C e N microbiano, FDA, fosfatase e urease). Adicionalmente a este solo, foi coletado outro na Embrapa Meio Ambiente, o qual foi misturado com FC nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% (v/v), sendo os solos infestados com fol (1x10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) e realizado o transplante de uma muda de tomateiro por vaso. O progresso da doença foi avaliado com uma escala diagramática e ao final foram determinadas as massas secas e frescas dos sistemas radiculares e aéreos, diâmetro do caule, número de folhas e altura das plantas. Para o ensaio de promoção de crescimento, foi realizada mistura de FC nas concentrações de 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 e 15% (v/v), e transplantado uma muda de tomateiro por vaso, sendo o desenvolvimento das plantas acompanhado semanalmente. Trinta dias após o transplante, foi realizada a coleta de quatro folíolos e avaliada a produção de enzimas relacionadas a defesa vegetal (peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e proteínas totais). A utilização de Finos de Carvão nas doses superiores a 20 t ha<sup>-1</sup> tem potencial para aumentar a biomassa microbiana do solo e de 20 a 50 t ha<sup>-1</sup> na redução dos sintomas da fusariose em tomateiro, sendo a indução de resistência sistêmica a mais provável hipótese, devido a significativos aumentos na atividade da enzima polifenoloxidase. Finos de Carvão promoveram ganhos de biomassas aérea e radicular em tomateiros, a partir da concentração de 7,5%. O aumento da concentração de Finos de Carvão no solo reduziu a severidade da murcha de *Fusarium* em tomateiro.

Palavras chave: Biocarvão, *Fusarium*, Controle alternativo.

## ABSTRACT

The use of carbonized biomass (biochar) as a means to improve physical and chemical quality of soils has been extensively studied in the last twenty years. However, the effects of biochar on soil biota and its impacts on plant diseases, especially soilborne plant pathogens, have not received due attention and are still poorly understood. In the present work we evaluated the impacts of biochar (BC) on soil microbial activity, on plant growth promotion and biocontrol to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 (fol), in tomato. In the experimental field, the incorporation of BC (0-20 cm deep) in the concentrations of 0, 10, 20, 30, 40 and 50 t ha<sup>-1</sup> was carried out followed by the corn planting; after harvesting the soil was sampled and evaluated for its microbial activity (microbial respiration, C and N microbial, FDA, phosphatase and urease activity). In addition to this soil, another one was collected at Embrapa Meio Ambiente, which was mixed with BC at concentrations of 0, 1, 2, 3, 4 and 5% (v/v), being the soils infested with fol (1x10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) and one tomato seedling per pot was transplanted. The progress of the disease was evaluated with a diagrammatic scale and at the end the fresh and dry weight of the root and aerial systems, stem diameter, number of leaves and plant height were determined. For the growth promoting assay, BC was mixed at concentrations of 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 and 15% (v/v), one tomato seedling per pot, was transplanted and plant development was evaluated weekly. Thirty days after transplanting, four leaves were collected and enzymes (peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase and total proteins) were evaluated. Biochar at doses of 20 t ha<sup>-1</sup> has potential to increase soil microbial biomass and from 20 to 50 t ha<sup>-1</sup> in reducing the symptoms of tomato Fusarium wilt, being an induction of systemic resistance the most probable due to an increase in the polyphenoloxidase activity. BC increased aerial and root biomass in tomato plants from the concentration of 7.5%. The increase of the concentration of BC in the soil reduces the severity of Fusarium wilt in tomato.

Key words: Biochar, Fusarium, Alternative control.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Carbono Microbiano (A); Nitrogênio Microbiano (B); Atividade da Urease (C); e Atividade da Fosfatase (D) em solo condicionado com Finos de Carvão..... 38
- Figura 2** Severidade da murcha e amarelecimento (A); do escurecimento vascular (B); e área abaixo da curva de progresso da doença (C) em tomateiro com 42 dias após o transplântio em solo condicionado com Finos de Carvão e infestado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3..... 40
- Figura 3** Massa fresca do sistema radicular (A); massa seca do sistema radicular (B); massa seca da parte aérea (C); massa fresca da parte aérea (D) de plantas de tomateiro cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e condicionado com Finos de Carvão..... 42
- Figura 4** Severidade do escurecimento vascular (A); da murcha e amarelecimento (B); e área abaixo da curva de progresso da doença (C) em tomateiro com 42 dias após o transplântio em solo condicionado com Finos de Carvão e infestado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3..... 43
- Figura 5** Massa fresca do sistema radicular (A); massa seca do sistema radicular (B); massa fresca da parte aérea (C); massa seca da parte aérea (D) de plantas de tomateiro cultivados em solo condicionado com Finos de Carvão..... 45
- Figura 6** Expressão enzimática da Polifenoloxidase em folhas de tomateiro, cultivados em solo condicionado com Finos de Carvão..... 46
- Figura 7** Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em BDA com crescentes concentração de extrato aquoso de Finos de Carvão..... 47
- Figura 8** Germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* após a aplicação de doses crescentes (0; 5; 10; 20, 25 e 50%) de extratos aquosos de Finos de Carvão..... 48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Granulometria do Fino de Carvão.....	26
<b>Tabela 2</b>	Composição química do Fino de Carvão.....	27
<b>Tabela 3</b>	Volume de extrato aquoso de Finos de Carvão incorporados ao BDA no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3.....	35
<b>Tabela 4</b>	Concentração de extrato aquoso de Finos de Carvão misturados na suspensão de microconídios de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3.....	36
<b>Tabela 5</b>	Composição de macro e micronutrientes no limbo foliar de tomateiro cultivado em solo condicionado com Finos de Carvão.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

AACPD	Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
BC	Biocarvão
BDA	Batata Dextrose Ágar
BD	Batata Dextrose
CBM	Carbono da Biomassa Microbiana
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
DAT	Dias Após o Transplante
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FC	Finos de Carvão
FDA	Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína
FOL	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
GEE	Gases de Efeito Estufa
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IRGA	Infra-Red Gas Analyser
JA	Ácido Jasmônico
NBM	Nitrogênio da Biomassa Microbiana
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNP	p-nitrophenol
PO	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
PT	Proteínas Totais
TPI	Terra Preta de Índio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1	Carvão Vegetal .....	15
2.2	Biocarvão .....	17
2.3	Supressividade .....	21
2.4	Biocarvão no Manejo de Doenças de Plantas .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1	Caracterização do Campo Experimental .....	26
3.2	Respiração Microbiana .....	27
3.3	Amostragem do Solo .....	28
3.4	Biomassa Microbiana .....	28
3.4.1	Carbono da Biomassa Microbiana .....	28
3.4.2	Nitrogênio da Biomassa Microbiana .....	29
3.5	Atividade Microbiana .....	29
3.5.1	Urease .....	29
3.5.2	Fosfatase Alcalina .....	30
3.5.3	Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (FDA) .....	30
3.6	Severidade da Murcha de <i>Fusarium</i> .....	31
3.7	Finos de Carvão como Promotor de Crescimento de Plantas .....	32
3.7.1	Produção de Enzimas Relacionadas a Defesa de Plantas .....	33
3.8	Efeito de Extrato Aquoso de Finos de Carvão Sobre o Crescimento Micelial e na Germinação de Microconídios de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	34
3.9	Análise Estatística .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	Atividade e Biomassa Microbiana do Solo .....	37
4.2	Severidade da Murcha de <i>Fusarium</i> no Tomateiro .....	39

4.3	Promoção de Crescimento e Produção de Enzimas Relacionadas a Defesa de Plantas.....	44
4.4	Extrato Aquoso de Finos de Carvão no Crescimento Micelial e Germinação de Microconídios de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Conciliar compromissos ambientais com a crescente necessidade por oferta de alimentos, fibras, bioenergia e uma variedade de matérias primas e produtos é um dos principais desafios da agricultura contemporânea (SMITH; GREGORY, 2013). No entanto, o maior engajamento da população em causas ambientais, aliado à expansão de políticas públicas de incentivo à adoção e ao desenvolvimento de novas tecnologias para uma produção agrícola mais sustentável, tem alavancado a mudança deste paradigma.

O manejo dos solos agrícolas é parte fundamental neste processo, pois seu uso inadequado representa um dos direcionadores do aquecimento global ao interferirem no ciclo do carbono e do nitrogênio, aumentando a mineralização do carbono estabilizado na matriz do solo e as emissões de  $N_2O$  (SMIL, 2011). Associado a isto, o que se tem observado nas últimas décadas é a intensificação no uso da terra sem os devidos cuidados necessários à manutenção da sustentabilidade, sendo em grande parte impulsionada pela crescente necessidade de se alimentar uma população em constante crescimento (SMITH; GREGORY, 2013). Como alternativas, a abertura de novas áreas e o uso mais acentuado do solo podem contribuir para o aumento da produção agrícola necessária para atender a essa demanda, porém com sérias implicações a longo e médio prazo para o meio ambiente (GODFRAY et al., 2010; TILMAN et al., 2011).

De acordo com o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2014), a agricultura, a silvicultura e demais formas de uso da terra foram responsáveis por aproximadamente 25% das emissões antropogênicas de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) em 2010, sendo este um dos gases de efeito estufa (GEE) responsáveis pelo aumento das temperaturas globais.

Neste contexto, uma alternativa que tem sido proposta como um meio para atenuar as alterações climáticas antropogênicas e simultaneamente melhorar os atributos físicos, químicos e biológicos dos solos agrícolas é a utilização do biocarvão (WOOLF, 2008). Este termo é empregado para se designar o produto sólido da pirólise de biomassas, com o objetivo de concentrar carbono numa forma mais resistente à degradação, para ser aplicado ao solo de forma intencional, visando aumentar o estoque de carbono e obter benefícios agrícolas e florestais (BENITES et al., 2005; COSTA; KERN, 1999; TORRES et al., 2005).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2017), o Brasil é líder mundial na produção de carvão vegetal, com produção estimada em 6,2 milhões de toneladas em 2015, na qual, cerca de 80% deste montante é utilizado em

altos-fornos para a produção de aço e ferro-gusa (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2017). Contudo, no processo de carbonização da biomassa para a produção do carvão vegetal, grandes volumes de subprodutos são gerados, devido, principalmente, a sua baixa resistência mecânica e pelas numerosas operações de manuseio e transporte, como consequência, a geração de finos de carvão (moinha) pode representar até 15% do total de carvão produzido (BENITES et al., 2009). Os finos de carvão podem ser direcionados para injeção no próprio processo produtivo siderúrgico na forma de briquetes (CGEE, 2014). Todavia, há grandes porcentagens destes subprodutos que não têm finalidade.

No Japão os finos de carvão (FC) já são utilizados na composição de substratos orgânicos e como condicionadores de solos há mais de cinco décadas (WADA, 1997; ZANETTI et al., 2003). Segundo Maekawa (2002), os FC apresentam características ideais para a composição de substratos orgânicos, pois apresentam alta porosidade, o que permite aumentar sua capacidade de retenção de água; propicia e facilita a proliferação de microrganismos benéficos, além de possuir, em sua composição, elementos minerais como magnésio, boro, silício, cloro, cobre, manganês, molibdênio e, principalmente, potássio.

No Brasil o emprego de carvões vegetais em substratos ou diretamente no solo ainda é restrito, sendo que a grande maioria dos estudos que abordaram este tópico foram realizados na última década. Fato este corroborado por levantamento realizado por Brito (2000), no qual constatou-se que a grande maioria das carvoarias ativas do Estado de São Paulo se destina à obtenção apenas do carvão comercial, sem se preocupar em aproveitar os demais componentes, na qual 64% do fino de carvão obtido na classificação do carvão vegetal é descartado no ambiente.

A possibilidade de se utilizar carvões como condicionadores de solos surgiu após o estudo e entendimento das chamadas “Terras Pretas de Índio” (TPI), que são solos de origem antropogênica encontrados na região amazônica, resultantes de anos de deposição de material orgânico carbonizado (LEHMANN et al., 2003; SPOKAS et al., 2012). Esses solos são de excelente fertilidade, com altos teores de carbono, potássio, cálcio, magnésio, zinco e manganês, diferentemente da maioria dos solos amazônicos não perturbados pela atividade humana, geralmente ácidos e pobres em nutrientes.

Logo, na tentativa de recriar solos com tais características, diversas pesquisas vem avaliando o uso de carvões de origem vegetal como condicionadores de solos, e relatos positivos decorrentes de sua utilização são diversos, como: mitigação de mudanças climáticas por meio do sequestro de carbono (LEHMANN, 2007), melhora do pH em solos ácidos (CHAN et al., 2008), aumento da capacidade de troca catiônica em solos pobres em matéria orgânica

(SILBER; LEVKOVITCH; GRABER, 2010), aumento da retenção de água e nutrientes aos solos (GLASER; LEHMANN; ZECH, 2002; NOVAK et al., 2009), adsorção de metais pesados (KOMKIENE; BALTRENAITE, 2016), promoção de crescimento e supressão de doenças de plantas (ELAD et al., 2010; GRABER et al., 2010) e aumento da comunidade de microrganismos benéficos no solo (KOLB; FERMANICH; DORNBUSH, 2009).

Portanto, partindo-se do princípio que a disponibilidade de finos de carvão é abundante no Brasil, sua utilização como condicionador de solos agrícolas poderia promover múltiplas vantagens no sistema solo-planta, sendo uma fonte de carbono pirogênico de baixo custo e, conseqüentemente, diminuindo a contaminação associada ao seu descarte para o meio ambiente (AHMAD et al., 2014).

Entretanto, apesar dos potenciais ganhos da adição de carvões vegetais no solo, diversas pesquisas demonstraram que alguns de seus efeitos são muito dependentes da biomassa utilizada, da temperatura empregada no processo de pirólise, das concentrações aplicadas ao solo, entre outros. Além disso, o conhecimento a respeito de seus efeitos na abundância e estrutura da comunidade microbiana do solo e o concomitante efeito potencial sobre os processos biológicos, ainda não estão totalmente compreendidos, na qual essa lacuna do conhecimento necessita ser melhor entendida (LEHMANN et al., 2011; NAVARRETE et al., 2010). Ademais, a utilização de compostos orgânicos nos solos tem sido proposta como uma forma de reduzir a incidência de doenças de plantas causadas por patógenos de solo.

Portanto, hipotetiza-se que finos de carvão possam aumentar a atividade microbiana no solo e atuar direta ou indiretamente no controle da murcha de *Fusarium* no tomateiro. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os impactos do fino de carvão na atividade microbiana do solo, por meio de parâmetros bioquímicos, bem como, avaliar seus efeitos no crescimento de plantas e na severidade da murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3, em tomateiro, evidenciando a possibilidade da indução de respostas de defesa em plantas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Carvão Vegetal

A produção de carvão vegetal é o mais antigo processo de transformação química da madeira. Carvões geralmente são reportados como materiais pouco reativos (inertes), hidrofóbicos, geralmente de elevada área superficial e contendo de 85 a 95% de carbono em sua composição (KISHIMOTO; SUGIRA, 1985). Segundo Gomes; Oliveira (1982), o carvão vegetal é definido como o resíduo sólido da carbonização ou pirólise da madeira, na qual a biomassa é queimada ou aquecida numa atmosfera restrita de ar, e decompostos a água, compostos voláteis, frações orgânicas, e outros.

De maneira geral, a pirólise consiste na termodegradação de um combustível sólido, que implica na ruptura de ligações carbono-carbono e dando origem a ligações carbono-oxigênio, na qual parte da biomassa é reduzida a carbono e a outra parte é oxidada e hidrolisada. Como resultado, obtém-se gases não condensáveis (syngas), vapor/líquido condensável (bio-óleo) e uma fração sólida (carvão) (BREWER et al., 2011; STEWART et al., 2013).

Dependendo das condições de operação do processo, a pirólise pode ser classificada de três formas: pirólise lenta, rápida e o processo denominado pirólise “flash” (BAHNG et al., 2009). A pirólise rápida e “flash” são mais utilizadas na produção de gases e óleos, uma vez que são empregadas altas taxas de aquecimento em um curto período de tempo, geralmente acima de  $100\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , o que favorece a perda de massa e a maior liberação de gases e vapores condensáveis. Por outro lado, a pirólise lenta é realizada em baixas taxas de aquecimento por longo período de tempo (abaixo de  $80\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), maximizando a formação do produto sólido (LAIRD et al., 2010).

O comportamento da madeira, perante o processo de carbonização, representa o somatório do comportamento de cada um dos seus principais componentes. Quando a madeira é submetida à ação do calor, ao atingir temperaturas em torno de  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , inicia-se o processo de decomposição, no qual todos os seus componentes são extensivamente alterados, ocorrendo, principalmente, a secagem da madeira. Neste curto intervalo, chamada fase A da carbonização, observa-se a presença de ácidos fórmico e acético, além de gases constituídos de vapor d'água e traços de dióxido de carbono (LEVAN; WINANDY, 1990).

De  $200\text{ a }280\text{ }^{\circ}\text{C}$  ocorre a fase B, na qual são produzidos gases semelhantes aos da fase A, havendo apenas uma redução na quantidade de vapor d'água e de monóxido de carbono liberados. Numa segunda fase ocorre a quebra das hemiceluloses, a despolimerização da celulose nas regiões amorfas e a ruptura da lignina em blocos complexos. Ao mesmo tempo, a

madeira sofre pequenas contrações e, surgem pequenas rachaduras em sua estrutura, consequentes da rápida expansão dos gases liberados. Nessa fase, a madeira começa a perder a sua aparência e estruturas originais, tornando-se cada vez mais enegrecida (KOLLMAN; COTE, 1968; GOMES; OLIVEIRA, 1982; OLIVEIRA, 1988).

A fase C inicia-se quando a temperatura ultrapassa os 280 °C. Neste ponto ocorre a pirólise propriamente dita, na qual as reações são exotérmicas e a decomposição térmica da madeira mantém-se apenas com a energia liberada da quebra das ligações das unidades básicas de celulose, hemiceluloses e lignina. A degradação térmica nesta etapa gera monóxido de carbono, metano, formaldeído, ácido fórmico, ácido acético, metanol e hidrogênio, diluídos com os produtos das fases A e B, além de alcatrões. Por fim, a massa sólida resultante da pirólise, na fase C, é o que se denomina carvão vegetal (KOLLMAN; COTE, 1968; GOMES; OLIVEIRA et al., 1982; OLIVEIRA, 1988).

Um dos grandes problemas inerente à produção de carvão vegetal no Brasil está na tecnologia utilizada no seu processo produtivo. Localizadas próximas a florestas, as unidades produtivas, em sua grande maioria, obtêm o carvão em fornos de alvenaria denominados de “rabo quente”, que apresentam pequeno controle operacional sobre o processo, permitindo um aproveitamento de somente 25% da madeira na forma de carvão vegetal e o restante lançado na atmosfera em forma de gases (HOMMA et al., 2006; MANZONI; BARROS, 2011; PINHEIRO et al., 2006). Apesar do baixo controle operacional e de ser um método de carbonização primitiva, tais fornos ainda são amplamente utilizados pelo seu baixo custo de implantação, operação e manutenção, devido à grande maioria das unidades produtivas serem de pequeno porte e com recursos monetários insuficientes para o investimento em maquinarias de maior eficiência e com aproveitamento de resíduos, diferentemente de empresas siderúrgicas integradas que adotaram métodos modernos desde o início dos anos 1990 (MANZONI; BARROS, 2011).

O Brasil é o único país do mundo que usa carvão vegetal em grande escala como um agente de duplo propósito em altos-fornos de produção de aço, isto é, como uma fonte de calor e monóxido de carbono (gás redutor do minério de ferro) (PROTÁSIO et al., 2014), em substituição ao coque de carvão mineral. Como consequência, uma série de vantagens são desencadeadas para o país, destacando-se o fato de constituir uma fonte energética renovável, e de fundamental importância, dada a má qualidade do carvão mineral nacional devido ao alto conteúdo de impurezas (teor de cinzas e de enxofre) (SAMPAIO, 1990); e a possibilidade da geração dos créditos de carbono, que viabilizam a entrada de investidores que necessitam alcançar suas metas (MACEDO; CORTEZ, 2005; MACHADO, 2009).

Entretanto, apesar das vantagens, o alto índice de geração de finos de carvão (pedaços menores que 8 mm) é um problema neste setor, pois o carvão vegetal é por natureza um produto bastante friável (frágil, suscetível de se esfarelar), característica que é agravada pelas numerosas operações de manuseio e transporte; e por estes estarem abaixo da granulometria adequada para o bom funcionamento do alto forno, não podem ser utilizados no processo siderúrgico (OLIVEIRA, 1988).

Segundo Benites et al. (2009) a geração de finos de carvão no processo de produção do carvão, pode representar até 15% do carvão produzido. Já na siderurgia, a média de resíduo sólido gerado para cada tonelada de ferro gusa produzido é de aproximadamente, 500 kg, distribuídos da seguinte forma: escória (41%), finos de minério de ferro (28%), finos de carvão vegetal (18%), e o restante é representado por materiais particulados retido nos equipamentos (INSTITUTO AÇO BRASIL, 2014).

Apesar do grande volume de finos gerados no processo, uma parcela deste contingente pode ser direcionada para processos de injeção de finos ou comercializados na forma de briquetes (CGEE, 2014). Todavia, há grandes porcentagens destes subprodutos que não têm finalidade, e a reciclagem do fino de carvão no parque siderúrgico (injeção nos fornos e produção de briquetes) é onerosa e emite na atmosfera gases de efeito estufa (GEE); enquanto seu uso agrícola tem potencial para incremento de carbono no solo, contribuindo para a mitigação do aquecimento global.

Logo, o desenvolvimento de estratégias de gestão destes subprodutos, para o uso como condicionadores do solo, não só é altamente desejável como também estratégico para o setor florestal e siderúrgico brasileiro, haja vista que o carvão ou os finos do carvão quando intencionalmente aplicados nos solos também podem ser denominados de biocarvão.

## **2.2 Biocarvão**

Os estudos sobre os biocarvões são relativamente recentes quando comparado a idade do material que inspirou seu surgimento (MADARI; MAIA; NOVOTNY, 2012). A proposta de sua aplicação ao solo foi motivada pela observação e estudo das “Terras Pretas de Índio” (TPI), que são solos de origem antropogênica encontrados na região amazônica, resultantes de anos de deposição de material orgânico carbonizado (LEHMANN et al., 2003; SPOKAS et al., 2012). Como resultado desta ação antrópica, houve a formação de áreas que apresentam solos com a camada superficial mais escura do que as áreas vizinhas, além de grande número de restos de materiais arqueológicos, como fragmentos de cerâmica e artefatos líticos em sua composição (SOMBROEK, 1966).

Os altos índices de frações orgânicas nestes solos, promoveram significativas alterações em sua coloração, razão do nome “Terra Preta de Índio” ou “*Anthropogenic Dark Earth*”. Adicionalmente, a alta persistência da matéria orgânica nesses solos é vista como algo atípico, uma vez que, as condições climáticas da região (altas temperaturas e umidade relativa), apontam para sua rápida degradação. Esta resistência vem sendo relacionada à estrutura altamente aromática dos carvões, que é química e micro biologicamente estável (GLASER et al., 2000; MANN, 2002).

É reconhecido de que os solos de TPI da Amazônia são um dos solos mais férteis do mundo (GLASER et al., 2001), diferentemente da maioria dos solos amazônicos não perturbados pela atividade humana, geralmente ácidos e pobres em nutrientes. Tal característica deve-se principalmente aos altos teores de cálcio, magnésio, zinco, manganês, potássio e carbono, resultantes da intensa atividade humana pré-histórica, verificado por acentuados processos de acúmulo de restos de animais (ossos, gordura, sangue, fezes, restos de peixes etc), vegetais (folhas de palmeiras, sementes, cascas de mandioca, etc), e de carvões residuais de fogueiras domésticas e da queima da vegetação para uso agrícola do solo (CUNHA et al., 2007; GLASER et al., 2001; NOVOTNY et al., 2009).

De acordo com Lal (2009), os solos de TPI da Amazônia possuem idades que variam de 500 a 7000 anos, evidenciando sua grande longevidade (meia-vida estimada em  $10^2$ - $10^7$  anos), estabilidade e capacidade de retenção de nutrientes nos solos.

A existência das TPI sugere que, pelo menos teoricamente, solos de baixa fertilidade podem ser transformados em solos férteis, não apenas pela adição de fontes minerais de nutrientes, mas pela adição de compostos orgânicos estáveis na forma de biocarvão (BENITES et al., 2005; COSTA; KERN, 1999; LEHMANN, 2009; TORRES et al., 2005).

Visando a obtenção de um material semelhante às TPI, diversas pesquisas têm se dirigido para a produção de um material chamado biocarvão “*biochar*”, que pode ser definido como o produto ou subproduto de diferentes processos de pirólise (processo de decomposição térmica que utiliza temperaturas entre 400 °C e 800 °C, na ausência total ou parcial de oxigênio) de diferentes biomassas (REZENDE et al., 2011), com o intuito de aplica-los aos solos.

Muitas biomassas e matérias orgânicas podem ser utilizadas para a produção de biocarvões (BC), destacando-se os resíduos orgânicos urbanos (restos de podas de árvores, lodo de esgoto), agrícolas (restos de culturas, bagaços e palhas), industriais e de origem animal (ossos, esterco), sendo, portanto, de grande utilidade para a reciclagem de uma ampla gama de resíduos (ABDELHAFEZ; LI; ABBAS, 2014), e conseqüentemente, diminuindo a contaminação associada ao descarte para o meio ambiente (AHMAD et al., 2014). Ademais, a

conversão de resíduos em BC também promove a eliminação de todos os patógenos ativos (AHMAD et al., 2014) presentes na biomassa a ser pirolisada.

Quando aplicado ao solo, o BC sofre uma série de interações bioquímicas e suas propriedades podem se alterar com o tempo, havendo a formação de compostos fenólicos, carboxílicos, carbonílicos, quinonas, e grupos funcionais hidroxila (PAZ-FERREIRO et al., 2014). Estas alterações nas propriedades dos BC, aliado à sua estrutura altamente porosa, levam a um aumento da concentração de sítios quimicamente reativos, capazes de estabelecer ligações com vários nutrientes do solo, o que conseqüentemente, aumentaria o potencial produtivo do solo (LEHMANN et al., 2003).

Outro fator preponderante a sua utilização, se refere à grande estabilidade e ao lento processo de degradação que sofre no solo, pois durante o processo de queima da biomassa ocorre a estabilização do C existente, numa forma mais resistente à decomposição química e biológica (ALBURQUERQUE et al., 2013), ao contrário da maioria das matérias orgânicas convencionais, que são facilmente decompostas.

Entretanto, apesar dos benefícios agrônômicos e ambientais inerentes ao uso do BC no solo, fatores como a temperatura de pirólise e a biomassa utilizada, apresentam extrema importância na qualidade e reatividade do BC (BREWER et al., 2011; ENDERS et al., 2012).

A porosidade, concentração de grupos funcionais e o tamanho das partículas do BC dependem principalmente do tipo de biomassa utilizada e só em um segundo momento estes serão influenciados pelas características do processo, como a temperatura da pirólise.

O teor de cinzas do BC depende, sobretudo, do conteúdo de cinzas da matéria-prima utilizada. Gramíneas, cascas de grãos, resíduos de palhas e estrume, geralmente dão origem a BC com elevado teor de cinzas, em contraste com os obtidos de materiais lenhosos (DIAS et al., 2010). Quanto ao efeito da temperatura sob o teor de cinzas, Shinogi e Kanri (2003) mostraram que o conteúdo de cinzas aumenta com o aumento da temperatura para todas as matérias-primas utilizadas. Elementos como N, C, H, O e S são volatilizados durante o aquecimento a temperaturas variadas, enquanto sais inorgânicos não são volatilizados tão facilmente, o que é a principal razão para o aumento do teor de cinzas do BC (SILBER et al., 2010).

Quanto ao efeito da temperatura na qualidade final do BC, sabe-se que biomassas pirolisadas em temperaturas mais baixas mantém parte de suas estruturas químicas inalteradas pela carbonização, portanto, são materiais mais sujeitos a degradação microbiana, podendo levar à liberação dos nutrientes que fazem parte de sua composição (CANTRELL et al., 2012; MUKHERJEE; ZIMMERMAN; HARRIS, 2011; SINGH et al., 2010). Já os BC pirolisados a

altas temperaturas, devido ao processo mais intenso de carbonização, são materiais mais estáveis, portanto, menos sujeitos à degradação microbiana e conseqüentemente com maior potencial de sequestro de carbono (KRULL et al., 2009). Entretanto, a queima em temperaturas mais elevadas provoca a perda de alguns grupos funcionais de superfície, o que reflete diretamente na capacidade de troca de cátions (CTC) e na qualidade do BC (HOSSAIN et al., 2011; STEWART et al., 2013).

A aplicação do BC no solo tem como proposta principal a mitigação das emissões de gases de efeito estufa e aumento da permanência do carbono sequestrado no solo (SINGH et al., 2010; SOHI et al., 2010), pois o processo de pirólise aumenta sua resistência à oxidação, e como o C do BC é derivado do CO<sub>2</sub> atmosférico, fixado na biomassa através da fotossíntese, a incorporação de C estável no solo com a adição do BC, representa um mecanismo de remoção de C atmosférico e armazenamento no solo à longo prazo. Porém, essa capacidade de sequestrar C atmosférico tem sido considerada como um benefício adicional desse material, pois muitos estudos têm comprovado que o BC promove diversos benefícios ao sistema agrícola, uma vez que traz melhorias nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (LEHMANN et al., 2003; SCHMIDT; SKJEMSTAD; JÄGER, 2002; STEINER et al., 2007).

Os meios pelos quais o BC melhora as respostas das culturas podem ser atribuídos a efeitos diretos pelo fornecimento de nutrientes (SILBER et al., 2010) e a vários outros efeitos indiretos, incluindo: aumento da retenção de nutrientes (CHAN et al., 2008); melhorias no pH do solo (NOVAK et al., 2009; YAMATO et al., 2006); aumento da capacidade de troca de cátions (CHENG et al., 2006); neutralização de compostos fitotóxicos no solo (WARDLE; ZACKRISSON; NILSSON); melhora na retenção de água (GLASER et al., 2002); promoção de fungos micorrízicos (RONDON et al., 2007; WARNOCK et al., 2007); e alteração de populações e funções microbianas do solo (PIETIKÄINEN; KIIKKILÄ; FRITZE, 2000).

Além disto, em decorrência de sua estrutura altamente porosa, o BC pode oferecer microsítios favoráveis ao abrigo de microrganismos, contra predadores da fauna do solo (PIETIKÄINEN et al., 2000). Essa estrutura porosa possui alta superfície interna com a habilidade de adsorver matéria orgânica solúvel, gases e nutrientes inorgânicos, tornando-o um habitat ideal para colonização, crescimento e reprodução de microrganismos, particularmente para bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (THEIS; RILLIG, 2009). Contudo, apesar de a interação dos microrganismos com o carvão ainda não ser bem compreendida, alguns estudos encontraram efeitos diretos da adição de BC no solo com a comunidade microbiana, sendo responsáveis por proporcionar aumentos na composição da biomassa microbiana e nas atividades enzimáticas, tanto no solo quanto na rizosfera (LEHMANN et al., 2011). Entretanto,

poucos estudos abordaram o potencial da adição de BC sob a incidência/severidade de doenças em plantas (ELAD et al., 2012).

Segundo Elad et al. (2012), as mudanças nas comunidades microbianas podem incluir um aumento de microrganismos benéficos que protegem as plantas de forma direta contra patógenos do solo, por meio da produção de antibióticos, competição, hiperparasitismo ou indução de mecanismos de defesa sistêmica nas plantas. Além disso, os compostos químicos presentes nos alcatrões residuais, que são adicionados ao solo com o BC, podem ter efeitos tóxicos diretos nos patógenos do solo. Graber et al. (2010) identificaram uma série de compostos presentes nos BC que são conhecidos por afetar adversamente a sobrevivência e crescimento microbiano, estes incluem o etilenoglicol e propilenoglicol, ácido hidroxipropiônico e butírico, ácido benzóico e o-cresol, quinonas e 2-fenoxietanol.

### 2.3 Supressividade

Nos últimos anos, com o intuito de desenvolver uma agricultura mais sustentável, muitas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de estratégias agronômicas voltadas para o controle de fitopatógenos, caracterizadas por alta eficiência, baixo custo e de reduzido impacto ambiental. Isto porque as estratégias convencionais, normalmente utilizadas para o manejo de doenças de plantas, como o uso de cultivares resistentes e fungicidas sintéticos, não são capazes de controlar completamente a ampla variedade de bactérias, nematoides, fungos e oomicetos que acometem as culturas, causando consideráveis perdas na produção agrícola anualmente.

Nesse contexto, a possibilidade de se aplicar matérias orgânicas ao solo, incluindo esterco animal, adubos verdes, resíduos orgânicos da agroindústria, e compostagens são de grande interesse entre cientistas (HOITINK; BOEHM, 1999) e agricultores. Essas matérias orgânicas, além de melhorar a estrutura e a qualidade dos solos (BONANOMI et al., 2014), podem efetivamente suprimir doenças de plantas causadas por patógenos de solo (NOBLE; COVENTRY, 2005) e de parte aérea (ZHANG; DICK; HOITINK, 1996), como: *Gaeumannomyces graminis* f. sp. *tritici* (TILSTON; PITT; GROENHOF, 2002), *Macrophomina phaseolina* (LODHA, 1995), *Verticillium dahliae* (LAZAROVITS; CONN; POTTER, 1999), *Phytophthora* (SZCZECH; SMOLIŃSKA, 2001), *Pythium* (MCKELLAR; NELSON, 2003) e muitas espécies de *Fusarium* (SZCZECH, 1999).

O termo supressividade se refere a capacidade de alguns solos em prevenir o estabelecimento de patógenos ou inibirem suas atividades patogênicas, podendo esta ser uma característica natural do solo ou induzida/potencializada por fatores bióticos e abióticos

(COOK; BAKER, 1983). Hornby (1983) aponta a existência de dois tipos de solo supressivo: o primeiro diz respeito a habilidade do solo de limitar a densidade do patógeno e suas atividades saprofíticas; e o segundo, a capacidade do solo de restringir o desenvolvimento da doença mesmo com alta densidade de inóculo, hospedeiro suscetível e condições ambientais favoráveis.

Dentre os fatores que podem levar um solo a se tornar supressivo, os biológicos são os mais estudados e susceptíveis a alterações. A parte viva do solo é composta por animais, vegetais, bactérias, fungos, e uma infinidade de outros organismos, sendo esta parcela muito sensível às alterações decorrentes dos processos comumente empregados no manejo dos solos (aração, adubação, calagem, monoculturas etc.) e por fatores abióticos (temperatura e umidade), podendo estas modificações favorecer ou não o desenvolvimento e estabelecimento de determinados organismos na área.

A incorporação de matéria orgânica é conhecida por estimular a atividade da microbiota do solo, limitando a atividade dos fitopatógenos. Solos ricos em matéria orgânica geralmente apresentam maior supressividade por promoverem e suportarem maior atividade microbiana, além de ser fornecedora de micronutrientes, hormônios e outras substâncias resultantes da sua decomposição, levando a indução de resistência do hospedeiro ou controlando o patógeno (BETTIOL; GHINI, 2005). A supressão do patógeno ocorre pelo aumento da competição por espaço e nutrientes, favorecendo a produção de metabólitos e aumentando a atividade dos parasitas e predadores. Sendo assim, um solo supressivo está relacionado com a alta diversidade biológica nele presente (BETTIOL; GHINI, 2005), tendo em vista que as plantas podem explorar o consórcio microbiano do solo para proteção contra patógenos de raiz (MENDES et al., 2011).

Além dos fatores biológicos, as propriedades físicas e químicas do solo, como o pH, condutividade elétrica, teor de matéria orgânica, nutrientes, estrutura, textura e capacidade de retenção de água também podem atuar de forma direta na supressividade do solo, por meio do favorecimento da atividade microbiana, ou indiretamente, quando interferem no ciclo do patógeno. Entretanto, distinguir entre os fatores responsáveis pela supressividade é uma dificuldade frequentemente encontrada (BETTIOL; GHINI, 2005), uma vez que ela é compreendida por complexas interações entre patógeno-ambiente-hospedeiro (ARSHAD; MARTIN, 2002).

## 2.4 Biocarvão no Manejo de Doenças de Plantas

A aplicação de BC no solo tem surgido como uma ferramenta promissora para o controle de doenças de plantas. Apesar do pequeno número de trabalhos publicados que abordam esta temática, as adições de BC, em termos gerais, foram responsáveis pela indução de supressividade em 85% dos casos, não significativo em 12% (BONANOMI; IPPOLITO; SCALA, 2015) e somente dois estudos reportaram aumento na incidência ou severidade da doença com a aplicação de altas doses de BC (JAISWAL et al., 2014; JAISWAL et al., 2015). Esta frequência de efetividade no controle de doenças é muito superior quando comparada as demais matérias orgânicas comumente utilizadas, como: turfa (4%), resíduos não processados da agricultura (45%) e compostos orgânicos (56%) (BONANOMI et al., 2007).

Os BC têm sido reportados como sendo efetivos na supressão de doenças tanto de parte aérea quanto de solo. Para os patógenos de parte aérea, a aplicação de diferentes BC derivados de madeira de citros foram capazes de controlar o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em tomate (*Lycopersicon esculentum*), pimentão (*Capsicum annuum*) (ELAD et al., 2010) e no morangueiro (*Fragaria × ananassa*) (HAREL et al., 2012). Além disto, Elad et al. (2010) e Harel et al. (2012) reportaram que BC produzidos com madeira de citros e resíduos de estufa, sob condições controladas, reduziram significativamente a incidência de oídio, causado por *Leveillula taurica* no tomateiro e *Podosphaera aphanis* no morangueiro, respectivamente.

Em relação as doenças provocadas por patógenos de solo, a capacidade supressora do BC foi reportada para *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (ELMER; PIGNATELLO, 2011), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (POSTMA et al., 2013), *Fusarium proliferatum* (ELMER; PIGNATELLO, 2011), *Pythium aphanidermatum* (POSTMA et al., 2013), *Phytophthora cactorum* (ZWART; KIM, 2012), *Phytophthora cinnamomi* (ZWART; KIM, 2012) e *Rhizoctonia solani* (JAISWAL et al., 2014; JAISWAL et al., 2015).

Na literatura, são propostos ao menos cinco mecanismos pelos quais o BC age no controle de doenças: (i) indução de resistência sistêmica nas plantas hospedeiras; (ii) aumento na abundância e/ou atividade de microrganismos benéficos; (iii) alteração na qualidade do solo em termos de disponibilidade de nutrientes e condições abióticas; (iv) efeitos fungitóxicos do biocarvão; (v) sorção de compostos fitotóxicos e alelopáticos (BONANOMI et al., 2015).

A indução de resistência em plantas é creditada como o mecanismo responsável pela supressão da doença em nove dos 18 casos experimentais já publicados (BONANOMI et al., 2015). Harel et al. (2012) demonstraram que morangueiros crescidos em substratos contendo BC obtiveram maior expressão de genes que codificam três proteínas relacionadas a patogênese (FaPR1, Faolp2, Fra a3), um gene que codifica uma lipoxigenase (Falox) e um gene

(FaWRKY1). Mais recentemente, Mehari et al. (2015) demonstraram, usando o patossistema *Solanum lycopersicon*-*B. cinerea*, que a resposta de indução de resistência sistêmica (ISR) mediada pelo BC em plantas de tomate é dependente de ácido jasmônico (JA), pois apenas mutantes deficientes em JA impediram a resistência induzida pelo BC e limitando o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na infecção. Contudo, apesar das evidências reportadas por Harel et al. (2012) e Mehari et al. (2015), ainda não é claro se a indução de resistência sistêmica nas plantas é devida a efeitos diretos de alguns compostos químicos presentes no BC ou por alterações na composição e funções do microbioma da rizosfera.

O segundo mecanismo que explica a supressão de doenças pelo BC, evidencia que o BC é capaz de promover o crescimento de plantas e/ou a atividade de uma ampla gama de microrganismos benéficos, que por sua vez, protegem as plantas do ataque de patógenos. Um crescente número de evidências confirmam que o BC aumenta a biomassa microbiana (LIANG et al., 2010), a colonização radicular por fungos micorrízicos (WARNOCK et al., 2007) e a população de microrganismos promotores de crescimento (GRABER et al., 2010; KOLTON et al., 2011). Tais efeitos positivos foram relacionados a fatores físicos e nutricionais. Primeiro, graças à sua estrutura porosa e com alta área de superfície específica, o BC oferece um ambiente úmido e seguro para os microrganismos, contra ácaros, colêmbolos, protozoários e nematoides (LEHMANN et al., 2011). Evidências empíricas indicam que bactérias e fungos micorrízicos são capazes de efetivamente explorar a estrutura porosa do BC (DOWNIE et al., 2009) para encontrar refúgio contra predadores (WARNOCK et al., 2007). Em relação ao efeito nutricional, o BC pode fornecer carbono orgânico para sustentar o crescimento microbiológico saprófito, embora se espere que este efeito seja limitado em comparação com outras matérias orgânicas, como resíduos de culturas e compostos, pois como a biomassa é pirolisada, sua qualidade bioquímica para as necessidades dos microrganismos diminui drasticamente devido a redução de fontes de carbono facilmente degradáveis e ao enriquecimento de frações aromáticas recalcitrantes (KRULL et al., 2009). Como consequência, após a pirólise, o biocarvão torna-se um material orgânico adequado para sustentar o desempenho da cultura, mas pouco capaz de sustentar o crescimento microbiano. Porém, Postma et al. (2013), utilizando BC feito a partir de ossos de animais, na qual foi utilizado como um transportador de agentes de biocontrole, mostraram, por microscopia eletrônica de varredura, que várias bactérias (*Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus pumilus* e *Streptomyces pseudovenezuelae*) foram capazes de colonizar extensivamente a estrutura porosa do biocarvão e quando aplicadas ao solo foram mais eficazes no controle de doenças causadas por *Pythium aphanidermatum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate.

O terceiro mecanismo possível baseia-se na hipótese de que a modificação da qualidade do solo em termos de disponibilidade de nutrientes e condições abióticas pode afetar as interações entre planta-patógeno. As adições de BC geralmente melhoram o conteúdo de nutrientes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) (GASKIN et al., 2010) e aumentam o pH do solo (YUAN; XU, 2011). Por outro lado, o impacto na biodisponibilidade dos principais nutrientes das plantas, como nitrogênio e fósforo, é mais controverso (CHAN; XU, 2009). Como o processo de pirólise remove mais nitrogênio do que o carbono orgânico, o BC resultante, dependendo da temperatura e das características iniciais da biomassa, geralmente tem uma relação C/N maior do que a das matérias-primas originais. Quando incorporados ao solo, materiais orgânicos com alta relação C/N estimulam a atividade microbiana que, ao reduzir a disponibilidade de nitrogênio mineral, prejudica a capacidade saprófita do patógeno e, portanto, o processo de infecção (SNYDER et al., 1959).

O quarto mecanismo que tenta explicar a supressão da doença é devido a efeitos fungitóxicos diretos do BC. Durante a pirólise, grandes mudanças químicas ocorrem com a degradação da biomassa, gerando a formação de compostos alifáticos e C aromáticos. Além disso, durante a pirólise é produzida uma gama de compostos orgânicos potencialmente fungitóxicos (SPOKAS et al., 2011). Graber et al. (2010) identificaram uma série de compostos presentes nos BC que são conhecidos por afetar adversamente a sobrevivência e crescimento microbiano, estes incluem o etilenoglicol e propilenoglicol, ácido hidroxipropiônico e butírico, ácido benzóico e o-cresol, quinonas e 2-fenoxietanol.

Por fim, a capacidade de sorção dos BC pode ter funções benéficas tanto diretas quanto indiretas. Em solos agrícolas, compostos fitotóxicos podem ocorrer como resultado da poluição ambiental (PRASAD, 2004), ou liberados durante a decomposição de resíduos vegetais (BONANOMI et al., 2011) e de exsudatos radiculares de outras espécies vegetais (MAHALL; CALLAWAY, 1992). Portanto, o BC pode proteger diretamente as raízes de plantas de compostos fitotóxicos, pois plantas sob tais condições estressantes podem aumentar a suscetibilidade a patógenos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Meio Ambiente (22°43'36''S e 47°00'59''W) e no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC (22°52'03''S e 47°04'20''W), localizados nos municípios de Jaguariúna e Campinas, respectivamente. Ambos os municípios estão localizados na região centro-leste do Estado de São Paulo e possuem clima subtropical úmido (Cfa de acordo com a classificação de Köppen), com os verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

#### 3.1 Caracterização do Campo Experimental

O solo da área experimental do IAC é classificado como latossolo vermelho férrico e alguns dos seus atributos químicos e físicos analisados a 0-20 cm de profundidades antes do início do estudo foram: pH em  $\text{CaCl}_2 = 5,4$ ; M.O. =  $20 \text{ g dm}^{-3}$ ; P =  $11 \text{ mg dm}^{-3}$ ; Ca =  $18 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Mg =  $5 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; K =  $2 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; SB =  $25 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; H+Al =  $28 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; CTC =  $53 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; V% = 47; Argila =  $518 \text{ g kg}^{-1}$ ; Silte =  $85 \text{ g kg}^{-1}$ ; Areia Grossa =  $278 \text{ g kg}^{-1}$ ; Areia Fina =  $119 \text{ g kg}^{-1}$ .

Finos de Carvão (FC), produzidos a partir da pirólise de *Eucalyptus* spp., foram coletados em plantas de produção de carvão vegetal em empresas no estado de São Paulo, amostrados para a sua caracterização granulométrica (Tabela 1) e química (Tabela 2), e encaminhados para o IAC e para a Embrapa Meio Ambiente. Na área experimental do IAC, no dia 17 de novembro de 2016, os FC foram incorporados ao solo até 20 cm de profundidade nas doses de: 0, 10, 20, 30, 40 e  $50 \text{ t ha}^{-1}$ .

**Tabela 1** - Granulometria do Fino de Carvão.

Peneira (Mesh)	Abertura (mm)	Resultado <sup>(1)</sup>
10	2,00	9,4%
20	0,84	34,3%
50	0,297	23,2%
> 50	< 0,297	33,1%

(1) % de Fino de Carvão retido na peneira.

**Tabela 2** - Composição química do Fino de Carvão.

Parâmetros	Unidade <sup>(1)</sup>	Resultado	Parâmetros	Unidade <sup>(1)</sup>	Resultado
pH (em água 1:10)	-----	7,6	Alumínio	g/kg	1,86
Umidade, a 60 – 65° C	% (m/m)	7,7	Boro	mg/kg	3,3
Sólidos Totais	% (m/m)	92,9	Cádmio	mg/kg	< 0,4 <sup>(2)</sup>
Sólidos Voláteis	% (m/m)	49,8	Cálcio	g/kg	27,1
Carbono Orgânico	g/kg	499	Chumbo	mg/kg	< 3,0 <sup>(2)</sup>
Nitrogênio Kjeldahl	g/kg	9,4	Cobre	mg/kg	13,7
Nitrogênio Amoniacal	mg/kg	59,7	Cromo Total	mg/kg	10,3
Nitrogênio nitrato-nitrito	mg/kg	32,7	Enxofre	g/kg	0,9
CTC	mmol/kg	79,5	Ferro	g/kg	1,29
Arsênio	mg/kg	10,4	Fósforo	g/kg	1,5
Bário	mg/kg	38,1	Magnésio	g/kg	1,3
Mercúrio	mg/kg	< 1,0 <sup>(2)</sup>	Manganês	mg/kg	275
Potássio	g/kg	6,38	Molibdênio	mg/kg	< 0,9 <sup>(2)</sup>
Selênio	mg/kg	< 1,0 <sup>(2)</sup>	Níquel	mg/kg	< 2,4 <sup>(2)</sup>
Sódio	mg/kg	1094	Zinco	mg/kg	40,3

(1) Resultados expressos na amostra em base seca;

(2) Não detectado, concentrações menores que o limite de detecção.

Três semanas após a incorporação dos FC na área, no dia 8 de dezembro de 2016, foi realizado o plantio de milho (cultivar IAC 8333), com espaçamento entre linhas de 0,9 m e entre plantas de 0,2 m. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis doses de FC (0, 10, 20, 30, 40 e 50 t ha<sup>-1</sup>) e quatro repetições, totalizando 24 parcelas. As parcelas foram constituídas de seis linhas com 6 metros de comprimento, sendo a área útil de cada parcela representada pelas quatro linhas centrais, excluindo-se 0,5 m de cada extremidade da linha.

Todas as parcelas, incluindo o Controle, receberam aplicação de calcário dolomítico para a elevar a saturação por bases (V%) a 60%. As adubações foram realizadas de acordo com o Boletim 100 do IAC (RAIJ et al.,1996) para uma produção de 6 a 8 t ha<sup>-1</sup>. Dessa forma, utilizou-se como fonte de NPK á formula 4-20-20, além de sulfato de amônio para completar a dose de N para 30 t ha<sup>-1</sup>. A adubação de cobertura foi com a aplicação de uréia, sendo realizada aos 25 e 45 dias após a emergência das plântulas.

### 3.2 Respiração Microbiana

A respiração do solo no campo experimental do IAC foi determinada pela medição do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) liberado do solo no 110º dia após o plantio. A determinação foi realizada com um “infra-red gas analyser (IRGA)” portátil composto por um leitor digital M170

(CARBOCAP®) e uma sonda GMP222 10000 ppm. Para a quantificação do CO<sub>2</sub> liberado, a sonda foi enterrada no solo a 5 cm de profundidade, na linha de plantio, por 5 minutos. Foram realizadas três leituras em cada repetição, num total de quatro repetições por tratamento.

### **3.3 Amostragem do Solo**

Para a avaliação dos efeitos da adição dos FC sobre a microbiota do solo, procedeu-se a amostragem do solo no 125º após o plantio, sendo realizada logo após a colheita do milho.

As coletas foram realizadas de forma casualizada nas quatro linhas centrais, em três pontos distintos, a uma profundidade de 0-20 cm da superfície. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, e transportadas do campo para o laboratório. Após as amostras serem recebidas no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, as mesmas foram peneiradas em malha de 2 mm, para a retirada de pedras, raízes e demais resíduos e, posteriormente, acondicionadas em refrigeração constante de 4 °C até o início das análises.

Para a avaliação da atividade e da biomassa microbiana do solo foram utilizados como indicadores as análises de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), atividade da fosfatase alcalina e urease, e determinado o carbono (CBM) e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM).

### **3.4 Biomassa Microbiana**

#### **3.4.1 Carbono da Biomassa Microbiana**

O CBM foi determinado pelo método de fumigação e extração em clorofórmio (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987; YEOMANS; BREMNER, 1988).

Para dar início as análises, foi realizada a pesagem de 10,0 g de solo de cada tratamento para a determinação de seu peso seco (em triplicata), depositando-se o solo em placas de Petri e levando-as a estufa à 105 °C por 24 horas. No dia seguinte, as placas foram retiradas da estufa e novamente pesadas para a determinação do fator de correção da umidade do solo, dividindo o peso seco pelo peso úmido das amostras correspondentes.

Em placas de Petri de 90 mm, realizou-se a pesagem de 30,0 g de solo de cada tratamento (em triplicata), sendo em seguida colocadas em um dessecador forrado com papel absorvente umedecido com água destilada. No centro do dessecador foi colocado um béquer com 25,0 mL de clorofórmio, e em seguida ligado o vácuo por 7 segundos e fechada a saída de ar. Posteriormente, o dessecador foi deixado em repouso por 24 horas no escuro para a fumigação das amostras.

Para as amostras não fumigadas, 30,0 g de solo de cada tratamento (em triplicata) foram depositadas em frasco tipo Snap Cap, adicionado 100 mL de sulfato de potássio 0,5 M e

colocados em agitação por 30 minutos a 170 rpm em mesa orbital. Após a agitação os frascos foram colocados em repouso por uma hora e meia e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº 42 e acondicionados na geladeira.

Passadas as 24 horas de fumigação das amostras, foi retirado o vapor de clorofórmio, em capela de exaustão, e realizada a transferência das amostras para frascos tipo Snap Cap, e seguido o mesmo procedimento das amostras não fumigadas, assim como descrito a cima.

Ao final, uma amostra de 8 mL de cada extrato foi transferida para tubos de digestão, adicionados 2 mL de solução de dicromato de potássio e 15 mL de solução de Ácido Sulfúrico e Sulfato de Potássio (2:1). Os tubos foram então colocados em bloco digestor a 100 °C por 30 minutos; finalizada a digestão e o esfriamento da amostra, o conteúdo de cada tubo foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL, e adicionado 7 gotas de indicador ferroína, sendo em seguida realizada a titulação utilizando solução padronizada de indicador ferroína, em bureta de 50 mL, até o ponto de viragem (mudança de cor de verde para vermelho).

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de Carbono g de solo<sup>-1</sup>.

### 3.4.2 Nitrogênio da Biomassa Microbiana

O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi determinado pelo método de fumigação e extração em clorofórmio (BROOKES et al., 1985) e os extratos destilados pelo método de Kjeldahl, de acordo com Wyland et al. (1994). Da mesma solução utilizada para análise do CBM, alíquotas de 20 mL de cada extrato foram colocadas em tubos de digestão, adicionado 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, 0,7 g de catalisador ( $\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4:\text{Se}$ , na relação 1:01:0,001), e acondicionadas em bloco digestor a 50 °C por 6 horas. Em seguida se procedeu o aumento da temperatura para 80 °C, *overnight* e no dia seguinte, à temperatura foi elevada a 150 °C por 1 hora e 30 minutos, e depois para 300 °C por 3 horas. Finalizado o processo de digestão das amostras, foi adicionado 5 mL de água ultrapura e iniciado o processo de destilação. No funil do destilador, adicionou-se 15 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>, e posteriormente 5 mL de indicador de ácido bórico, procedendo-se então a titulação em ácido sulfúrico a 0,0025 mol L<sup>-1</sup>.

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de Nitrogênio g de solo<sup>-1</sup>.

## 3.5 Atividade Microbiana

### 3.5.1 Urease

A atividade da urease foi determinada segundo metodologia descrita por Kandeler e Gerber (1988). Amostras compostas por 5 g de solo (em triplicata) foram depositadas em Erlenmeyers de 100 mL e misturadas com 200  $\mu\text{L}$  de tolueno, 9 mL de tampão TRIS (2-Amino-

2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) a  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e pH 9,0; e 1 mL de solução de ureia a  $200 \text{ mmol L}^{-1}$ . Posteriormente, as amostras foram levemente agitadas e colocadas em Banho Maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por duas horas. Após este período, foram adicionados 40 mL de solução de KCl- $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ , e na sequência as foram mantidas amostras em repouso por 30 min para a decantação do solo.

Para a destilação foi empregada a metodologia descrita por Tedesco et al. (1985). Alíquotas de 20 mL das suspensões foram transferidas para frascos de destilação de 100 mL, adicionado em seguida 0,2 g de MgO calcinado, e posicionado ao condensador um Erlenmeyer de 50 mL contendo 5,0 mL de indicador ácido bórico. Após estes procedimentos foi iniciado a destilação até a coleta de 35 mL de destilado. A titulação foi realizada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  padronizado com molaridade de 0,0050 N, sendo adotado o mesmo procedimento para a obtenção de três provas em branco, utilizando 20 mL da solução de KCl- $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ . Para os testes controle, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos acima, porém a adição de 1 mL da solução de ureia foi realizada após a incubação e a adição de 40 mL da solução de KCl- $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ .

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  de solo 2 horas<sup>-1</sup>.

### **3.5.2 Fosfatase Alcalina**

A determinação da atividade da fosfatase alcalina foi realizada de acordo com a metodologia preconizada por Tabatabai e Bremmer (1969). Amostras de 1 g de solo (em triplicata) foram pesadas, colocadas em frascos de penicilina e em seguida adicionado 4 mL de tampão maleato a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 11), e 1 mL p-nitrofenil fosfato a  $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ , preparado na mesma solução tampão. Após esta etapa, as amostras foram incubadas durante 1 hora a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo em seguida, adicionado 4 mL de NaOH a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e 1 mL de  $\text{CaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo posteriormente agitadas e filtradas em papel Whatman nº 2, e realizadas as leituras em espectrofotômetro a 400 nm. As concentrações de p-nitrofenol (PNP) presentes em cada amostra foram determinadas com base na curva padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g de p-nitrofenol g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### **3.5.3 Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (FDA)**

A análise de FDA seguiu a metodologia descrita por Schuner e Rosswal (1982) e modificada por Ghini et al. (1998). Amostras de 5,0 g de solo foram colocadas em Erlenmeyers de 250 mL (em triplicata) e em seguida adicionado 20 mL de solução tampão fosfato de potássio e 0,2 mL de solução estoque de FDA. As amostras foram então colocadas em agitador e incubadas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 20 mL de acetona, com a finalidade de interromper a reação, e realizada a filtragem das amostras utilizando-se papel

Whatman nº 1. Após a filtração, foi determinada a absorvância dos filtrados em espectrofotômetro a 490 nm. No preparo da curva padrão foram utilizadas as concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 µg de FDA hidrolisado. A quantificação de FDA hidrolisado em cada tratamento foi realizada com base na curva padrão. Os resultados foram expressos em µg de FDA hidrolisado g<sup>-1</sup> solo minuto<sup>-1</sup>.

### 3.6 Severidade da Murcha de *Fusarium*

Para a avaliação dos efeitos do FC sobre a murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raça 3) em tomateiro, foram realizados experimentos em casa de vegetação na Embrapa Meio Ambiente, na qual cada um foi composto por seis tratamentos (concentrações de FC) e cinco repetições. Adicionalmente ao solo coletado no IAC, foi utilizado outro solo, classificado como latossolo vermelho distroférrico, de textura argilosa (coletado na Embrapa Meio Ambiente), que após destorroado e peneirado foi amostrado e caracterizado quanto a sua fertilidade. Os resultados obtidos foram: pH em CaCl<sub>2</sub> = 4,5; M.O. = 19 g dm<sup>-3</sup>; P<sub>Resina</sub> = 5 mg dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> = 12,63 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> = 9,75 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup> = 0,85 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB = 23,23 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al = 27 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC = 50,23 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> e V% = 46,25.

O isolado 149 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raça 3), obtido junto à Sakata Seed Sudamérica foi utilizado nos experimentos. O patógeno foi cultivado em meio batata-dextrose-água (BDA) e armazenado pelo método de Castellani (1963). O inóculo foi crescido em placas de Petri contendo meio BDA, e incubado por sete dias a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h em incubadora do tipo BOD. Em Erlenmeyers de 500 mL, contendo aproximadamente 250 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), cinco discos de micélio do patógeno em pleno crescimento, com aproximadamente 5 mm de diâmetro, foram transferidos para os meios líquidos, sendo em seguida colocados sob agitação por 7 dias em mesa agitadora orbital à temperatura de 25 °C, no escuro. Após o período de incubação, uma alíquota de cada Erlenmeyer foi coletada e realizada a contagem de conídios em hemocitômetro, ajustando-se à suspensão na concentração de 1x10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>.

As infestações de ambos os solos, acondicionados com FC nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 t ha<sup>-1</sup> - solo originário do experimento conduzido no IAC e 0, 1, 2, 3, 4 e 5% (v/v), foram realizadas misturando 100 mL da suspensão de conídios por litro de solo e incubando-os em seus respectivos vasos (700 mL). Uma semana após a infestação, uma planta de tomateiro susceptível ao patógeno, cultivar Sotero<sup>®</sup>, foi transplantada por vaso e mantidas em casa de vegetação por 42 dias. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 5 repetições por tratamento e os experimentos repetidos duas vezes.

As avaliações do desenvolvimento da doença foram realizadas baseadas nos sintomas externos e internos, de acordo com duas escalas de notas adaptadas de Tokeshi e Galli (1966). Os sintomas externos foram avaliados semanalmente, segundo as seguintes notas: 1- planta sem sintoma; 2- planta com amarelecimento até a segunda folha; 3- planta com amarelecimento até a terceira folha; 4- planta com murcha e sem amarelecimento; 5- planta com murcha e amarelecimento e 6- planta morta. Com esses dados foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença para os sintomas externos e regressão para ambos. O escurecimento vascular foi avaliado no 42º dia de cultivo, sendo os caules cortados longitudinalmente, fotografados e a descoloração interna avaliada de acordo com as notas: 1- planta sem escurecimento dos vasos; 2- planta com escurecimento dos vasos até a altura da primeira folha; 3- planta com escurecimento dos vasos até a segunda folha; 4- planta com escurecimento dos vasos até a terceira folha; 5- planta com escurecimento dos vasos até a metade do comprimento do caule e 6- planta com escurecimento até próximo do ponteiro.

A altura, diâmetro do caule, número de folhas e as massas secas e frescas das partes aéreas e radiculares das plantas também foram avaliadas ao 42º dia de cultivo. Uma régua foi utilizada para medir a altura (superfície do solo até o ponteiro) e um paquímetro digital para avaliar o diâmetro do caule a dois cm da superfície do solo. As raízes foram lavadas e pesadas, assim como a parte aérea das plantas, e em seguida secas em estufa a 50 °C, por dez dias, até peso constante, sendo as massas determinadas em balança semi-analítica.

### **3.7 Finos de Carvão como Promotor de Crescimento de Plantas**

Em solo proveniente da área experimental da Embrapa Meio Ambiente foi realizada a incorporação de FC nas concentrações de 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15% (v/v), os quais foram umedecidos e incubados em seus respectivos vasos (3 L). Mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cultivar Santa Clara<sup>®</sup>, foram formadas em bandejas de poliestireno expandido de 128 células, contendo substrato comercial livre de patógenos; e realizado o transplântio de uma muda de 30 dias de idade por vaso. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 5 repetições por tratamento.

Após o transplântio, foi efetuado o acompanhamento do crescimento das plantas semanalmente, realizando-se a medição da altura das mesmas da superfície do solo até o ponteiro, durante sete semanas. No 28º dia após o transplântio, foi realizada a coleta dos três folíolos terminais do sexto pecíolo de todas as plantas e tratamentos e determinada área foliar total, utilizando-se um medidor de área LI-3100C (LI-COR<sup>®</sup>), sendo em seguida determinadas as massas frescas e secas dos folíolos coletados. No 42º dia após o transplântio, o diâmetro do

caule das plantas foi medido com um paquímetro digital, a dois cm da superfície do solo; as raízes lavadas, e realizada a pesagem das partes aéreas e radiculares, sendo em seguida secas em estufa a 50 °C, até peso constante, e determinadas suas respectivas massas secas.

Ao final, as folhas de todas as plantas foram coletadas e separadas em seus respectivos tratamentos, maceradas, amostradas, e enviadas ao Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras para a quantificação de macro e micronutrientes presentes nas amostras.

### 3.7.1 Produção de Enzimas Relacionadas a Defesa de Plantas

Para a determinação da atividade de enzimas relacionadas à defesa das plantas, Peroxidase (PO), Polifenoloxidase (PPO), Fenilalanina amônia-liase (FAL) e Proteínas totais (PT), foram coletadas amostras de folhas de tomateiro de cada tratamento. A coleta foi realizada 30 dias após o transplante das mudas, as quais foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e depositadas em nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o preparo dos extratos.

Na preparação dos extratos, aproximadamente 1 g de folhas foram pesadas e maceradas em nitrogênio líquido com pistilo em um almofariz. O pó formado foi novamente macerado em 10 mL de solução tampão fosfato de sódio a 50 mmol L<sup>-1</sup> e pH 6.5, com polivinilpirrolidona a 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mmol L<sup>-1</sup> (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm, a 4 °C por 25 min, para posterior recuperação dos sobrenadantes, que foram depositados em microtubos e armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

Para a quantificação da atividade das proteínas totais, foi adicionado 20 µL de extrato para 200 µL de solução de Bradford:Água (7:3) para posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A curva padrão utilizada para comparação dos dados foi preparada com albumina, gerando a equação  $y = 1,0467x - 0,063$  ( $R^2 = 0,9487$ ), com os dados expressos em mg de proteína mL<sup>-1</sup> de extrato.

A Fenilalanina amônia-liase (FAL) foi quantificada através da leitura das absorbâncias a 290 nm, com a adição de 90 µL de tampão Borato 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,8), 90 µL de L-fenilalanina 60 mmol L<sup>-1</sup> e 20 µL do extrato. Após 20 minutos de incubação a 37 °C a reação foi interrompida com adição de 15 µL de HCl 6N (CAKIR; ARI, 2009; PASCHOLATI; NICHOLSON; BUTLER, 1986). Os dados foram comparados a curva-padrão para o ácido trans-cinâmico que gerou a equação  $y = 163,13x + 10,243$  ( $R^2 = 0,9661$ ), com dados expressos em µmol de ácido trans-cinâmico mg<sup>-1</sup> de proteína min<sup>-1</sup>.

A atividade da Peroxidase (PO) foi determinada pela reação de 20  $\mu\text{L}$  de extrato em, 60  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 6,5), 60  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 3 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 60  $\mu\text{L}$  de guaiacol 15 mmol  $\text{L}^{-1}$ . As leituras de absorbância foram realizadas a 470 nm, com 20 ciclos de 10 segundos a 30 °C (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUĆ, 1982). Os resultados foram expressos em unidades de PO  $\text{mg}^{-1}$  de tecido  $\text{min}^{-1}$ , sendo que, uma unidade foi definida com incremento de absorbância de 0,01 por min de reação por mg de tecido (HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

A atividade da Polifenoloxidase (PPO) foi determinada utilizando-se 200  $\mu\text{L}$  de pirocatequina a 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  em tampão fosfato de sódio 100 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 6,8 e 20  $\mu\text{L}$  de extrato. A leitura da absorbância foi realizada a 420 nm, de 30 em 30 segundos até 10 min, a 30 °C. A diferença entre a primeira e a última leitura foi utilizada para o cálculo da atividade, expressa em unidades de PPO  $\text{mg}^{-1}$  de tecido  $\text{min}^{-1}$ , sendo que, uma unidade foi definida como um incremento de absorbância de 0,001 por min de reação por mg de tecido (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

### **3.8 Efeito de Extrato Aquoso de Finos de Carvão Sobre o Crescimento Micelial e na Germinação de Microconídios de *Fusarium oxysporum***

O extrato aquoso foi preparado adicionando-se FC em água destilada na proporção de 1:5 (FC:água), sendo em seguida triturados com um mixer, até quebra e uniformização das partículas. Após homogeneização, a mistura foi transferida para Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, colocadas sob agitação a 120 rpm por dois dias e filtradas por duas vezes em gaze e papel filtro quantitativo.

Para avaliação de seu efeito no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3, foram adicionadas frações do extrato aquoso ao meio BDA, nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 e 100% (v/v) (Tabela 3); sendo o pH dos tratamentos ajustados de acordo com o controle (pH 6,8  $\pm$  0,1), e em seguida autoclavados a 121 °C por 20 min. Os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, pipetando-se 10 mL do meio por placa. Após a solidificação, foi transferido ao centro de suas respectivas placas, um disco de 5 mm de diâmetro de micélio de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raça 3), crescido em meio BDA, a 25  $\pm$  2 °C, por sete dias. As placas contendo *F. oxysporum* foram mantidas no escuro a 25 °C por sete dias. As avaliações foram realizadas diariamente medindo-se o diâmetro da colônia em duas direções perpendiculares. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

**Tabela 3.** Volume de extrato aquoso de Finos de Carvão incorporados ao BDA no crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

Tratamento	Extrato (mL)	Água (mL)
0%	0	200
5%	10	190
10%	20	180
15%	30	170
20%	40	160
25%	50	150
50%	100	100
75%	150	50
100%	200	0

Para avaliar o efeito do extrato aquoso na germinação de microconídios de *F. oxysporum*, 50 mL do extrato foram filtradas em membrana milipore Millex-GS® com diâmetro de poro de 0,22 µm. Foram utilizadas seis concentrações do extrato (0, 5, 10, 20, 25 e 50% (v/v)) (Tabela 4), os quais foram preparados e pipetados (10 µL) sobre gotas de 10 µL de suspensão de conídios na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>, contidas em lâminas de vidro.

**Tabela 4.** Concentração de extrato aquoso de Finos de Carvão misturados na suspensão de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

Tratamento	Extrato ( $\mu\text{L}$ )	Água ( $\mu\text{L}$ )	Suspensão de Microconídios ( $\mu\text{L}$ )
0%	0	10	10
5%	1	9	10
10%	2	8	10
20%	4	6	10
25%	5	5	10
50%	10	0	10

Os conídios foram obtidos pelo cultivo do fungo por sete dias em meio BDA a  $25 \pm 2$  °C, no escuro. As lâminas contendo as suspensões foram colocadas em placas de Petri de 150 mm, sobre papel toalha umedecido com 5 mL de água destilada, e mantidas a  $25 \pm 2$  °C. Após 6 h, a germinação dos microconídios foi paralisada com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de azul de lactofenol e realizada em seguida a contagem de 100 microconídios por gota. O número de esporos germinados e não germinados foram contabilizados, sendo os resultados expressos em porcentagem. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

### 3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico Sisvar. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, quando necessário, foram realizadas as devidas transformações. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância ( $p < 0,05$ ) e regressão. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

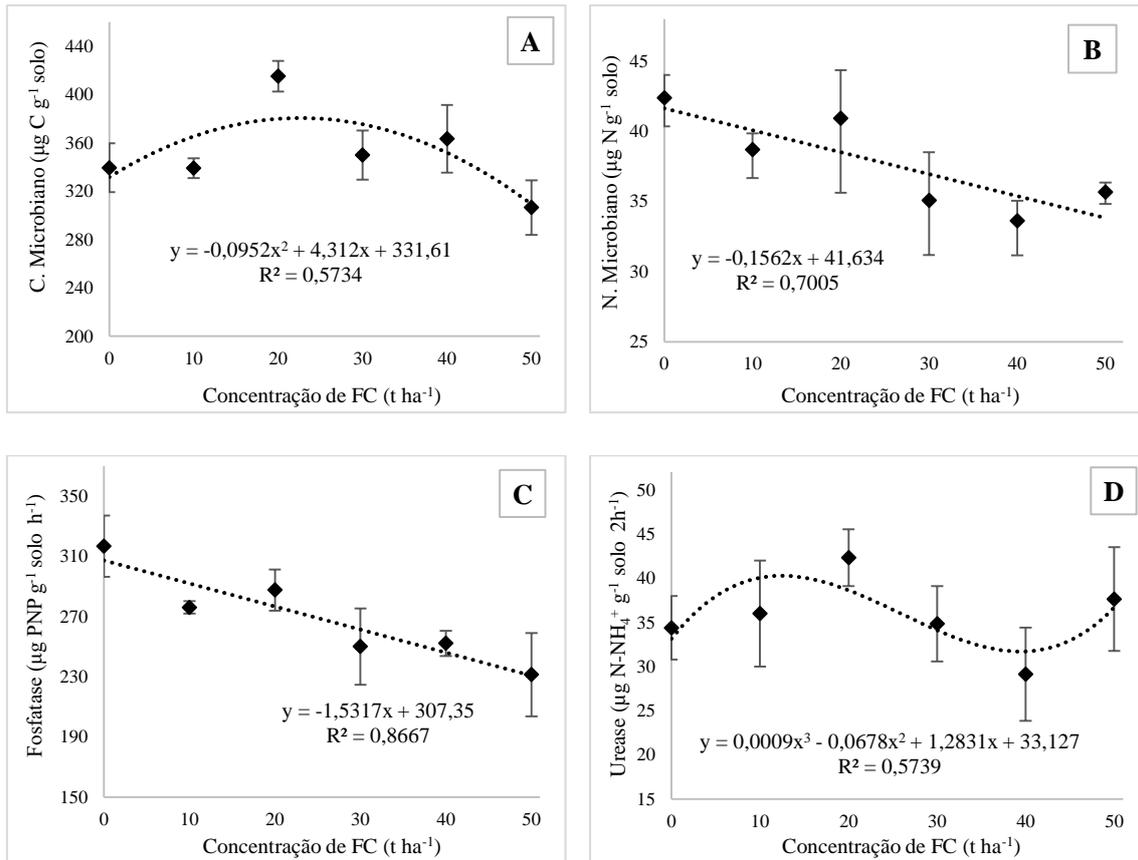
## 4 RESULTADOS

Os Finos de Carvão utilizados nos experimentos estão de acordo com a Lei nº 6.894/1980 – Decreto nº 4.954/2004 e com a instrução normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária nº 27, 05 de junho de 2006, que define os limites máximos de contaminantes e metais pesados admitidos em fertilizantes orgânicos e condicionadores de solo.

### 4.1 Atividade e Biomassa Microbiana do Solo

A biomassa microbiana do solo, coletado no experimento conduzido no IAC, foi significativamente influenciada pela adição de FC ( $p < 0,05$ ). O CBM foi incrementado de forma significativa somente na concentração de 20 t ha<sup>-1</sup>, com índices 29% superiores ao controle (Figura 1A), enquanto o NBM foi alterado de forma adversa, havendo reduções em seus teores no solo a partir da concentração de 30 t ha<sup>-1</sup>, com valores até 20% inferiores ao controle, enquanto as demais concentrações não sofreram modificações (Figura 1B).

A atividade microbiana do solo, coletado no experimento conduzido no IAC, também foi significativamente influenciada pela adição de FC ( $p < 0,05$ ). No entanto, somente a atividade das enzimas Fosfatase e Urease apresentaram diferenças. A atividade da Fosfatase no solo apresentou tendência similar ao NBM, havendo redução em sua atividade a partir da concentração de 30 t ha<sup>-1</sup>, enquanto as demais doses foram estatisticamente equivalentes ao controle (Figura 1C). A atividade da Urease foi elevada somente na concentração de 20 t ha<sup>-1</sup> (15%), enquanto as demais não foram alteradas, exceto para a concentração de 40 t ha<sup>-1</sup>, que obteve decréscimos de 33% em sua atividade no solo (Figura 1D). A hidrólise de diacetato de fluoresceína e a respiração microbiana não foram significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciadas pela adição de FC ao solo.



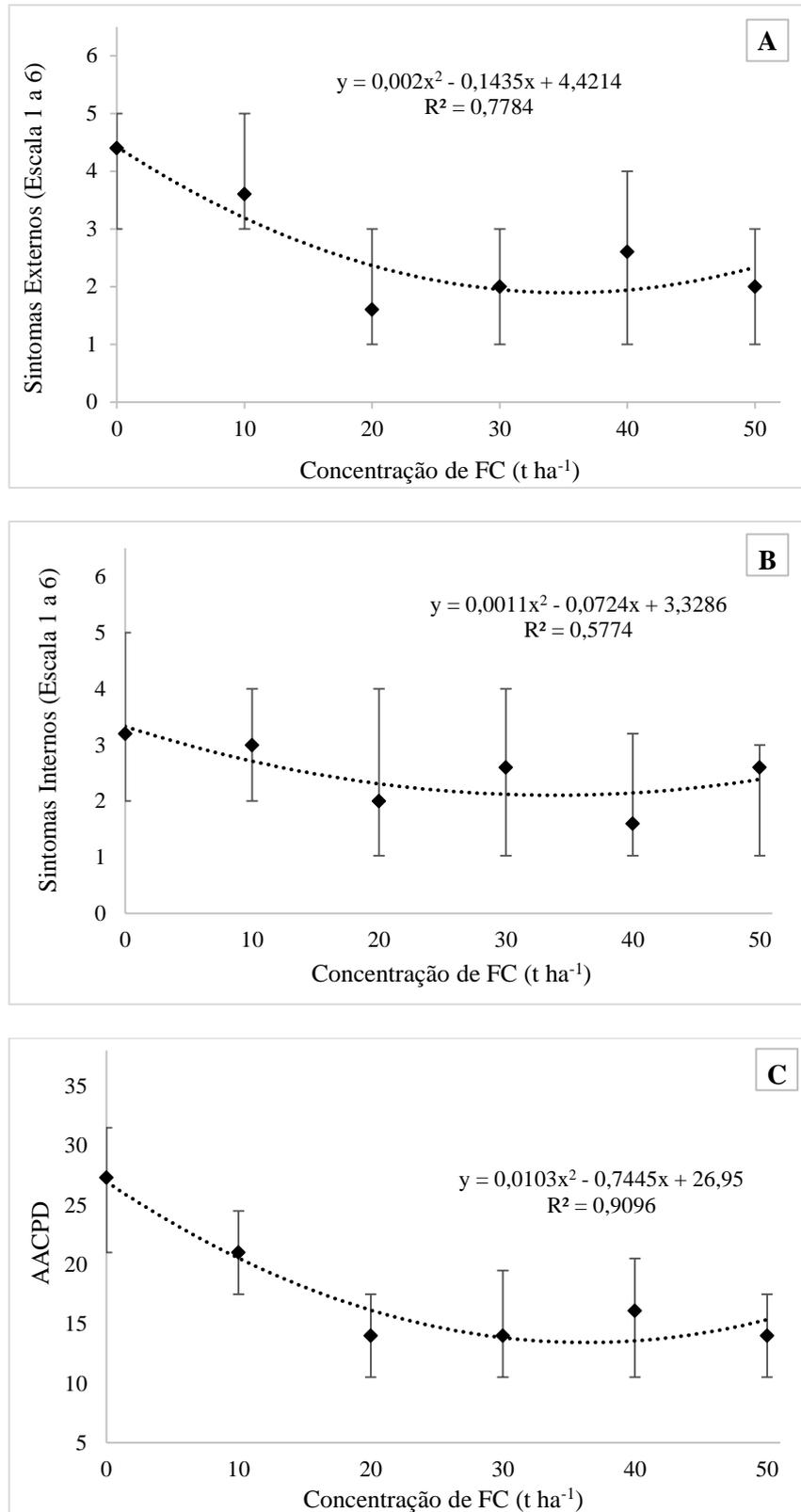
**Figura 1** – Carbono Microbiano (A); Nitrogênio Microbiano (B); Atividade da Urease (C) e Atividade da Fosfatase (D) em solo condicionado com Finos de Carvão. Barras de erros representam o desvio padrão.

#### 4.2 Severidade da Murcha de *Fusarium* no Tomateiro

A incorporação de FC aos dois solos promoveram diferentes respostas no desenvolvimento do tomateiro e na severidade da murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

No solo coletado no IAC, não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no desenvolvimento do tomateiro para nenhuma das variáveis analisadas, com número de folhas variando de 9,8 a 11; diâmetro da haste entre 5,64 mm e 6,43 mm; altura entre 61,2 cm e 67,2 cm; massa seca da raiz entre 1,55 g e 2,08 g e massa seca da parte aérea entre 8,49 e 11,21 g.

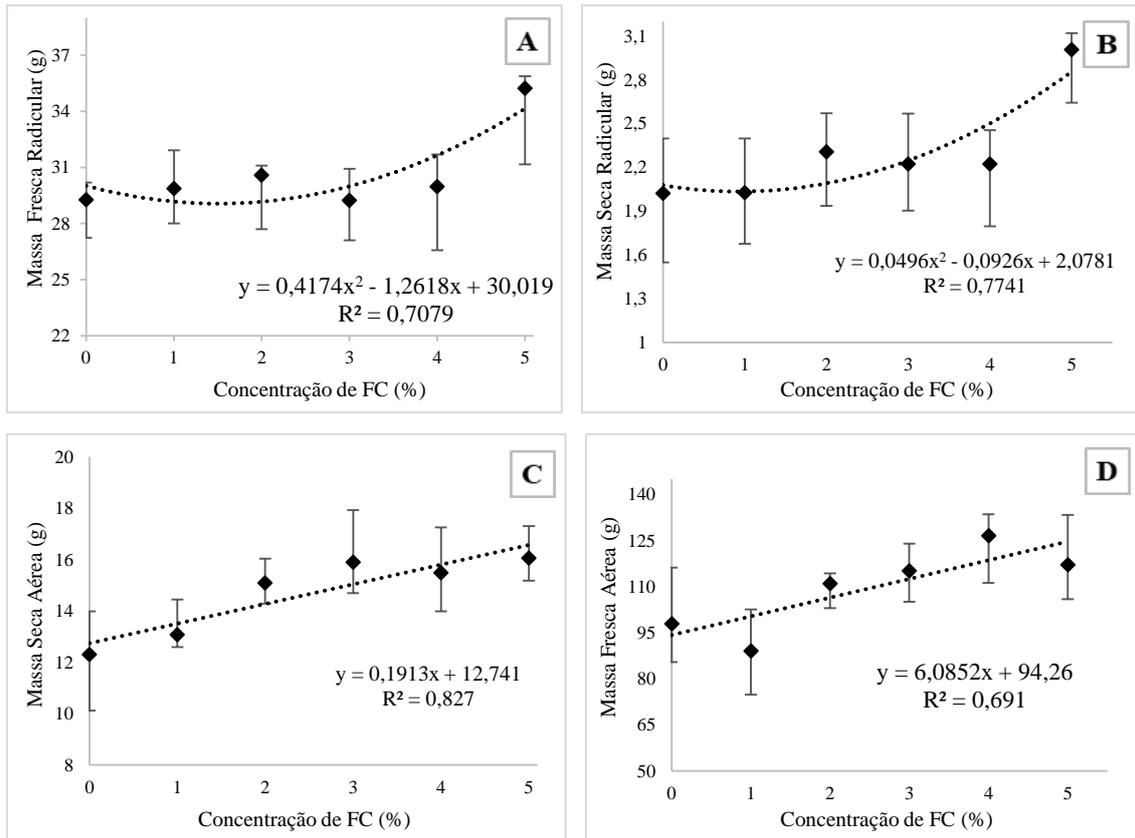
Para os sintomas externos causados pela murcha de *Fusarium* (Figura 2A) verifica-se uma tendência de redução dos sintomas com o aumento das concentrações de FC. A tendência de redução é expressa por uma equação quadrática ( $y = 0,002x^2 - 0,1435x + 4,4214$ ), indicando um ponto de inclinação entre 30 e 40 t ha<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,78$ ). Por outro lado, até a avaliação realizada aos 35 DAT não foram verificadas diferenças dentro das datas (dados não apresentados). Entretanto, na última avaliação as concentrações de 20, 30, 40 e 50 t ha<sup>-1</sup> diferiram do controle (dados não apresentados). Para os sintomas internos, tendência similar foi observada, porém de forma mais sutil, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2B). A área abaixo da curva do progresso da doença foi significativamente menor para os tratamentos que receberam concentrações de FC igual ou superior a 20 t ha<sup>-1</sup> (Figura 2C).



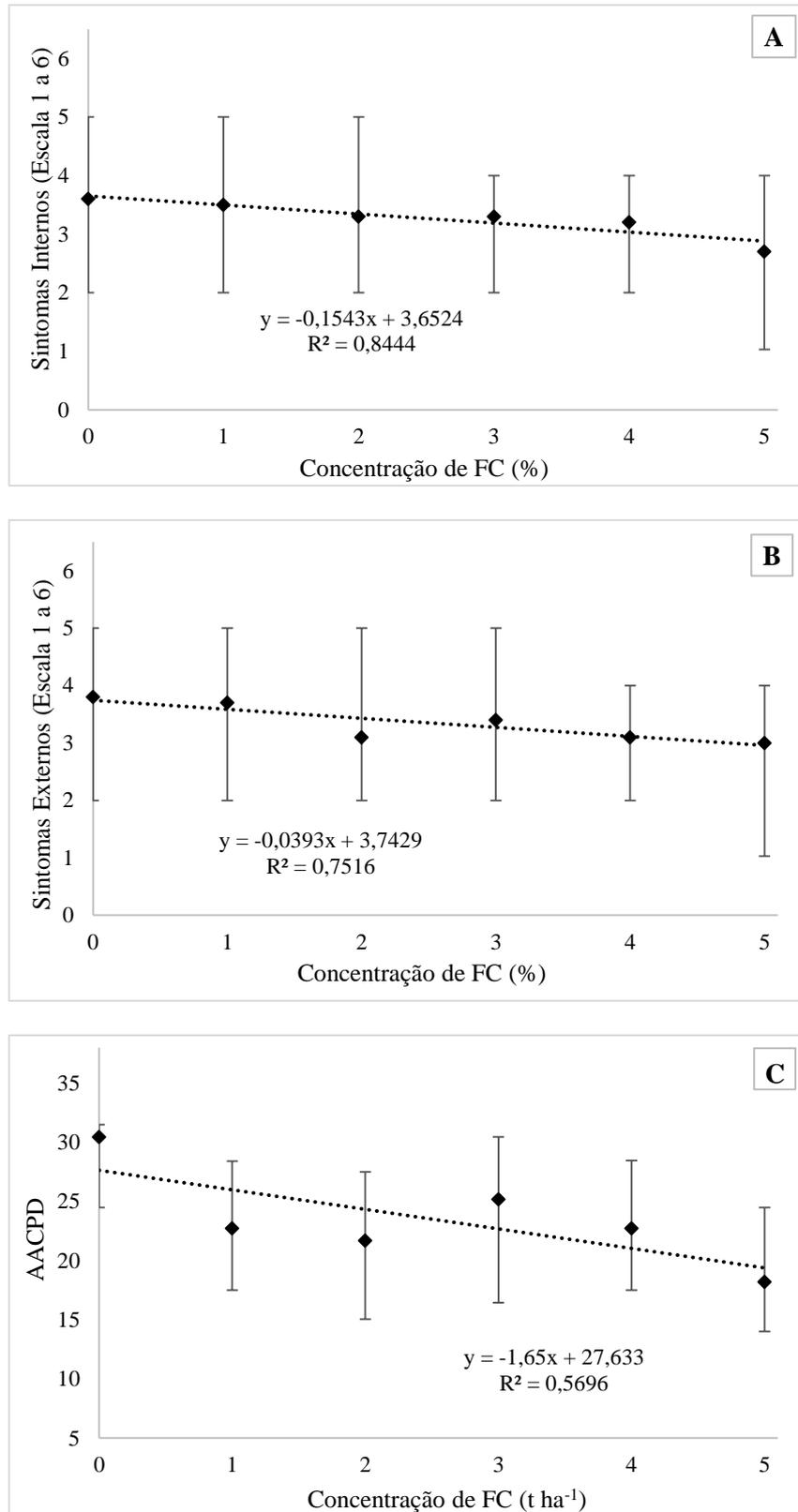
**Figura 2** - Severidade da murcha e amarelecimento (A); do escurecimento vascular (B); e área abaixo da curva de progresso da doença (C) em tomateiro com 42 dias após o transplante em solo condicionado com Finos de Carvão e infestado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. Barras de erros representam o desvio padrão.

Para o segundo solo, coletado na Embrapa Meio Ambiente, não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento do tomateiro para as variáveis número de folhas, diâmetro do caule e altura de plantas, entre as diferentes concentrações de FC utilizadas com a presença do patógeno. Entretanto, as massas frescas e secas do sistema aéreo e radicular diferiram entre as concentrações estudadas. As massas frescas e secas do sistema radicular foram significativamente incrementadas na concentração de 5% de FC, havendo ganhos de 17 e 32% (Figuras 3A e 3B), respectivamente. Já as massas frescas e secas da parte aérea, apresentaram ganhos a partir da concentração de 2%, alcançando índices 22 e 23% superiores a testemunha (Figuras 3C e 3D).

A severidade da murcha de *Fusarium* do tomateiro, avaliada em relação aos sintomas externos e internos, também apresentou tendência de redução com o aumento da concentração de FC incorporados ao solo. Para os sintomas externos e internos a resposta foi linear com  $R^2 = 0,75$  e  $R^2 = 0,84$  (Figura 4A e 4B), respectivamente. Na avaliação dos sintomas internos não foram encontradas diferenças nas datas avaliadas (dados não apresentados). Em relação a AACPD, todos os tratamentos que receberam FC foram observadas reduções na severidade da doença, com os menores índices na dose de 5% (Figura 4C).



**Figura 3** – Massa fresca do sistema radicular (A); massa seca do sistema radicular (B); massa seca da parte aérea (C); massa fresca da parte aérea (D) de plantas de tomateiro cultivados em solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e condicionado com Finos de Carvão. Barras de erros representam o desvio padrão.

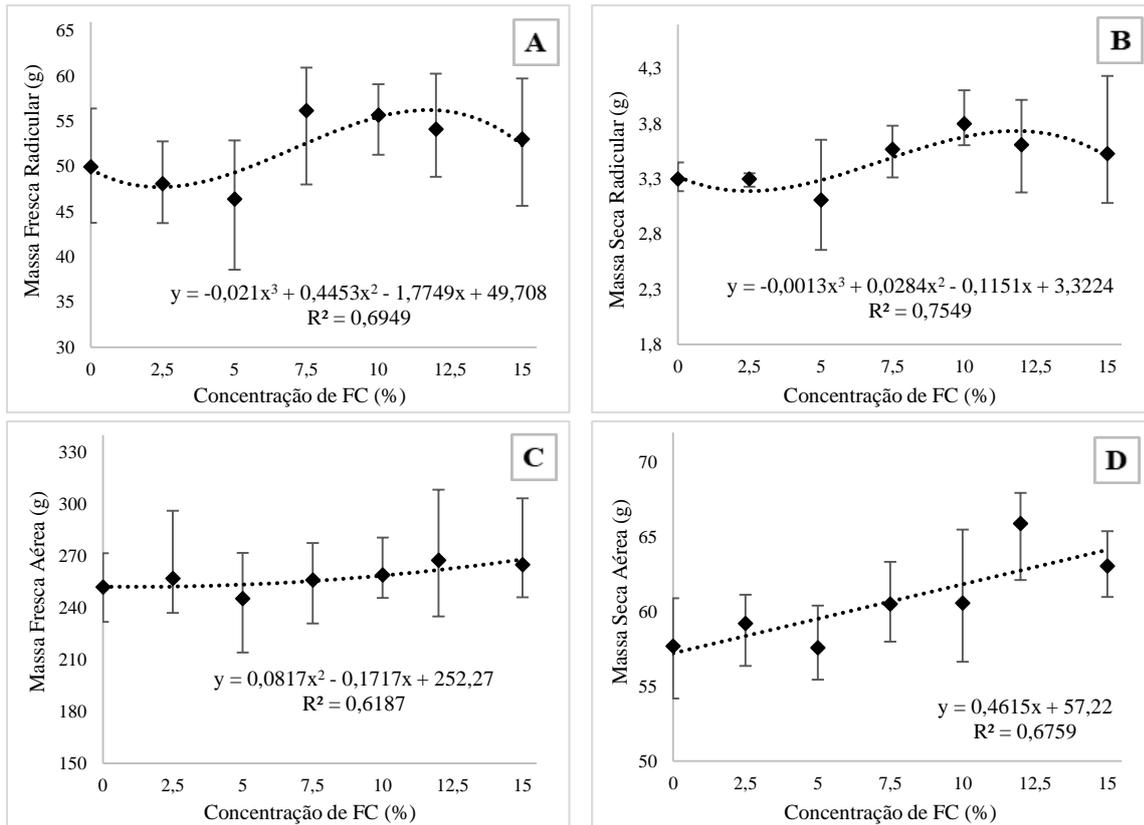


**Figura 4** - Severidade do escurecimento vascular (A); da murcha e amarelecimento (B); e área abaixo da curva de progresso da doença (C) em tomateiro com 42 dias após o transplante em solo condicionado com Finos de Carvão e infestado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. Barras de erros representam o desvio padrão.

### **4.3 Promoção de Crescimento e Produção de Enzimas Relacionadas a Defesa de Plantas**

A incorporação de FC de carvão ao solo para o cultivo do tomateiro apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) somente para as variáveis massa seca aérea e massas frescas e secas do sistema radicular. As raízes apresentaram incrementos de matéria fresca e seca a partir da concentração de 7,5%, alcançando índices até 12 e 16% superiores ao controle, respectivamente (Figura 5A e 5B). As massas frescas aéreas não diferiram entre si, enquanto as secas obtiveram ganhos de até a 14% (Figura 5C e 5D). Os FC não promoveram diferenças significativas para as variáveis altura de plantas, taxa de crescimento e diâmetro do caule.

Os FC não promoveram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) sobre a área foliar e massa fresca e seca dos folíolos coletados e analisados (dados não apresentados). Também não foram observadas diferenças na composição de macro e micronutrientes no limbo foliar do tomateiro (Tabela 5).

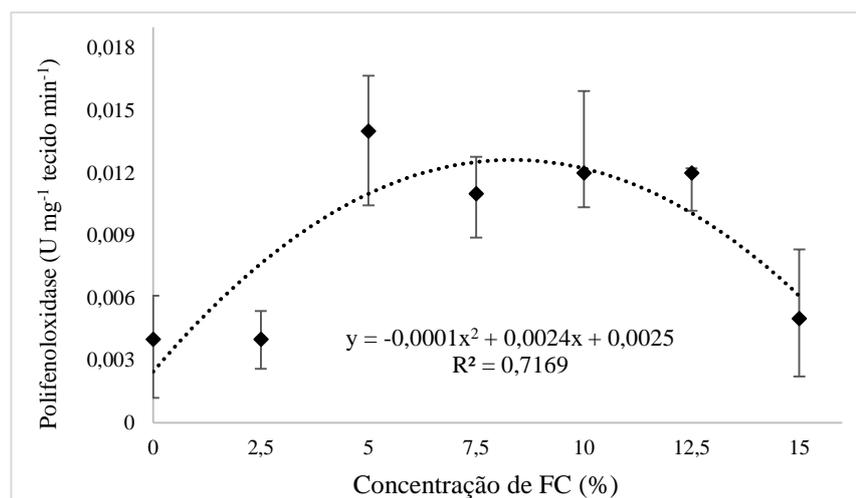


**Figura 5** – Massa fresca do sistema radicular (A); massa seca do sistema radicular (B); massa fresca da parte aérea (C); massa seca da parte aérea (D) de plantas de tomateiro cultivados em solo condicionado com Finos de Carvão. Barras de erros representam o desvio padrão.

**Tabela 5** – Composição de macro e micronutrientes no limbo foliar de tomateiro cultivado em solo condicionado com Finos de Carvão.

Tratamento	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	S (%)	B (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)
0%	1,71	0,18	1,23	1,43	0,32	0,91	26,57	0,82	89,72	6,45	145,76
2,5%	1,56	0,18	1,63	1,50	0,35	0,77	35,21	0,76	88,33	13,31	123,65
5%	1,60	0,18	1,71	1,35	0,33	0,76	35,06	0,83	72,35	42,83	110,44
7,5%	1,61	0,18	1,66	1,28	0,31	0,62	44,45	0,82	84,44	11,63	141,94
10%	1,56	0,16	1,67	1,35	0,32	0,77	37,63	1,15	62,25	13,05	116,02
12,5%	1,60	0,16	1,57	1,57	0,36	0,77	42,33	0,37	67,26	14,95	111,81
15%	1,37	0,15	1,43	1,43	0,30	0,75	43,85	0,52	62,89	7,39	125,46

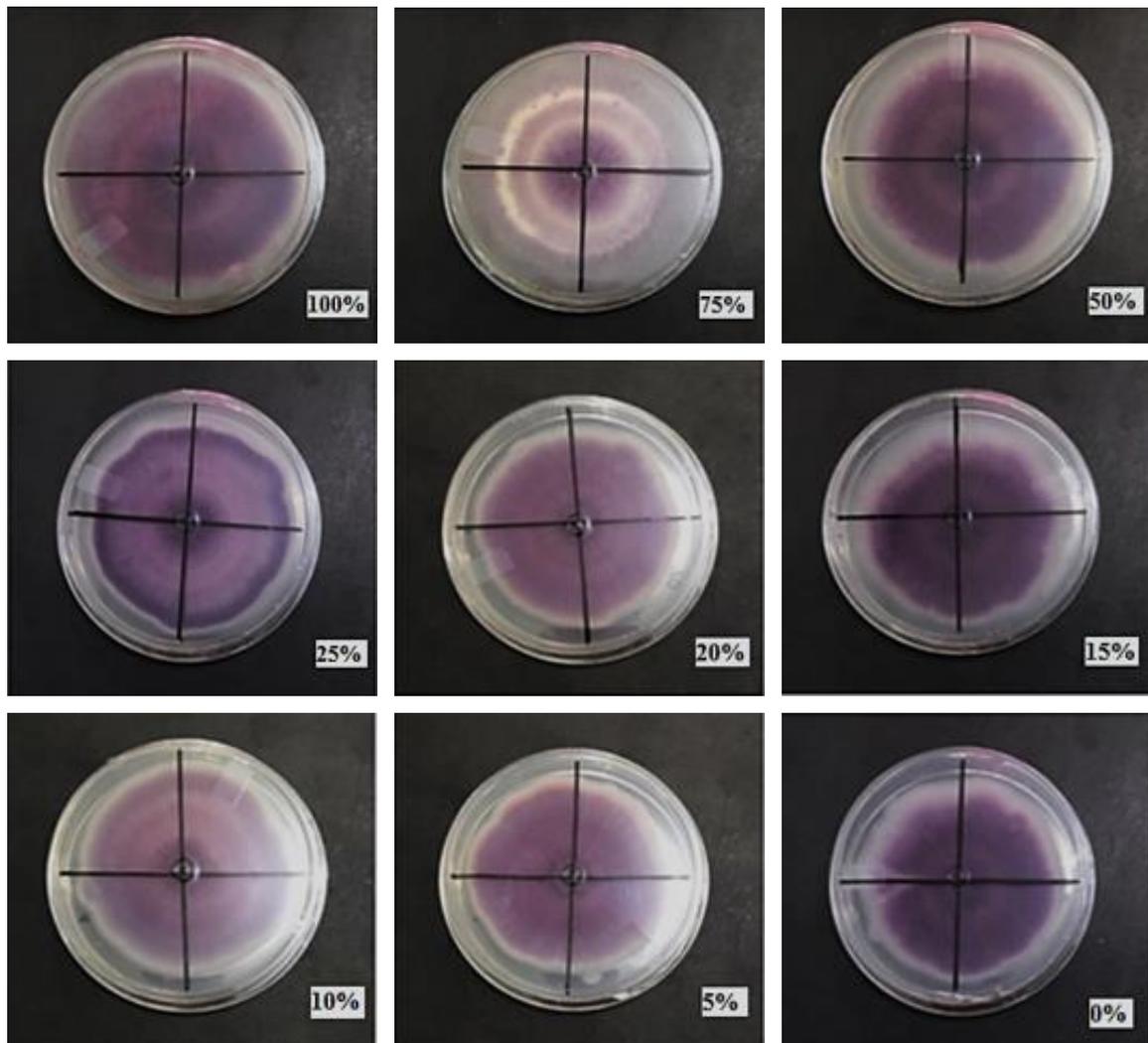
Somente a atividade da polifenoloxidase (PPO) expressada pelo tomateiro, tratado com crescentes concentrações de FC ao solo, foi significativamente ( $p < 0,05$ ) superior ao controle, e as contribuições de cada tratamento estão representados na Figura 6. A aplicação de FC ao solo, nas concentrações de 20; 30, 40 e 50 t ha<sup>-1</sup> resultaram em maiores taxas de atividade da PPO, apresentando tendência de aumento em sua expressão nas folhas de tomateiro em até 28%, quando comparado ao controle, com posterior redução na dose de 15%, sendo expressa por uma equação quadrática ( $-0,0001x^2 + 0,0024x + 0,0025$ ) com  $R^2 = 0,71$ .



**Figura 6** – Expressão enzimática da Polifenoloxidase em folhas de tomateiro, cultivados em solo condicionado com Finos de Carvão. Barra de erros representam o desvio padrão.

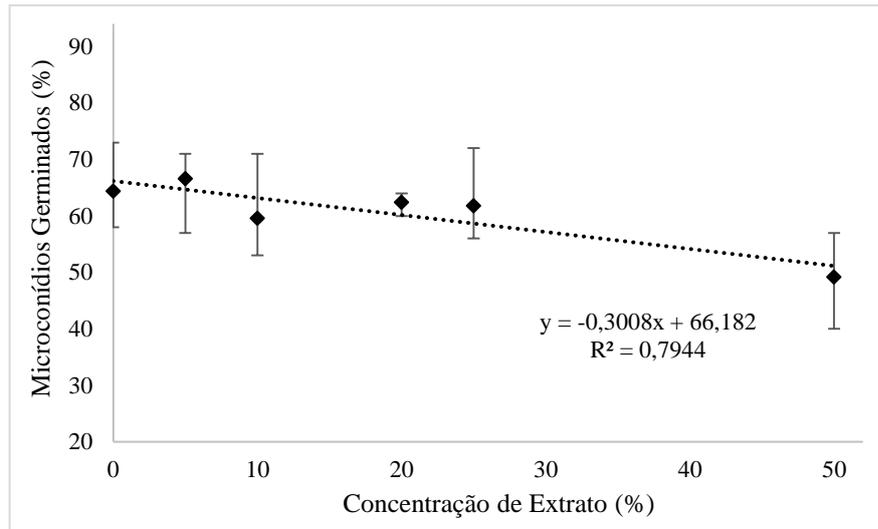
#### 4.4 Extrato Aquoso de Finos de Carvão no Crescimento Micelial e Germinação de Microconídios de *Fusarium oxysporum*

Não foram observados incrementos ou efeitos inibitórios no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelo extrato aquoso de finos de carvão (Figura 7) em nenhuma das concentrações utilizadas no teste *in vitro*.



**Figura 7** – Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em BDA com crescentes concentração de extrato aquoso de FC.

A germinação de microconídios foi reduzida com as crescentes concentrações de extrato aquoso de FC, apresentado tendência de redução a partir da dose de 10%, com uma curva de resposta linear ( $R^2 = 0,79$ ), alcançando índices até 23,6% inferiores à testemunha, na maior concentração utilizada (Figura 8).



**Figura 8** - Germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* após a aplicação de doses crescentes (0; 5; 10; 20, 25 e 50%) de extratos aquosos de Finos de Carvão.

## 5 DISCUSSÃO

O uso de resíduos orgânicos na agricultura como condicionadores de solos no manejo de fitopatógenos habitantes do solo é reportado há décadas (BAILEY; LAZAROVITS, 2003; PANE et al., 2011). Porém, os resultados são muitas vezes inconsistentes e sua eficiência no controle da doença depende de muitas características, como o tipo do resíduo, relação C/N, quantidade aplicada, tipo de solo, época de incorporação e do patossistema (TERMORSHUIZEN et al., 2006).

Neste sentido, a biomassa microbiana exerce grande influência, pois ela é responsável pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes nos ecossistemas terrestres, sendo de suma importância para a manutenção da fertilidade dos solos (GUO et al., 2012). Nesse aspecto, as enzimas são importantes mediadoras das atividades realizadas pelos microrganismos no solo, atuando como indicadores de importantes processos biológicos do solo (TABATABAI; DICK, 2002; CALDWELL, 2005). Algumas enzimas são ativas apenas em células vivas, enquanto enzimas envolvidas na quebra de macromoléculas devem ser transportadas para fora de suas células, a fim de alcançar um contato próximo com os substratos (SINSABAUGH et al., 2008). Portanto, as exoenzimas hidrolíticas microbianas são de particular interesse porque catalisam importantes processos metabólicos, como degradação da matéria orgânica, mineralização e ciclagem de nutrientes.

A aplicação e incorporação de crescentes concentrações de FC mostrou resultados significativos para a biomassa e atividade microbiana do solo, porém os resultados evidenciam que apenas em determinadas doses estes atributos são significativamente incrementados no solo, enquanto em alguns casos, a utilização em maiores concentrações apresenta efeitos adversos, sinalizando a existência de uma dose ótima. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, somente a aplicação e incorporação de 20 t ha<sup>-1</sup> de FC se mostrou eficaz em promover aumentos no Carbono Microbiano e na Atividade da Urease no solo, com valores 29 e 15% superiores ao controle, respectivamente, enquanto o Nitrogênio Microbiano e a Atividade da Fosfatase não foram significativamente alterados, porém, a partir da concentração 30 t ha<sup>-1</sup>, significativas reduções em seus teores foram encontradas no solo.

O aumento do CBM encontrado neste trabalho, foi consistente com o estudo relatado por Zackrisson et al. (1996), que investigando os efeitos do carvão nas propriedades microbianas do solo em seis locais, descobriu que a biomassa microbiana era aumentada quando colocada adjacente às partículas de carvão; e por Pietikanen et al. (2000), que observaram maiores taxas de crescimento específico de comunidades microbianas em camadas de solo

enriquecidas com carvão vegetal; evidenciando que os microrganismos são capazes de utilizar frações do carbono do biocarvão para crescerem (ZHANG et al., 2014).

Demisie e Zhang (2015) ao estudarem a atividade enzimática e a biomassa microbiana em solos degradados e condicionados com biocarvão, também observaram tendências semelhantes aos encontrados neste trabalho para o CBM e para a atividade da fosfatase e urease. O CBM foi elevado com a aplicação de FC ao solo, sendo as doses de, aproximadamente, 10 e 20 t ha<sup>-1</sup> as que obtiveram os melhores resultados, sendo em seguida reduzido na dose seguinte (40 t ha<sup>-1</sup>). Em relação a fosfatase, a aplicação de biocarvão promoveu significativas reduções em sua atividade no solo, na qual o tratamento controle (sem biocarvão) foi o que obteve a maior atividade enzimática. A urease também apresentou tendência de crescimento até a dose de 20 t ha<sup>-1</sup>, porém, diferentemente do observado neste trabalho a dose seguinte não teve efeito adverso em sua atividade, mantendo a tendência de crescimento até a dose de 40 t ha<sup>-1</sup>.

Porém, apesar dos resultados estarem de acordo com outros trabalhos, resultados contrastantes também são comumente observados, pois a atividade microbiana é facilmente afetada por fatores abióticos e não somente pela quantidade do BC, mas também pela qualidade do produto utilizado (JIN, 2010), tendo em vista que cada BC apresenta características e propriedades únicas, sendo altamente influenciados pela biomassa utilizada, condições empregadas no processo de pirólise e suas interações com o ambiente.

Reduções na biomassa microbiana do solo após a adições de BC também foram relatadas, sugerindo que mudanças na estrutura da comunidade microbiana do solo ocorrem (DEMPSTER et al., 2012), levando ao aumento de microrganismos lignocelulolíticos, ou ainda devido à alta concentração de compostos químicos presentes nos BC, que podem atuar como biocidas (JAISWAL et al., 2014). Segundo Graber et al. (2010) há evidências de que os compostos químicos presentes nos BC possam atuar por hormese (baixa dose – estimulação; alta dose - inibição), podendo esta ser uma possível explicação para os decréscimos na atividade microbiana em maiores concentrações.

O aumento na atividade da urease observado na concentração de 20 t ha<sup>-1</sup> corrobora com os dados encontrados para o CBM, pois este também representa um bom indicador da qualidade dos solos. Diversos estudos destacaram o efeito da aplicação de resíduos orgânicos na atividade da urease (TRANNIN; SIQUEIRA, MOREIRA, 2007). Segundo Du et al. (2014), as aplicações de BC promoveram aumentos significativos na atividade da urease na camada de 0-5, 5-10, 10-20 e 20-30 cm de profundidade durante o período de crescimento de trigo. No entanto, segundo Jin (2010), a atividade de algumas enzimas como a glucosidase e da celobiosidase podem diminuir com a aplicação de 12 t ha<sup>-1</sup> ou mais de BC. Reduções similares na atividade

enzimática também foram observadas com enzimas purificadas e BC de rápida pirólise produzido a partir de *Panicum virgatum* (BAILEY et al., 2010). Uma possível explicação para essa mudança, pode ser uma relocação de microrganismos e do C na superfície do BC, podendo melhorar a eficiência e reduzir a necessidade de produção de exoenzimas.

No que se refere ao papel do FC no controle da fusariose do tomateiro, reduções significativas na severidade dos sintomas externos e internos foram observados com a adição de FC no solo (Figuras 2 e 4). Para o solo coletado no IAC, os sintomas externos e internos apresentaram tendência de redução expressa por uma equação quadrática, com ponto de inclinação entre 30 e 40 t ha<sup>-1</sup>, sendo os menores índices da doenças observados na dose de 20 t ha<sup>-1</sup> (Figura 2). Para o solo coletado na Embrapa Meio Ambiente foi observado tendencia de redução expressa por uma equação linear, na qual o aumento das concentrações de FC promoveram reduções na severidade da doença, sendo a dose mais elevada (5%) a que obteve os menores índices da doença (Figura 4).

Somente o solo coletado na Embrapa Meio Ambiente e condicionado com FC apresentou incrementos no desenvolvimento do tomateiro no solo infestado com o patógeno, havendo ganhos de massas frescas e secas dos sistemas aéreos e radiculares (Figura 3). Tal resultado é um indício adicional do efeito do FC na redução dos sintomas da fusariose do tomateiro, visto que, este patógeno ataca o sistema vascular das plantas e consequentemente interfere na translocação de água e nutrientes, logo a murcha e amarelecimento das plantas são os principais sintomas observados. Portanto, os maiores valores de massa fresca e seca da parte aérea do tomateiro, a partir da dose de 2%, é uma forte evidência do FC atuando na supressão da doença.

A partir deste resultado, hipotetiza-se que as diferentes características dos solos foram responsáveis por tais respostas, tendo em vista que seus atributos físicos e químicos apresentam significativas diferenças, sendo estes, de grande importancia no desenvolvimento e estabelecimento de determinados organismos na área, podendo favorece-los ou não. Além disto, o conteúdo de matéria orgânica e de nutrientes presente no solo coletado no IAC, assim como seu pH, poderia estar em níveis satisfatórios ao bom desenvolvimento da cultura e que o emprego do FC não surta efeito em seus atributos a curto prazo, enquanto o outro solo, coletado em área sem histórico de cultivo, apresenta menores índices de matéria orgânica e pH, na qual o emprego do FC pode ter fornecido condições para a melhoria dos atributos químicos e físicos, favorecendo o desenvolvimento das plantas.

Segundo Lehmann et al. (2011) uma das possíveis explicações para a supressão de doenças de plantas ocasionadas por patógenos de solo, está relacionada a capacidade adsortiva

dos BC, os quais reduzem compostos presentes na solução do solo (ex: exudatos radiculares), que de outra forma, facilitariam a capacidade dos patógenos em detectar e infectar raízes. Sabe-se que os exsudatos radiculares atuam como quimioatrativos para uma série de patógenos, como o *Pythium* (JONES et al., 1991), e estimulando a germinação de seus esporos através dos ácidos linoléico e oléico liberados por exsudatos radiculares (WINDSTAM; NELSON, 2008). Em trabalhos em casa de vegetação (CALLAWAY; ASCHEHOUG, 2000) e em condições de campo (KULMATISKI; BEARD, 2006; KULMATISKI, 2010), o carbono ativado se mostrou altamente capaz de sorver compostos alelopáticos produzidos pelas plantas. Portanto, é razoável supor que ocorrem interferências semelhantes entre as raízes e patógenos de solo, quando se utiliza BC.

Além disso, mudanças na comunidade de microrganismos que atuam de forma direta sobre doenças de plantas também podem ocorrer. Graber et al. (2010) demonstraram através da caracterização filogenética de isolados bacterianos baseados na análise do gene 16S rRNA, que dos 20 isolados identificados a partir do substrato condicionado com BC do cultivo de pimenta e cebola, 16 eram previamente descritos como agentes de promoção de crescimento de plantas e de biocontrole. Enquanto Elmer e Pignatello (2011) propuseram como explicação para o declínio na infecção por *Fusarium* em aspargos a adsorção de compostos alelopáticos em solos de replantio, como o ácido cumárico, cafeico e ferúlico, que levou a um aumento na colonização micorrízica, culminando com a supressão da doença.

Já Elad et al. (2010) discute como possível explicação para a supressão do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em pimentão e no tomateiro a indução de resistência sistêmica, pois como o agente causal estava espacialmente separado do BC, e a nutrição das plantas assim como os regimes hídricos não diferiram, sugeriu que a resistência sistêmica induzida seria a explicação mais provável. No entanto, não se sabe ao certo se a resistência é resultado de estresses de baixo nível exercido por compostos fitotóxicos contidos no biocarvão (por exemplo, etilenoglicol e propilenoglicol) ou através de microrganismos isolados a partir dos solos tratados com BC, que são conhecidos por induzir resistência, tal como *Trichoderma* spp.

De acordo com os resultados obtidos para a produção de enzimas relacionadas a defesa (Figura 6), os menores índices da doença encontrados a partir da concentração de 5% , indicam que, possivelmente, a indução de resistência no tomateiro foi o responsável pelos menores índices da doença, porém não é possível afirmar se os compostos químicos presentes no FC ou a microbiota do solo são os principais responsáveis pela maior expressão desta enzima nas plantas.

Conceitualmente, as polifenoloxidasas não são classificadas como sendo uma PRP (proteínas relacionadas à patogênese), porém, pelo fato de sua atividade poder ser induzida por fatores abióticos e bióticos, tais como danos causados por herbívoros, infecções fúngicas e bacterianas, e por tratamentos com compostos que sinalizam a via octadecanoide, é uma evidência adicional do envolvimento desta enzima em mecanismos de defesa das plantas (FARMER; RYAN, 1992; WARNER et al., 1995).

A importância da atividade das polifenoloxidasas na defesa de plantas a infecções de fitopatógenos, deve-se à sua propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas, que apresentam ação antimicrobiana (LIU et al., 2005; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002), e à sua ação protetora no local do ferimento (TAIZ; ZEIGER, 2004). As polifenoloxidasas também participam do processo de lignificação durante a invasão pelo patógeno (JUNG et al., 2004; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002). Uma maior atividade das polifenoloxidasas possivelmente incrementa as concentrações de produtos tóxicos resultantes da oxidação, aumentando, portanto, o grau de resistência à infecções (AGRIOS, 2005).

Na indução de resistência Chérif et al. (1994) concluíram que a conversão de fenóis em compostos tóxicos, proporcionados pela PPO, foi em grande parte responsável pelo aumento da resistência em plantas de pepino induzidas por silicatos solúveis contra *Pythium aphanidermatum*, agente causal de tombamento. Ramamoorthy et al. (2002) induziram resistência em tomate e pimenta, a partir do tratamento de sementes com diversos isolados de *P. fluorescens* e observaram reduções de até 50% do tombamento causado por *P. aphanidermatum*, estando esta proteção relacionada ao aumento significativo da atividade da PPO juntamente com outras enzimas. Peng et al. (2004) demonstraram que a indução do pepino com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum* contra *Cladosporium cucumerinum* reduziu em até 70% a severidade da doença, conferindo o aumento da atividade da PPO.

No que se refere ao maior crescimento radicular após a adição de BC ao solo, relatos similares já foram feitos há mais de 100 anos. Makoto et al. (2010) mostraram aumento significativo não apenas na biomassa da raiz (47%), mas também o número de raízes (64%) aumentou após um incêndio florestal em um Cambissolo distrófico. O número de raízes de armazenamento de aspargos também aumentou com a adição de BC em um solo tropical (MATSUBARA et al., 2002). Além disso, o comprimento da raiz do arroz aumentou com as adições de BC (NOGUERA et al., 2010). Portanto, não apenas a abundância, mas também o comportamento de crescimento das raízes pode mudar em resposta à presença de biocarvão.

No entanto, as razões para as mudanças no crescimento radicular raramente são bem identificadas nos estudos existentes, e variam dependendo das propriedades do BC e das

condições do solo nos diferentes ambientes (LEHMANN et al., 2011). Biocarvões com propriedades que melhoram as características químicas e físicas do solo, como disponibilidade de nutrientes, retenção de água, aumento do pH e aeração, são hipotetizados como a mais provável causa no aumento do crescimento das raízes. Em vários casos, não apenas a biomassa da raiz é aumentada, mas também da parte aérea é acrescida após as adições de BC, sendo que tais efeitos na parte aérea e radicular podem indicar uma melhor oferta de recursos no solo com consequente melhora na nutrição das plantas, o que não foi observado neste trabalho (Tabela 5). Portanto, acredita-se que tais efeitos na maior produção de biomassa, possivelmente esteja relacionado a melhorias físicas nos solos, como aumento no pH, aeração e retenção de água.

De acordo com os testes *in vitro*, o extrato aquoso de BC não foi diretamente tóxico para o patógeno, como evidenciado pela falta de impacto do BC sobre o crescimento radial do micélio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* raça 3. No entanto, a germinação de microconídios de *Fusarium* foi reduzida pelo extrato aquoso. Tal resultado possivelmente esteja relacionado aos compostos tóxicos presentes no BC ou mesmo por incrementos no pH da suspensão/extrato, elevando-os a níveis prejudiciais a germinação dos esporos do patógeno.

## 6 CONCLUSÕES

A utilização de Finos de Carvão na dose de 20 t ha<sup>-1</sup> tem potencial para aumentar a biomassa microbiana do solo e de 20 a 50 t ha<sup>-1</sup> na redução dos sintomas causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomateiro, sendo a indução de resistência sistêmica o mais provável efeito, devido aos aumentos na atividade da enzima polifenoloxidase.

Finos de Carvão na concentração de 5% em solo infestado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 reduz a perda de biomassa radicular e, a partir de 2%, em biomassa aérea.

Finos de Carvão promovem ganhos de biomassas aérea e radicular em tomateiros, a partir da concentração de 7,5%.

O aumento da concentração de Finos de Carvão no solo reduz a severidade da murcha de *Fusarium* em tomateiro.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAFEZ, A. A.; LI, J.; ABBAS, M. H. Feasibility of biochar manufactured from organic wastes on the stabilization of heavy metals in a metal smelter contaminated soil. **Chemosphere**, v. 117, p. 66-71, 2014.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Academic, 922 p., 2005.
- AHMAD, M. et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19-33, 2014.
- ALBIACH, R. et al. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. **Bioresource Technology**, v. 75, n. 1, p. 43-48, 2000.
- ALBURQUERQUE, J. A. et al. Enhanced wheat yield by biochar addition under different mineral fertilization levels. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 3, p. 475-484, 2013.
- ARSHAD, M. A.; MARTIN, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 88, n. 2, p. 153-160, 2002.
- BAHNG, M.-K. et al. Current technologies for analysis of biomass thermochemical processing: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, n. 2, p. 117-138, 2009.
- BAILEY K.; LAZAROVITS G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil and Tillage Research**, v.72, p. 169-180, 2003.
- BAILEY, V. L.; FANSLER, S. J.; SMITH, J. L.; BOLTON JR., H. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. **Soil Biology and Biochemistry**, n 43, p. 296-301, 2010.
- BENITES, V. D. M. et al. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. **Geoderma**, v. 127, n. 1-2, p. 104-113, 2005.
- BENITES, V. M.; TEIXEIRA, W. G.; PIMENTA, A. S.; RESENDE, M. E. **Utilização de Carvão e Subprodutos da Carbonização Vegetal na Agricultura**: Aprendendo com as Terras Pretas de Índio. In: Wenceslau, G.T.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Org.). *As Terras Pretas de Índio da Amazônia: Sua Caracterização e Uso deste Conhecimento na Criação de Novas Áreas*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 285-296, 2009.
- BETTIOL, W; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T. (Ed.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife. Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 125-152, 2005.
- BIRD, M. et al. Stability of elemental carbon in a savanna soil. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 13, n. 4, p. 923-932, 1999.
- BONANOMI, G. et al. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. **Journal of Plant Pathology**, p. 311-324, 2007.

BONANOMI, G. et al. Soil quality recovery and crop yield enhancement by combined application of compost and wood to vegetables grown under plastic tunnels. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 192, p. 1-7, 2014.

BONANOMI, G. et al. Phytotoxicity, not nitrogen immobilization, explains plant litter inhibitory effects: evidence from solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. **New Phytologist**, v. 191, n. 4, p. 1018-1030, 2011.

BONANOMI, G.; IPPOLITO, F.; SCALA, F. A "black" future for plant pathology? Biochar as a new soil amendment for controlling plant diseases. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 2, 2015.

BREWSTER, C. E. et al. Criteria to select biochars for field studies based on biochar chemical properties. **BioEnergy Research**, v. 4, n. 4, p. 312-323, 2011.

BRITO, J. O. **Pró Carvão**: relatório sobre a cadeia produtiva de carvão vegetal e lenha do Estado de São Paulo. SINCAL/FCESP/SEBRAE, 2000.

BROOKES, P. et al. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 837-842, 1985.

CAKIR, O.; ARI, S. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 51-55, 2009.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* - **International Journal of Soil Biology**, v. 49, p. 637-644, 2005.

CALLAWAY, R. M.; ASCHEHOUG, E. T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. **Science**, v. 290, n. 5491, p. 521-523, 2000.

CANTRELL, K. B. et al. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 419-428, 2012.

CASTELLANI, A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 283-284, 1963.

CGEE. **Mapeamento de ações institucionais para sustentabilidade da produção de ferro-gusa a Partir de carvão vegetal**. Subsídios 2014 ao Plano Siderurgia do MDIC: Modernização da produção de carvão vegetal. Contrato Administrativo CGEE/MDIC 49/2013. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2014.

CHAN, K. Y. et al. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. **Soil Research**, v. 45, n. 8, p. 629-634, 2008.

CHAN, K.Y.; XU, Z. **Biochar: nutrient properties and their enhancement**. In: Lehmann J., Joseph S. (eds). *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. Earthscan, London, UK, 2009.

CHENG, C. H. et al. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. **Organic Geochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1477-1488, 2006.

CHÉRIF, M. et al. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v. 84, n. 3, p. 236-242, 1994.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. American Phytopathological Society, 539 p., 1983.

COSTA, M. L. D.; KERN, D. C. Geochemical signatures of tropical soils with archaeological black earth in the Amazon, Brazil. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 66, n. 1-2, p. 369-385, 1999.

CUNHA, T. J. F. et al. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte a antrópico da amazônia (Terra Preta). **Acta Amazonica**, v. 37, p. 91-98, 2007.

DEMISIE, W.; ZHANG, M. Effect of biochar application on microbial biomass and enzymatic activities in degraded red soil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 8, p. 755-766, 2015.

DEMPSTER, D. N. et al. Decreased soil microbial biomass and nitrogen mineralisation with Eucalyptus biochar addition to a coarse textured soil. **Plant and Soil**, v. 354, n. 1-2, p. 311-324, 2012

DIAS, B. O. et al. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: effect on organic matter degradation and humification. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1239-1246, 2010.

DOWNIE A., CROSKY A., MUNROE P. **Physical properties of biochar**. In: Lehmann J., Joseph S. (eds). *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. Earthscan, London, UK, 2009.

DU, ZHANGLIU et al. Consecutive biochar application alters soil enzyme activities in the winter wheat–growing season. **Soil Science**, v. 179, n. 2, p. 75-83, 2014.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

ELAD, Y. et al. The biochar effect: plant resistance to biotic stresses. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, n. 3, p. 335-349, 2012.

ELAD, Y. et al. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. **Phytopathology**, v. 100, n. 9, p. 913-921, 2010.

ELMER, W. H.; PIGNATELLO, J. J. Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and Fusarium crown and root rot of asparagus in replant soils. **Plant Disease**, v. 95, n. 8, p. 960-966, 2011.

ENDERS, A. et al. Characterization of biochars to evaluate recalcitrance and agronomic performance. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 644-653, 2012.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, v. 4, n. 2, p. 129-134, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **The charcoal transition: greening the charcoal value chain to mitigate climate change and improve local livelihoods**, by J. van Dam. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017.

GASKIN, J. W. et al. Effect of peanut hull and pine chip biochar on soil nutrients, corn nutrient status, and yield. **Agronomy Journal**, v. 102, n. 2, p. 623-633, 2010.

GHINI, R.; MENDES, M.; BETTIOL, W. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador da atividade microbiana do solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 24, 1998.

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

GLASER, B. et al. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. **Sustainable management of soil organic matter**. CABI Publishing, Wallingford, p. 190-194, 2001.

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 219-230, 2002.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

GOMES, P.A.; OLIVEIRA, J. B. **Teoria da carbonização da madeira**. In: Uso da Madeira para fins Energéticos, Belo Horizonte. Centro Tecnológico de Minas Gerais/CETEC, p. 10-27, 1982.

GRABER, E. R. et al. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertilized soilless media. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 481-496, 2010.

GUO, H. et al. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. **Chemosphere**, v. 87, p.1273-1280, 2012.

HALFELD-VIEIRA, B. D. A. et al. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1247-1252, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.

HAREL, Y. M. et al. Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1-2, p. 245-257, 2012.

HOITINK, H.; BOEHM, M. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 427-446, 1999.

HOMMA, A. K. O.; ALVES, R. N. B.; MENEZES, A. J.; MATOS, G. B. Guseiras na Amazônia: perigo para a floresta. **Ciência Hoje**, v. 39, p. 56-59, 2006.

HORNBY, D. Suppressive Soils. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 21 p. 65-85, 1983.

HOSSAIN, M. K. et al. Influence of pyrolysis temperature on production and nutrient properties of wastewater sludge biochar. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 1, p. 223-228, 2011.

INSTITUTO AÇO BRASIL. Disponível em: <[www.acobrasil.org.br](http://www.acobrasil.org.br)>. Acesso em 12/07/2016.

INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 p., 2014.

JAISWAL, A. K. et al. *Rhizoctonia solani* suppression and plant growth promotion in cucumber as affected by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 69, p. 110-118, 2014.

JAISWAL, A. K. et al. Non-monotonic influence of biochar dose on bean seedling growth and susceptibility to *Rhizoctonia solani*: the “Shifted R max-Effect”. **Plant and Soil**, v. 395, n. 1-2, p. 125-140, 2015.

JIN, H. **Characterization of microbial life colonizing biochar and biocharamended soils**. 2010, 196 p. Thesis (PhD), Cornell University, Ithaca, NY, 2010.

JUNG, W. J. et al. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, Orlando, v. 30, n. 3, p. 645-652, 2004.

KANDELER, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 1, p. 68-72, 1988.

KISHIMOTO, S.; SUGIRA, G. Charcoal as a soil condition. In: SYMPOSIUM ON FOREST PRODUCT RESEARCH INTERNATIONAL: **Achievements and the future**. Resumos...Pretoria: National Timber Research Institute, v. 5, p. 22-26, 1985.

KOLB, S. E.; FERMANICH, K. J.; DORNBUSH, M. E. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 4, p. 1173-1181, 2009.

KOLLMAN, F. F. P.; COTE, J. W. A. **Principles of Wood Science and Tecnology**, Vol. I. Solid Wood. New York: Springer-Verlag, 1968.

KOLTON, M. et al. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4924-4930, 2011.

KOMKIENE, J.; BALTRENAITE, E. Biochar as adsorbent for removal of heavy metal ions [Cadmium (II), Copper (II), Lead (II), Zinc (II)] from aqueous phase. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 471-482, 2016.

KRULL, E. S. et al. Characteristics of biochar: organo-chemical properties. **Biochar for environmental management: Science and technology**. Earthscan, London, p. 53-65, 2009.

KULMATISKI, A.; BEARD, K. H. Activated carbon as a restoration tool: potential for control of invasive plants in abandoned agricultural fields. **Restoration Ecology**, v. 14, n. 2, p. 251-257, 2006.

KULMATISKI, A. Changing Soils to Manage Plant Communities: Activated Carbon as a Restoration Tool in Ex-arable Fields. **Restoration Ecology**, v. 19, n. 101, p. 102-110, 2011.

LAIRD, D. et al. Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. **Geoderma**, v. 158, n. 3, p. 436-442, 2010.

LAL, R. Challenges and opportunities in soil organic matter research. **European Journal of Soil Science**, v. 60, n. 2, p. 158-169, 2009.

LAZAROVITS, G.; CONN, K.; POTTER, J. Reduction of potato scab, verticillium wilt, and nematodes by soymeal and meat and bone meal in two Ontario potato fields. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 21, n. 4, p. 345-353, 1999.

LEHMANN, J. et al. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant and Soil**, v. 249, n. 2, p. 343-357, 2003.

LEHMANN, J. A handful of carbon. **Nature**, v. 447, n. 7141, p. 143-144, 2007.

LEHMANN, J. Biochar for environmental management: An introduction. In 'Biochar for environmental management: Science and technology'.(Eds J Lehmann, S Joseph). **International Biochar Initiative: Westerville, OH, USA**, p. 1-12, 2009.

LEHMANN, J. et al. Biochar effects on soil biota—a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011.

LEVAN, S. L.; WINANDY, J. E. Effect of fire retardant treatments on wood strengt: A review. **Wood and Fiber Science**, v. 22, p. 113-131, 1990.

LIANG, B. et al. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, v. 41, n. 2, p. 206-213, 2010.

LIU, H. et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, n. 3, p. 263-269, 2005.

LODHA, S. Soil solarization, summer irrigation and amendments for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* and *Macrophomina phaseolina* in arid soils. **Crop Protection**, v. 14, n. 3, p. 215-219, 1995.

MACEDO, I.; CORTEZ, L. A. B. **Processamento Industrial da Cana-de-açúcar no Brasil**. In: USO DA BIOMASSA PARA PRODUÇÃO DE ENERGIA NA INDÚSTRIA BRASILEIRA. 2005, Campinas, Editora da UNICAMP, 2005.

MACHADO, F. S. **Aproveitamento energético de finos de carvão em alto forno, visando redução de emissões e obtenção de créditos de carbono**. 2009. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

MADARI, B. E.; MAIA, C. M. B. D. F.; NOVOTNY, E. H. Context and importance of biochar research. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 5, p. i-ii, 2012.

MAEKAWA, K. **Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura**. São Paulo: (APAN – Associação dos Produtores de Agricultura Natural), 2002. Apostila.

MAHALL, B. E.; CALLAWAY, R. M. Root communication mechanisms and intracommunity distributions of two Mojave Desert shrubs. **Ecology**, v. 73, n. 6, p. 2145-2151, 1992.

MAKOTO, K. et al. Buried charcoal layer and ectomycorrhizae cooperatively promote the growth of *Larix gmelinii* seedlings. **Plant and Soil**, v. 327, n. 1-2, p. 143-152, 2010.

MANN, C. C. **The real dirt on rainforest fertility**: American Association for the Advancement of Science 2002.

MANZONI, L. P.; BARROS, T. D. **Carvão vegetal**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso: 25/02/2018.

MATSUBARA, Y.; HASEGAWA, N.; FUKUI, H.. Incidence of *Fusarium* root rot in asparagus seedlings infected with arbuscular mycorrhizal fungus as affected by several soil amendments. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 71, n. 3, p. 370-374, 2002.

MCKELLAR, M. E.; NELSON, E. B. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 452-460, 2003.

MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 2011.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Balanco Energético Nacional** - BEN 2017 - Base 2016. Disponível em: <<https://ben.epe.gov.br>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, n. 4, p. 491-498, 2002.

MUKHERJEE, A.; ZIMMERMAN, A.; HARRIS, W. Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars. **Geoderma**, v. 163, n. 3, p. 247-255, 2011.

NAVARRETE, A. A. et al. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, v. 2, n. 5, p. 787-809, 2010.

NOBLE, R.; COVENTRY, E. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 3-20, 2005.

NOGUERA, D. et al. Contrasted effect of biochar and earthworms on rice growth and resource allocation in different soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1017-1027, 2010.

NOVAK, J. M. et al. Impact of biochar amendment on fertility of a southeastern coastal plain soil. **Soil Science**, v. 174, n. 2, p. 105-112, 2009.

NOVOTNY, E. H. et al. Lessons from the Terra Preta de Índios of the Amazon region for the utilisation of charcoal for soil amendment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1003-1010, 2009.

OLIVEIRA, J. B.; GOMES, P. A.; MENDES, M. G. **Otimização do processo de carbonização da madeira e do coco babaçu em fornos de alvenaria. Carvão vegetal: destilação, carvoejamento, propriedades, controle e qualidade.** Belo Horizonte: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/CETEC, p. 103-130, 1982.

OLIVEIRA, E. **Correlação entre parâmetros de qualidade madeira e do carvão de Eucalyptus grandis.** 1988. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

PANE C.; SPACCINI R.; PICCOLO A.; SCALA F.; BONANOMI G. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. **Biological Control**, v. 56, p. 115-124, 2011.

PASCHOLATI, S.; NICHOLSON, R.; BUTLER, L. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity and Anthocyanin Accumulation in Wounded Maize Mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v. 115, n. 2, p. 165-172, 1986.

PAZ-FERREIRO, J. et al. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review. **Solid Earth**, v. 5, n. 1, p. 65, 2014.

PENG, X.; ZHANG, H.; BAI, Z.; LI, B. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. **Phytoparasitica**, v.32, p.377-387, 2004.

PIETIKÄINEN, J.; KIIKKILÄ, O.; FRITZE, H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. **Oikos**, v. 89, n. 2, p. 231-242, 2000.

PINHEIRO, P. C. C.; REZENDE, M. E. A.; SAMPAIO, R. S. A produção de carvão vegetal: teoria e prática. Belo Horizonte, p. 120, 2006.

POSTMA, J. et al. Efficacy of four phosphate-mobilizing bacteria applied with an animal bone charcoal formulation in controlling *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* in tomato. **Biological Control**, v. 67, n. 2, p. 284-291, 2013.

PRASAD M. N. V. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. Springer Science & Business Media, 2004

PROTÁSIO, T. D. P. et al. Quality and energetic evaluation of the charcoal made of babassu nut residues used in the steel industry. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 5, p. 435-444, 2014.

RAIJ, B. V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. (eds). Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Boletim Técnico IAC n. 100. Campinas. IAC, 285p, 1996.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with *fluorescent pseudomonads*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 5, p. 429-441, 2002.

REZENDE, E. I. et al. Biocarvão (biochar) e sequestro de carbono. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 426-433, 2011.

RONDON, M. A. et al. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, n. 6, p. 699-708, 2007.

SAMPAIO, R. S. **Coal Devolatinization in Smelting Slags**. 1990. 142 p. Tese (Ph. D.) - Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, PA, USA, 1990.

SCHMIDT, M. W.; SKJEMSTAD, J. O.; JÄGER, C. Carbon isotope geochemistry and nanomorphology of soil black carbon: Black chernozemic soils in central Europe originate from ancient biomass burning. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 16, n. 4, 2002.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1256-1261, 1982.

SHINOGI, Y.; KANRI, Y. Pyrolysis of plant, animal and human waste: physical and chemical characterization of the pyrolytic products. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 241-247, 2003.

SILBER, A.; LEVKOVITCH, I.; GRABER, E. pH-dependent mineral release and surface properties of cornstraw biochar: agronomic implications. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 24, p. 9318-9323, 2010.

SINGH, B. P. et al. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, n. 4, p. 1224-1235, 2010.

SINSABAUGH, R. L. et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. **Ecology Letters**, v. 11, p. 1252-1264, 2008.

SMIL, V. Nitrogen cycle and world food production. **World Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 9-13, 2011.

SMITH, P.; GREGORY, P. J. Climate change and sustainable food production. **Proceedings of The Nutrition Society**, v. 72, n. 1, p. 21-8, 2013.

SOMBROEK, W. G. **Amazon soils: A reconnaissance of the soils of the Brazilian Amazon region**. 1966.

SOHI, S. P. et al. A review of biochar and its use and function in soil. In: (Ed.). **Advances in Agronomy**: Elsevier, v.105, p.47-82, 2010.

SPOKAS, K. A. et al. Biochar: a synthesis of its agronomic impact beyond carbon sequestration. **Journal of Environmental Quality**, v. 41, n. 4, p. 973-989, 2012.

STEINER, C. et al. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. **Plant and Soil**, v. 291, n. 1-2, p. 275-290, 2007.

STEWART, C. E. et al. Co-generated fast pyrolysis biochar mitigates green-house gas emissions and increases carbon sequestration in temperate soils. **Gcb Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 153-164, 2013.

SNYDER W.C., SCHROTH M.N., CHRISTOU T. Effect of plant residues on root rot of beans. **Phytopathology**, n. 49, p. 755-756, 1959.

SZCZECH, M. Suppressiveness of vermicompost against Fusarium wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 3, p. 155-161, 1999.

SZCZECH, M.; SMOLIŃSKA, U. Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 2, p. 77-82, 2001.

TABATABAI, M. A.; DICK, W.A. **Enzymes in Soil: Research and Developments in Measuring Activities**, in: BURNS, R. G.; DICK, R. P. (Eds.), *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker Inc., NY, USA, p. 567-596, 2002.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 4, p. 301-307, 1969.

TEDESCO, M. J.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Departamento Solos, 1985.

TERMORSHUIZEN A.; VAN RIJN E.; VAN DER GAAG D.; ALABOUVETTE C.; CHEN Y.; LAGERLÖF J.; MALANDRAKIS A.; PAPLOMATAS E.; RÄMERT B.; RYCKEBOER

- J. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2461-2477, 2006.
- THEIS, J.; RILLIG, M. Characteristics of biochar. **Biological properties, Biochar for environment management Science and technology**, Earthscan, London, UK, p. 85, 2009.
- TILMAN, D. et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.
- TILSTON, E.; PITT, D.; GROENHOF, A. Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops. **New Phytologist**, v. 154, n. 3, p. 731-740, 2002.
- TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 23, p. 195-209, 1966.
- TORRES, J. L. R. et al. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura em um solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 4, p. 609-618, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.
- TANNIN, I. C. B.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 1174-1184, 2007.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.
- WADA, T. Charcoal Handbook. **Forest management section, agriculture, forestry and fisheries division, Bureau of labour and economic affairs**, Tokyo Metropolitan Government. Tokyo, Japan, 1997.
- WARDLE, D. A.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.-C. The charcoal effect in Boreal forests: mechanisms and ecological consequences. **Oecologia**, v. 115, n. 3, p. 419-426, 1998.
- WARNER, L. A. et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, n. 2, p. 327-338, 1995.
- WARNOCK, D. D. et al. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and Soil**, v. 300, n. 1-2, p. 9-20, 2007.
- WINDSTAM, S.; NELSON, E. B. Temporal release of fatty acids and sugars in the spermosphere: impacts on *Enterobacter cloacae*-induced biological control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4292-4299, 2008.
- WOOLF, D. Biochar as a soil amendment: A review of the environmental implications. 2008.

WYLAND, L.; JACKSON, L.; BROOKS, P. Eliminating nitrate interference during Kjeldahl digestion of soil extracts for microbial biomass determination. **Soil Science Society of America Journal**, v. 58, n. 2, p. 357-360, 1994.

YAMATO, M. et al. Effects of the application of charred bark of *Acacia mangium* on the yield of maize, cowpea and peanut, and soil chemical properties in South Sumatra, Indonesia. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 489-495, 2006.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil 1. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, v. 19, n. 13, p. 1467-1476, 1988.

YUAN, J. H.; XU, R. K. The amelioration effects of low temperature biochar generated from nine crop residues on an acidic Ultisol. **Soil Use and Management**, v. 27, n. 1, p. 110-115, 2011.

ZACKRISSON, O.; NILSSON, M. C., WARDLE, D. A. Key ecological function of charcoal from wildfire in the boreal forest. **Oikos**, n. 77, p. 10-19, 1996.

ZANETTI, M. et al. Caracterização física de substratos para a produção de mudas e porta-enxertos cítricos sob telado. **Revista Laranja, Cordeirópolis**, v. 24, n. 2, p. 519-530, 2003.

ZHANG, W.; DICK, W.; HOITINK, H. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. **Phytopathology**, v. 86, n. 10, p. 1066-1070, 1996.

ZWART, D. C.; KIM, S.-H. Biochar amendment increases resistance to stem lesions caused by *Phytophthora* spp. in tree seedlings. **HortScience**, v. 47, n. 12, p. 1736-1740, 2012.