

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Impacto da diversidade bacteriana sob a degradação clorotalonil no
solo manejado com biochar**

Adijailton Jose de Souza

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Adijailton Jose de Souza
Engenheiro Agrônomo

**Impacto da diversidade bacteriana sob a degradação clorotalonil no
solo manejado com biochar**

Orientador:
Profa. Dra. **JUSSARA BORGES REGITANO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Adijailton Jose de

Impacto da diversidade bacteriana sob a degradação clorotalonil no solo manejado com biochar / Adijailton Jose de Souza. - - Piracicaba, 2016.

90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Diluição para extinção 2. Bactérias 3. PCR-DGGE 4. qPCR 5. CHT 6. Biocarvão
7. Dissipação 8. Metabólitos 9. Resíduos não extraíveis I. Título

CDD 631.46
S726i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais,
Jose Manoel de Souza e
Cícera Alves de Jesus,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por ser minha força motriz nesta jornada, me concedendo saúde e disposição para executar cada etapa deste trabalho;

Aos meus pais, **Jose Manoel de Souza** e **Cícera Alves de Jesus** (*in memoriam*), pela boa educação que me deram, pelo amor e pelo total apoio em todas as minhas escolhas;

Aos meus irmãos, **Antônio** e **Cenildo** e às minhas irmãs, **Maria Célis**, **Cirlene**, **Gilene** e **Alcineide**, por sempre estarem comigo e me apoiarem durante todo esse tempo, por suas palavras de incentivo;

Às minhas cunhadas **Cícera (madrinha)** e **Neves** por todo o acolhimento e suporte a mim oferecido;

Aos meus **sobrinhos** e **sobrinhas** por fazerem com que os momentos monótonos e tristes se tornassem momentos alegres e felizes sobre as vossas companhias;

À professora **Dra. Jussara Borges Regitano** pela a orientação, pela confiança em mim depositada, pela amizade, e por todo o trabalho construído ao longo dessa jornada, além da valiosa contribuição com conselhos e discussões que me proporcionaram outras perspectivas no meu campo de estudo. Muito obrigado;

Ao Professor **Dr. Fernando Dini Andreote** por todo o apoio e incentivo durante toda a realização desse trabalho, por suas palavras de incentivo e por suas contribuições científicas para a realização desse trabalho;

À Professora **Dra. Júlia Kuklinsky-Sobral** por toda a sua contribuição tanto no âmbito pessoal quanto no âmbito científico durante toda a graduação, obrigado;

Ao Professor **Dr. Valdemar Luiz Tornisielo** por todo o suporte técnico que me foi disponibilizado em seu laboratório;

Ao Professor **Dr. Pablo Vital Torrado** por sua valorosa contribuição para a escolha do local de coleta do solo;

Às pós-graduandas **Rafaela Conz** e **Thalita Abbruzzini** por suas colaborações científicas, fornecendo o suporte necessário para a escolha do biocarvão a ser utilizado no trabalho;

Ao **DVATCOM**, pela moradia concedida na Vila da Pós-Graduação da ESALQ/USP nos primeiros meses em Piracicaba e aos amigos e moradores da Vila: Arthur; Bruno, Césia, Christopher, Laiane, Marcos, Matheus, Mateus Tonelli, Renata, Suzan, Roni e Timóteo;

Aos meus amigos **Pedro Andrade** e **Arthur Prudêncio** pela amizade e por eles estarem sempre me oferecendo suporte tanto no âmbito do laboratório quanto fora dele. Muito obrigado.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia da ESALQ/USP, **Denise Mescolotti** e **Fernando Baldesin**, por todo auxílio fornecido a este trabalho e por suas amizades.

Ao **Anderson Scarazati**, pela amizade e por toda sua ajuda durante a condução desse trabalho;

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, **Carlos Dorelli** e **Rodrigo**, pela amizade e por todo auxílio fornecido a este trabalho. Aprendi muito com vocês. Muito obrigado;

À Maria Fernanda de Almeida Prado por sua amizade e suas palavras de incentivo e todo o suporte oferecido na secretária do programa de Microbiologia Agrícola;

Aos meus amigos: Ademir, Arthur, Diogo, German, Joice, Thiago, Sonia, Pedro, Priscila;

Aos meus amigos e irmãos científicos: Altina, Letícia e Lucas, pelas boas conversas, o cafezinho e os momentos de descontração e estudos também;

A **CAPES** pela concessão da bolsa de pesquisa e auxílios vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola;

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** e ao curso de Pós-Graduação em “Microbiologia Agrícola”, pela estrutura e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho;

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente, prestaram incentivos e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

OBRIGADO!

EPÍGRAFE

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível".

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
LISTA DE SÍMBOLOS	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Pesticidas	25
2.1.1 Histórico.....	25
2.1.2 Pesticidas na agricultura brasileira	27
2.1.4 Uso de pesticidas: aspectos ambientais	28
2.2 Clorotalonil: uso e implicações ambientais	30
2.3 Biochar: sorção de pesticidas e efeitos na microbiota solo.....	33
2.3.1 Biochar como adsorvente	33
2.3.2 Efeito da adição do biochar sobre a microbiota do solo.....	35
2.4 Comunidade microbiana do solo e a degradação de pesticidas.....	37
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.1.2 Objetivos específicos	41
3.2 Hipótese.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Amostra de solo	43
4.2 O biochar utilizado	44
4.3 Padrão do pesticida e os reagentes de rotina.....	44
4.4 Microcosmos.....	45
4.4.1 Montagem dos microcosmos	45
4.4.2 Avaliação da comunidade bacteriana	46
4.4.2.1 A alteração da comunidade microbiana por diluição.....	46
4.4.2.2 Aplicação do biochar e do clorotalonil nos microcosmos.....	47
4.4.2.3 Análise da estrutura da comunidade bacteriana	47
4.4.2.4 PCR quantitativo (qPCR) do gene 16S rRNA	49
4.5 A dissipação do clorotalonil	49
4.5.1 Teste de sorção	49
4.5.2 Mineralização do clorotalonil.....	50

4.5.3 Degradação do clorotalonil.....	50
4.5.4 Resíduos ligados.....	51
4.5.5 Formação de metabólitos.....	51
4.6 Forma de análise dos dados.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Avaliação da comunidade bacteriana.....	53
5.1.1 Alteração da comunidade bacteriana por diluição.....	53
5.1.2 Perfil da comunidade bacteriana do solo.....	56
5.1.3 Quantificação do gene 16S rDNA.....	59
5.2 Dissipação do clorotalonil.....	61
7 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	83
ANEXOS.....	87

RESUMO

Impacto da diversidade bacteriana sob a degradação clorotalonil no solo manejado com biochar

A diversidade microbiana é geralmente considerada por seu papel nos principais processos do ecossistema, tais como a decomposição da matéria orgânica e ciclos biogeoquímicos. No entanto, informações sobre o impacto da diversidade em funções menores, como degradação de xenobióticos são escassas. Nós estudamos a partir da abordagem da 'diluição para extinção', o papel da diversidade sobre a capacidade da comunidade microbiana em degradar o fungicida clorotalonil (organoclorado). Também estudamos o comportamento da comunidade bacteriana após aplicação do pesticida no solo com e sem biochar. A diversidade microbiana do solo natural foi alterada artificialmente por diluição, constituindo um gradiente de diversidade ($SN > 10^{-1} > 10^{-3} > 10^{-6}$), seguido pela inoculação em amostras de solo estéril e posterior reestruturação (15 dias). Após a reestruturação da comunidade, as amostras foram manejadas com biochar (1% m/m) e tratadas com a dose de campo do CHT. O comportamento da comunidade bacteriana foi estudo por PCR-DGGE e qPCR do gene 16S rDNA através de um experimento com molécula fria (não radiomarcada). Enquanto a capacidade de degradação do CHT foi estudada por radiorespirometria (^{14}C -CHT). Inicialmente, a comunidade de bactérias foi influenciada pelo gradiente de diversidade obtido por diluição. A separação dos grupos bacterianos se mostrou bastante similar nos três primeiros períodos pré-aplicação do CHT ($SN > 10^{-1} - 10^{-3} > 10^{-6}$), enquanto que no período de 15 dias, a dinâmica de grupos foi alterada ($SN > 10^{-1} > 10^{-3} - 10^{-6}$). O fungicida e o biochar não exerceram efeitos na comunidade bacteriana no tempo zero (imediatamente após a aplicação), a modificação no perfil da comunidade foi atribuído à diluição. Nos períodos de 21 e 42 dias, o perfil comunidade bacteriana apresentou forte modificação. Os grupos bacterianos se mostraram mais dispersos quando considerado somente o CHT. Embora, a análise de ANOSIM indicou não haver diferença nas amostras com e sem biochar, sugerindo que o clorotalonil foi quem mais contribuiu na dispersão dos grupos bacterianos. No período de 42 d, a comunidade apresentou resposta positiva, sendo observado aumentos no número de bandas e no índice de Shannon em todos tratamentos. Isto possivelmente, devido a menor concentração do fungicida disponível na solução do solo, diminuindo assim, os efeitos deletérios sobre a comunidade. Os dados de qPCR não apresentaram alteração no número de cópias do gene 16S rDNA em todos os tratamentos. A remoção da diversidade impactou fortemente a capacidade da comunidade bacteriana de degradar o clorotalonil. Apesar da capacidade de degradar não ter sido perdida, a mínima alteração na diversidade promoveu elevada redução na taxa de mineralização do CHT. A dissipação do CHT se mostrou rápida ($D_{50} < 1$ dia) em todos os tratamentos, além disso, a formação de ^{14}C -resíduos não extraíveis foi constituiu um dos principais mecanismos de dissipação do CHT. A partir da degradação do fungicida, foram detectados três metabólitos. Conclui-se que a modificação por diluição da diversidade bacteriana promoveu impacto negativo na mineralização do clorotalonil. E que a formação de resíduos não extraíveis consistiu no principal mecanismo de dissipação do CHT em ambos solos.

Palavras-chave: Diluição para extinção; Bactérias; PCR-DGGE; qPCR; CHT; Biocarvão; Dissipação; Metabólitos; Resíduos não extraíveis

ABSTRACT

Impact of bacterial diversity in the chlorothalonil degradation on soil handled with biochar

Microbial diversity is generally considered for his role in key ecosystem processes, such as decomposition of organic matter and biogeochemical cycles. However, information about the impact of diversity on minor functions, such as degradation of xenobiotics is scant. We study from the approach of 'dilution to extinction', the role of diversity on the capacity of microbial community to degrade the chlorothalonil (organochlorine). We also studied the behavior of bacterial community after applying the pesticide in the soil with and without biochar. Microbial diversity of the soil natural (control) was artificially altered by dilution, forming a gradient of diversity ($SN > 10^{-1} > 10^{-3} > 10^{-6}$), followed by inoculation in sterile soil samples and subsequent restructuring (15 days). After of the community restructuring, the samples were handled with biochar (1% w/w) and treated with the chlorothalonil field dose. The behavior of the bacterial community was studied by PCR-DGGE and qPCR of the 16S rDNA gene through an experiment with cold molecule (no radiolabeled). While the CHT degradation capacity was studied by radiorespirometry (^{14}C -CHT). Initially, the community of bacteria was influenced by the diversity gradient obtained by dilution. The separation of bacterial groups showed very similar in the first three pre-application periods of the CHT ($SN > 10^{-1} - 10^{-3} > 10^{-6}$). While in the period of 15 days, the group dynamic has changed ($SN > 10^{-1} > 10^{-3} e 10^{-6}$). During periods of 21 and 42 days, the profile bacterial community showed strong modification. The bacterial groups were more dispersed when only considered the CHT. Although, the ANOSIM analysis indicated no difference in samples with and without biochar, suggesting that chlorothalonil who has contributed the most in the dispersion of bacterial groups. In the period of 42 days, the community presented a positive response, being observed increases in the number of bands and Shannon-Weiner index in all treatments. This possibly due to less concentration of fungicide available in soil solution, thus reducing, the deleterious effects on the community. The qPCR dates showed no change in the number of copies of the 16S rDNA gene in all treatments. The removal of microbial strongly impacted the ability of the bacterial community to degrading chlorothalonil. Despite the ability to degrade not having been lost, the minimum change in diversity promoted high reduction in the rate of mineralization CHT. The dissipation of the CHT showed quick ($D_{50} < 1$ d) in all treatments, in addition, the formation of non-extractable ^{14}C -residues was one of the main mechanisms of dissipation of the CHT. From the degradation of chlorothalonil, three metabolites were detected. We conclude that modification by dilution of the bacterial diversity had a negative impact on the mineralization of chlorothalonil. And the formation of non-extractable residues consisted in the main CHT dissipation mechanism in both soils.

Keywords: Dilution to extinction; Bacteria; PCR-DGGE; qPCR; BC; Dissipation; Metabolites; Non-extractable residues

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Clorotalonil e seus metabólitos e representação das possíveis rotas de degradação no ambiente (adaptado de PUTMAN et al., 2003).....33
- Figura 2 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de bandas do gene 16S rDNA dos níveis de diluição da comunidade bacteriana do solo antes da aplicação do fungicida clorotalonil e do manejo do solo com biochar. A – 0 dia; B – 5 dias; C – 10 dias; D – 15 dias. Onde, SN – solo natural; D1 – 10^{-1} ; D3 – 10^{-3} e D – 10^{-6} 54
- Figura 3 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de bandas do gene 16S rDNA dos níveis de diluição da comunidade bacteriana do solo após da aplicação do fungicida clorotalonil em solo com e sem manejo com biochar. A – 0 dia; B – 21 dias; C – 42 dias; símbolos preenchidos – com biochar; símbolos vazados – sem biochar; SN – solo natural, D1 – 10^{-1} ; D3 – 10^{-3} e D 6 – 10^{-6} 58
- Figura 4 – Número de cópias do gene 16S rDNA por grama de solo sobre diferentes tempos de incubação. SN CB – Solo natural com biochar; SN SB – Solo natural sem biochar; D1 CB – 10^{-1} com biochar; D1 SB – 10^{-1} Sem biochar; D3 CB – 10^{-3} com biochar; D3 SB – 10^{-3} Sem biochar; D6 CB – 10^{-6} com biochar; D6 SB – 10^{-6} sem biochar. T0 – 0 dias; T21 – 21 dias; T42 – 42 dias61
- Figura 5 – Taxa de mineralização do fungicida clorotalonil no solo manejado com biochar sob diferentes níveis de diversidade microbiana. Solo Natural (controle); diluição D1 – 10^{-1} ; diluição D3 – 10^{-3} ; diluição D6 – 10^{-6} 62
- Figura 6 – Degradação do clorotalonil no solo manejado e não-manejado com biochar sob diferentes níveis da diversidade microbiana. Solo natural – controle; Diluição D1 – 10^{-1} ; Diluição D3 – 10^{-3} ; Diluição D6 – 10^{-6} 65
- Figura 7 – Formação de metabólitos a partir do fungicida clorotalonil no solo manejado e não-manejado com biochar sob diferentes níveis da diversidade microbiana. Solo natural – controle; Diluição D1 – 10^{-1} ; Diluição D3 – 10^{-3} ; Diluição D6 – 10^{-6} . M I – metabólito 1 ($R_f = 0,2$); M

II – metabólito 2 ($R_f = 0,4$); M III – metabólito 3 ($R_f = 0,6$). CB – Com biochar; SB – Sem biochar 66

Figura 8 – Taxa formação de ^{14}C -resíduos não extraíveis no solo manejado com e se sem biochar sob diferentes níveis de diversidade microbiana do solo. T0 – pré-teste; T1 – 1 dia; T2 – 7 dias; T3 – 21 dias; T4 – 42 dias. Solo natural – controle; Diluição D1 – 10^{-1} ; Diluição D3 – 10^{-3} ; Diluição D6 – 10^{-6} 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas e classificação do solo utilizado no estudo	43
Tabela 2 – Características da matéria prima do biochar e do biochar utilizado no estudo de microcosmos de dissipação do clorotalonil	44
Tabela 3 – Índices de riqueza (número de bandas), de dominância e de diversidade (Shannon) calculados a partir do perfil de bandas obtidos por meio do DGGE (médias de três repetições), referentes ao acompanhamento da comunidade bacteriana do solo submetida a 'diluição para extinção', nos períodos de tempo de 0, 5, 10 e 15 dias após a diluição	55
Tabela 4 – Índices de riqueza (número de bandas), de dominância e de diversidade (Shannon) calculados a partir do perfil de bandas obtidos por meio do DGGE (médias de três repetições), referentes ao perfil da comunidade bacteriana do solo submetida ao manejo do solo com biochar e a aplicação do clorotalonil nos períodos de tempo de 0, 21 e 15 dias pós-manejo do solo	59
Tabela 5 – Sorção e coeficiente de sorção aparente do fungicida clorotalonil no solo sem manejo e com manejo de biochar, valores das médias obtidos de duas repetições	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(C)	Citosina
(G)	guanina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHC	hexacloroclicobenzeno
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
C _{org}	carbono orgânico do solo
CTC	Capacidade de troca de cátions
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DDT	dicloro difenil tricloroetano
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos
i.a.	Ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LB	<i>Loading Buffer</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
min	minutos
MO	matéria orgânica
NRC	<i>National Research Council</i>
pb	pares de bases
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	<i>Real time-PCR</i> (PCR em Tempo Real)
RED	<i>Reregistration Eligibility Decision</i> – Decisão de Elegibilidade de Novo Registro
RET	Registro Especial Temporário
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto
SINDEVEG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Vegetal

SNCR	Sistema Nacional de Crédito Rural
SSA	Área de Superficie Específica
TAE	Tris acetato
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> – Cromatografía de camada fina
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
(N)	normalidade
Al ³⁺	Alumínio
C	Carbono
DT ₅₀	meia-vida (persistência)
DT ₉₀	Tempo de dissipação de 90% do pesticida
cm	centímetro
g	gramas
H+Al	acidez potencial do solo
ha	hectare
i.a.	Ingrediente ativo
L	litros
K ⁺	potássio
KBq	Kilobacquerel
K _b	coeficiente de sorção
kg	quilogramas
K _H	constante de Henry – coeficiente de partição ar-água
K _{oc}	coeficiente de partição normalizado (K _d /Conteúdo de Corg)
K _{ow}	coeficiente de partição octanol-água
M	molar
MBq	megabacquerel
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mm	milímetro
mM	milimolar
N	nitrogênio
NaOH	hidróxido de sódio
°C	Graus Celsius
P	fósforo
pH	potencial hidrogeniônico
pK _a	constante de dissociação ácido
pK _b	constante de dissociação base
pmol	picomol

s	segundo
SB	soma de bases trocáveis
S _w	solubilidade em água
ton	tonelada
V%	percentual de bases saturando a CTC
µg	micrograma
µL	microlitro
µmol	micromol
pmol	picomol

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros pesticidas sintéticos surgiram durante a década 1940, gerando grandes benefícios para o aumento no rendimento das culturas agrícolas (VAN DER WERF, 1999). O novo padrão agrícola estabelecido no pós-guerra tem sua base tecnológica fundamentada na utilização de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e corretivos), mecanização, técnicas de irrigação e cultivares com alto potencial de rendimento. Contudo, somente a partir dos 1960 houve a difusão do novo padrão de agricultura para os países de terceiro mundo, com a chamada 'revolução verde' (SPADOTTO, 2006).

A qualidade da produção agrícola é fortemente afetada pelo ataque de pragas, doenças e plantas daninhas (COUTINHO et al., 2006; POPP e NAGY, 2013), perdas decorrentes dos ataques de pestes, em média atingem 35% do rendimento das culturas no mundo inteiro (POPP e NAGY, 2013).

Apesar de cumprir um papel crucial no manejo fitossanitário, o uso frequente, e em muitos casos incorreto dos agrotóxicos pode oferecer riscos à saúde humana e ao meio ambiente (CASSAL et al., 2014; SPADOTTO, 2006; VAN DER WERF, 1996). A maioria dos estudos de proporção de pesticidas aponta que apenas 0,3% do total que é aplicado atingem o organismo alvo e 99,7% restante tomam outro destino no meio, dessa forma, oferecendo riscos a organismos não alvos (PIMENTEL, 1995).

O uso intensivo de agroquímicos pode causar sérios problemas de contaminação do solo, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas, e dos alimentos, e como consequência, impactos negativos têm sido observados em organismos terrestres e aquáticos, e casos de intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, além dos riscos ocupacionais dos trabalhadores (SILVEIRA e FILHO, 2013; RIGOTTO et al., 2014; RIBEIRO e CAMELO, 2014).

Além disso, a introdução de agroquímicos no ambiente pode promover alteração na dinâmica dos processos vitais do solo, impactando negativamente o funcionamento do ecossistema através da pressão de seleção exercida sob os organismos do solo (FORTES NETO et al., 2007). Desse modo, torna-se inevitável os efeitos dos pesticidas sob os organismos não alvos, e consequentemente, efeitos indesejados podem ocorrer em algumas espécies, comunidades ou no ecossistema como um todo (VAN DER WERF, 1996).

A capacidade para remover ou mitigar os efeitos de compostos xenobióticos do ambiente é fortemente afetada pelas flutuações ambientais e temporais sob as comunidades microbianas do solo, além das próprias características físico-químicas do agroquímico (inseticida, fungicida, herbicidas, etc.) e as propriedades físicas e químicas do solo. Isto significa que alterações mínimas nas comunidades microbianas podem propiciar efeitos negativos em funções ecológicas mais restritas, por exemplo, a degradação de pesticidas (GAYLARDE et al., 2005; HERNANDEZ-RAQUET et al., 2013).

Desde a inserção dos agroquímicos na agricultura tem ocorrido amplas discussões na sociedade civil e na comunidade científica sob os efeitos nocivos desses compostos para organismos não alvos, incluindo o ser humano, além da busca incessante de meios para minimizar os impactos no ambiente e na saúde humana (BENDING et al., 2007). O manejo do solo com materiais adsorventes é visto como uma alternativa promissora para remediação dos efeitos adversos de contaminantes ambientais (por exemplo, metais pesados e pesticidas), uma vez que estes materiais retêm o composto xenobiótico e diminuem sua biodisponibilidade no ambiente, minimizando seu impacto ambiental (GONÇALVES JUNIOR et al., 2013).

Neste contexto, o biocarvão (biochar) tem se mostrado uma alternativa economicamente viável, apresentando diversos benefícios intrínsecos do seu uso, tais como incorporação de C no solo, melhorias das propriedades físico-químicas do solo, incrementos na capacidade de retenção de água e nutrientes, melhorias nas propriedades biológicas do solo, além da adsorção de pesticidas, reduzindo dessa forma a toxicidade destes no solo. Embora o biochar reduza a toxicidade dos pesticidas por meio da adsorção, estes compostos tendem a persistirem por mais tempo ambiente, mesmo que seja em formas indisponíveis (LEHMANN e JOSEPH, 2015; SOHI et al., 2010).

Diante do exposto acima e da escassez de estudos na literatura que abordem os impactos da alteração da diversidade microbiana do solo sobre a degradação de pesticidas, assim como os efeitos do manejo do biochar sob os microrganismos do solo que não são totalmente elucidados, sendo estas, as principais razões que motivaram a realização deste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesticidas

2.1.1 Histórico

Desde antiguidade se tem relatos do uso de substâncias químicas como modo de controle de pragas e doenças em plantas cultivadas e na criação animais. Os gregos e os romanos utilizavam metais como o arsênio para o controle de insetos, os chineses utilizavam compostos orgânicos naturais como a piretrina, substância obtida a partir de flores de crisântemos, que eram empregadas como inseticidas. (GUERRA e SAMPAIO, 1991; MARASCHIN, 2003).

No século XIX, eram utilizadas substâncias inorgânicas compostas por metais, como arsênio, mercúrio, chumbo e selênio, além de sais de cobre e zinco para o controle de pragas e doenças em plantas, caracterizando a primeira geração de pesticidas químicos. No entanto, muitas dessas substâncias foram banidas devido aos riscos oferecidos ao homem e ao ambiente. A segunda geração de defensivos agrícolas consistiu de produtos orgânicos sintéticos com propriedades biocidas. O *Lethane* 384 foi o primeiro inseticida sintético comercializado a base de tiocianato, contudo, a ascensão dos biocidas sintéticos começou a partir do desenvolvimento da indústria química durante a Segunda Guerra Mundial. No pacote de biocidas dessa geração estavam o DDT (dicloro difenil tricloroetano), o BHC (hexaclorociclohexano) e os inseticidas do grupo da parationa. Essa geração constituiu em um marco revolucionário nas tecnologias até então disponíveis para o controle de pragas e na saúde pública (ALVES FILHO, 2002).

Com o fim da Segunda Guerra Mundial, a indústria química encontrou na agricultura um nicho de mercado para seus produtos, antes utilizados como armas químicas. O desenvolvimento desta indústria disponibilizou uma grande variedade de moléculas sintéticas, que deram origem a milhares de formulações comerciais impulsionando o setor de defensivos e revolucionando a agricultura mundial.

Entretanto, essa facilidade de acesso às novas tecnologias não teve o amparo necessário para a qualificação dos trabalhadores, sobretudo em países em desenvolvimento, expondo as comunidades rurais a um conjunto de riscos, dos quais muitos ainda desconhecidos, gerados pelo uso extensivo de diversas

substâncias químicas perigosas (SANTANA e MACHINSKI JUNIOR, 2008; RIBAS e MATSUMURA, 2009).

Pouco depois à aparição dos pesticidas sintéticos, a obra *Primavera Silenciosa* (*Silenc Spring*, publicada em 1962), da pesquisadora americana Rachel Carson, trouxe à tona os danos à saúde humana e ao meio ambiente em decorrência do uso de pesticidas. A obra da pesquisadora deu início a pressão da opinião pública sobre o uso indiscriminado dessas substâncias, sugerindo ainda, a reavaliação e a busca por alternativas de menor impacto na saúde e no ambiente. Em decorrência deste movimento houve a criação da agência americana EPA (*Environmental Protection Agency*), seguida da reavaliação e o banimento de muitos compostos químicos (por exemplo, o DDT, clordano, aldrin, endrin, malation e paration) (ALVES FILHO, 2002; PINTO-ZEVALLOS e ZARBIN, 2013; BENEVIDES e MARINHO, 2015).

A terceira de geração de agroquímicos teve início na década de 1960, com a forte pressão da sociedade e da comunidade científica sobre a indústria química, o que impulsionou a busca por produtos menos impactantes na saúde humana e ambiental. Nesta fase, foram desenvolvidas formulações a base de ferormônios (semioquímicos), o diflubenzuron (fisiológico), o *Bacillus thuringiensis* (biológico) e os piretróides.

A quarta geração de agrotóxicos se caracterizou por seus produtos de ação mais específica sobre a praga. Os avanços nos estudos na área da entomologia, principalmente, no campo da fisiologia de insetos, possibilitaram o desenvolvimento de agrotóxicos mais específicos, com maior eficácia, além da maior capacidade de degradação no ambiente (NRC, 2000).

O emprego dessas substâncias químicas no controle de pragas e doenças tem sido alvo de fortes debates acerca de seus efeitos a curto e longo prazo sobre a saúde humana e ambiental. O caso dos pesticidas se tornou uma situação ambivalente, por um lado, a incorporação dessa tecnologia possibilitou o aumento, a diversificação e a melhoria na produção agrícola mundial. Por outro lado, se tem o aumento dos danos à saúde e à segurança de quem está diretamente envolvido na utilização dos agrotóxicos (trabalhador rural), além de organismos não alvo e a população. Recomendando-se dessa forma o uso racional e cauteloso dessas substâncias, visando assim, minimizar os danos à saúde humana e ao meio ambiente.

2.1.2 Pesticidas na agricultura brasileira

A agricultura mundial cresceu tanto em área cultivada quanto em produtividade, junto com esse crescimento veio o uso de intensivo de fertilizantes químicos, pesticidas (inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas) e mecanização, além do emprego de organismos geneticamente melhorados, aumento na eficiência no uso dos recursos hídricos (COUTINHO et al., 2005; ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; FERREIRA et al., 2014). Os benéficos associados ao uso racional dessas substâncias químicas na agricultura incluem o controle pragas e doenças, elevação da produtividade, aumento na qualidade dos produtos de origem agrícola e redução na demanda de recursos naturais e tecnológicos. No entanto, o uso intensivo e indiscriminado de agroquímicos oferecem enormes riscos à saúde humana e ambiental (FLORES et al., 2004; RIBAS e MATSUMURA, 2009; CASSAL et al., 2014).

Os agroquímicos foram inseridos na agricultura brasileira a partir da década de 1950, quando se iniciou o processo de modernização da agricultura, que ficou conhecido por “Revolução Verde”, trazendo fortes mudanças no processo tradicional de produção agrícola, bem como nos impactos dessa atividade no ambiente e na saúde humana (RIBAS e MATSUMURA, 2009).

A consolidação desse novo sistema de produção tomou propulsão somente a partir da década 1960, quando o governo através da criação do Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR), vinculou a concessão de empréstimos aos produtores por meio da fixação de um percentual a ser gasto com insumos químicos (fertilizantes e agroquímicos), o que, na época, era símbolo da modernização do meio rural. Além disso, os incentivos fiscais oferecidos pelo governo e a falta de rigor na regularização de pesticidas, facilitaram a inserção de centenas de agroquímicos, os quais muitos já haviam sido banidos na União Europeia e nos EUA (PERES et al., 2003; SILVA et al., 2005; LONDRES, 2011; FERREIRA et al. 2014).

O Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos e afins do mundo, em 2010, o volume de desse tipo insumo agrícola ultrapassou a marca de 1 bilhão de litros comercializado. A divulgação desse dado foi motivo de comemoração por parte do setor, no entanto, causou forte repercussão na sociedade e nos órgãos de saúde, desde então, o SINDIVEG não tem divulgado dados referentes ao volume

comercializado desses produtos, e isso tem dificultado ainda mais o levantamento de dados desse setor (LONDRES, 2011; CARNEIRO et al., 2015).

Os agrotóxicos se tornaram uma ferramenta crucial para o sucesso do agronegócio brasileiro. O mercado desse tipo insumo agrícola movimentou o montante de US\$ 12,24 bilhões no ano de 2014, no entanto, quando comparado aos anos anteriores, o setor teve sua taxa de crescimento reduzida a 6,9%, a menor taxa de crescimento registrada desde ano de 2008 (SAMPAIO, 2015, MAPA, 2015).

Quando analisado por classes de uso, os inseticidas foram os defensivos agrícolas com maior volume comercializado, representando 39,94% do volume de vendas do período, esse aumento ocorreu devido ao incremento na incidência de pragas, principalmente a *Helicoverpa armigera* que vem assolando os cultivos. A classe dos herbicidas representou 31,82% do mercado, seguida da classe de fungicidas com 23,73% das vendas, os fungicidas tiveram um aumento 12,1% no referido período, que segundo o SINDIVEG deve-se ao ataque da ferrugem asiática na cultura da soja (MAPA, 2015).

O mercado brasileiro de agroquímicos dispõe de 380 ingredientes ativos registrados, os quais são precursores de 1.604 produtos formulados, juntos fornecem um vasto leque de produtos que são aplicados nas lavouras conforme especificações dos órgãos reguladores. Este mercado é constituído majoritariamente por herbicidas, inseticidas e fungicidas, juntas estas três classes de uso, são responsáveis por mais de 95% das vendas do setor de defensivos (KUGLER, 2012; CRUZ, 2014). É importante destacar a dificuldade de acesso aos dados consolidados do setor de defensivos agrícolas, o que torna mais difícil um levantamento preciso do uso dessas substâncias no país, aliado a isso, há também a entrada de agroquímicos contrabandeados, os muitos não apresentam registro de uso no país, e assim se torna fontes potenciais de contaminação ambiental.

2.1.4 Uso de pesticidas: aspectos ambientais

O aumento vertiginoso da população tem exigido uma demanda crescente por alimentos e bens de consumo, como consequência, os sistemas agrícolas adotaram o uso extensivo de fertilizantes químicos e pesticidas (ARIAS et al., 2007; MALHOTRA et al., 2015), os pesticidas e os resíduos de fertilizantes se tornaram umas das principais fontes geradoras de contaminação ambiental.

A maior parte dos pesticidas utilizados na agricultura ou para outros fins tem no solo o seu destino final. Em geral, cerca de 0,1 a 0,3% do total do agrotóxico que é aplicado atinge o organismo alvo, o remanescente se torna fonte de contaminação para os diversos compartimentos ambientais, tais como o solo, a água, o ar e a biota (CARRIGER et al., 2006; GILL e GARG, 2014).

No solo, os pesticidas estão sujeitos a vários processos, tais como, a retenção (sorção), o transporte (deriva, volatilização, lixiviação, carreamento superficial), e a transformação (fotólise, hidrólise, oxidação-redução, degradação biológica), esses processos são determinantes tanto aspecto da eficiência agrônômica como no comportamento ambiental do agrotóxico (OLIVEIRA JÚNIOR e REGITANO, 2009; SPADOTTO et al., 2010).

O comportamento ambiental do agrotóxico é influenciado pelas características físico-químicas da molécula organossintética que compõe o ingrediente ativo (i.a.), propriedades físicas e químicas do solo, matéria orgânica, composição da comunidade microbiana e condições climáticas (FLORES et al., 2004; SPADOTTO et al., 2010). Sendo assim, as principais propriedades físico-químicas dos pesticidas que permitem prever o comportamento e a segurança ambiental destes compostos são: constante da lei de Henry ou coeficiente de partição ar-água (K_H), coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}), coeficiente de sorção (K_D), coeficiente de partição (K_{OC}), constante de dissociação ácido / base (pK_a / pK_b), solubilidade (S_w), meia-vida (DT_{50} , persistência), potencial de bioacumulação e pressão de vapor (MELO et al., 2010).

O processo de retenção se refere à capacidade das partículas minerais e/ou orgânicas do solo de reterem um determinado composto ou molécula orgânica (por exemplo, um pesticida), evitando que este se mova para dentro ou para fora da matriz do solo. Além disso, a retenção do agrotóxico no solo está diretamente relacionada com eficiência agrônômica do mesmo (SCORZA JÚNIOR, 2006; OLIVEIRA JÚNIOR e REGITANO, 2009). O termo sorção tem utilizado para denotar o processo de retenção de moléculas orgânicas pelo solo ou constituintes do solo sem a distinção entre os fenômenos de adsorção, absorção, precipitação ou partição hidrofóbica, em outras palavras, sem indicar os mecanismos envolvidos (LAVORENTI et al., 2003).

A adsorção constitui um processo de superfície, onde ocorre, por ação de forças de atração físicas e químicas, a molécula do pesticida é transferida da fase móvel – solução do solo, para a fase estacionária – partículas do solo ou a matéria

orgânica do solo, diminuindo assim sua disponibilidade na solução do solo (FAY e SILVA, 2004). O processo contrário consiste na dessorção, sendo a interação desses processos determinantes para o comportamento do pesticida no ambiente, no entanto, a medida que o tempo de contato com a matriz servente aumenta, a dessorção tende a ser menor (BRITO et al., 2010).

O processo de sorção determina a fração do agrotóxico que está disponível para sua ação biológica, já que resulta da partição do composto entre a fase sólida (adsorvido às partículas) e a fase líquida do solo (disponível na solução) (LUCHINI e ANDRÉA, 2002). Desta forma, a sorção consiste no principal processo que governa o transporte e a transformação de um pesticida na matriz do solo (LAVORENTI et al., 2003).

Além dos processos de sorção e transporte, os agrotóxicos estão sujeitos à degradação, que tem como consequência a alteração da estrutura química e é decorrente de reações mediadas pelas vias química, fotoquímica e microbiana (BOLLAG e LIU, 1990; LUCHINI e ANDRÉA, 2002). Na degradação pode ocorrer a transformação total ou mineralização do agrotóxico, quando a molécula se degrada completamente em formas inorgânicas amplamente presentes na natureza (CO_2 , H_2O , NH_3 , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} e outros); ou apenas parcialmente, quando o produto resultante, pode perder ou não a atividade tóxica (LUCHINI e ANDRÉA, 2002).

A degradação microbiana tem sido considerada a principal via de desaparecimento da maioria dos agrotóxicos no solo e ocorre pela ação direta dos microrganismos ou indiretamente por meio de seus processos bioquímicos envolvendo atividades enzimáticas (ANDRÉA, 1992). Na maioria das vezes, a atividade da microbiota é um meio pelo qual os agrotóxicos são eliminados dos ecossistemas. É por isso, portanto, que a atividade microbiana se constitui um importante fator regulador da persistência de moléculas xenobióticas no solo (SPADOTTO et al., 2004).

2.2 Clorotalonil: uso e implicações ambientais

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisoflortalonitrilo; CHT) é um fungicida foliar de amplo espectro, não sistêmico, usado extensivamente para controlar infestações fúngicas em diversas culturas, incluindo espécies frutíferas, hortícolas e

ornamentais, além de alguns tipos de grãos (soja e feijão) e cereais (arroz e trigo). Possuindo ainda, registro adicional para uso como aditivo em tintas anti-incrustantes (CHAVES et al., 2007; CASTRO et al., 2011; VAN SCOY e TJEERDEMA et al., 2014).

Nos Estados Unidos, O CHT é usado principalmente na cultura do amendoim (34 % de seu uso), batatas, tomates, campos de golfe e em tintas anti-incrustantes (US EPA, 1999; CAUX et al., 1996). Anualmente, são aplicadas aproximadamente 14 milhões de libras desse fungicida nos Estados Unidos (McMAHON et al., 2011).

No Brasil, a partir desse ingrediente ativo, são formulados 41 produtos comerciais, o CHT figura o terceiro fungicida mais comercializado no país (IBAMA, 2014; AGROFIT, 2015). A maioria das marcas comerciais que possui o clorotalonil como ingrediente ativo é classificada toxicologicamente como produto medianamente tóxico – com rótulo azul, ou extremamente tóxico – rótulo vermelho, e classificação ambiental de produto muito perigoso (AGROFIT, 2015).

Desde o seu primeiro registro, em 1966, o clorotalonil passou ser amplamente utilizado na agricultura mundial. E diversos estudos foram realizados para elucidar seu comportamento e destino no ambiente, bem como os efeitos adversos associados ao seu uso. As principais conclusões obtidas nesses estudos foram compiladas pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, em seu relatório de Decisão de Elegibilidade de Novo Registro (RED). No entanto, os estudos contemplaram ambientes de clima temperado e em condições que não se aplicam aos ambientes de clima tropical, como o clima da América do Sul e Central (CHAVES et al., 2007).

Diante deste fato, existe a carência para estudar o comportamento desse fungicida em regiões de clima tropical, atentando à capacidade da microbiota do solo em promover a degradação desse pesticida. Sabe-se que a degradação microbiana consiste em uma das principais vias de dissipação do clorotalonil no solo (MOTONAGA et al., 1996).

Esse organoclorado possui baixa solubilidade ($S_w = 0,85 \text{ mg L}^{-1}$ a 25°C), persistência de baixa a moderada, meia-vida no solo ($DT_{50} = 5$ a 90 dias). O CHT é uma molécula pouco móvel no perfil do solo, conseqüentemente, não oferece riscos de contaminação de águas subterrâneas, o que é evidenciado pelos altos valores de seu coeficiente de partição ($K_{oc} = 5000 \text{ L Kg}^{-1}$) (WLATZ et al., 2002; VAN SCOY e TJEERDEMA et al., 2014).

Apesar de sua baixa mobilidade no solo, efeitos negativos foram observados em ecossistemas aquáticos após o escoamento superficial (*run off*) a partir de plantações de amendoim, recém-tratadas com o CHT no sudeste dos Estados Unidos (US EPA, 1999). Ao alcançar os corpos de água, o CHT causa efeitos adversos em peixes, aves e invertebrados aquáticos (CAUX et al., 1996).

Assim como outros agrotóxicos, o CHT é fortemente adsorvido ao solo e a matéria orgânica, o que se reflete em sua baixa mobilidade. No entanto, devido a menor disponibilidade de sítios de retenção, solos arenosos, com baixo conteúdo de matéria orgânica, podem aumentar consideravelmente a mobilidade do CHT, conferindo risco de contaminação de corpos de água (VAN SCOY e TJEERDEMA, 2014).

A partir da degradação do CHT, tanto na água quanto no solo, foram identificados diversos metabólitos (BALLEE et al., 1976; SATO e TANAKA, 1987), além da descrição vias de degradação (SATO e TANAKA, 1987; PUTMAN et al., 2003). Um dos principais produtos formado a partir da degradação da molécula parental é hidroxiclorotalonil (4-hidroxi-2,5,6-tricloroisophthalonitrile, CHT-OH, metabólito II), que pode ser formado através da hidrólise, fotólise ou degradação microbiana (SZALKOWSKI e STALLARD, 1977; DAVIES, 1988; KWON e ARMBRUST, 2006). A presença deste metabólito pode causar inibição da degradação microbiana do CHT, devido à sua toxicidade para os microrganismos (MOTONAGA et al., 1996).

Outros metabolitos têm sido detectados no ambiente, dentre os quais se incluem as formas substituídas do CHT, tais como, 1,3-dicarbamoil-2,4,5,6-tetraclorobenzeno (metabolito III), 2,5,6-tricloro-4-methoxyisophthalonitrile (metabolito IV), 1-carbamoil-3-ciano-4-hidroxi-2,5,6-triclorobenzeno (metabolito V); 2,4,5-tricloroisophthalonitrile (metabolito VI), 2,5,6-tricloro-4-methylthioisophthalonitrile (metabolito VII) e 1,3-dicianobenzeno (metabolito VIII) (Figura 1) (PUTNAM et al., 2003).

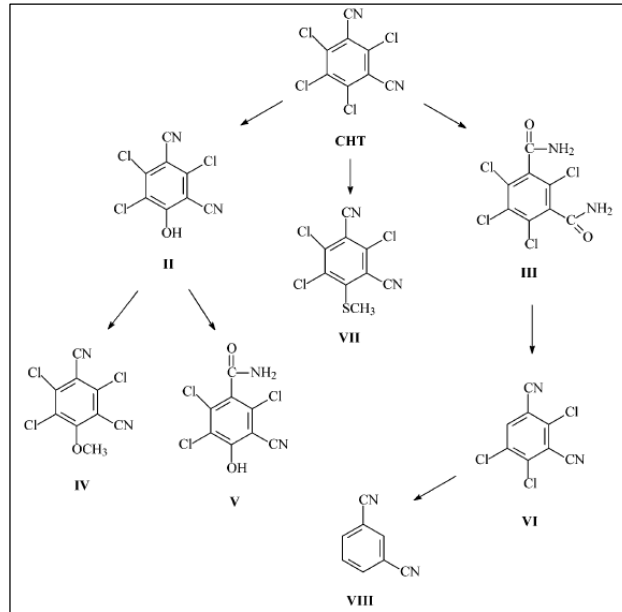


Figura 1 – Clorotalonil e seus metabólitos e representação das possíveis rotas de degradação no ambiente (adaptado de PUTMAN et al., 2003)

As concentrações de CHT e seus metabólitos nos solos têm sido relatados variando de 100 a 10.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No entanto, informações de toxicidade estão disponíveis apenas o metabólito II, que possui toxicidade aguda para peixe cerca de 30 vezes maior que o composto parental, além de ser mais persistente que o CHT (US EPA, 1988).

Em seres humanos, o clorotalonil pode causar dermatites, irritações nos olhos e pele, além de problemas gastrointestinais (DRAPER et al., 2003). E ainda é classificado pela EPA como substância carcinogênica (MARTINS e VARGAS, 2013).

2.3 Biochar: sorção de pesticidas e efeitos na microbiota solo

2.3.1 Biochar como adsorvente

O termo biochar refere-se a materiais ricos em carbono (carvão) produzidos a partir da pirólise da biomassa (aquecimento na ausência de oxigênio), com a finalidade de uso na agricultura. A motivação maior do biochar é o sequestro do C atmosférico e seu armazenamento em larga escala no solo, via aplicação do material pirolisado (LEHMANN e JOSEPH, 2015; SOHI et al., 2010).

O manejo do solo com biochar tem sido amplamente recomendado, uma vez que sua adição ao solo é associada à mitigação os efeitos das atividades antrópicas

sob as mudanças climáticas, através do sequestro e incorporação do C em larga escala no solo, além promover melhorias nas propriedades do solo (KOOKANA et al., 2011; TANG et al., 2013).

Por outro lado, o biochar pode ser produzido a partir de diversos tipos de biomassa (resíduos agrícolas, da indústria de madeira, esterco, lodo de esgoto, etc.), nesse sentido, o biochar se insere como ferramenta econômica e ambientalmente sustentável para a reciclagem de biomassa oriunda dessas atividades (NOVOTNY et al., 2015).

O interesse no biochar como manejo do solo teve início com estudos da matéria orgânica da Terra Preta de Índios (TPI), nos solos antropogênicos da Amazônia, os quais possuem excelentes características agronômicas e ambientais, exibindo alta fertilidade e alto conteúdo de carbono estável (de origem pirogênica) em sua fração orgânica, o que forneceu um modelo de solo adequado ao sequestro de carbono (MAIA, 2010).

No entanto, o foco recente de interesse no modelo do biochar deixou de ser apenas no sequestro de C e mitigação das mudanças climáticas, e se expandiu à melhoria da fertilidade do solo e crescimento das culturas, retenção de água e nutrientes no solo, adsorção de poluentes orgânicos no solo (CERNANSKY, 2015).

Adsorção de contaminantes orgânicos (por exemplo, pesticidas) consiste em um processo chave na determinação destino final dessas substâncias no ambiente (DECHENE et al., 2014). Uma vez que são que lançados no ambiente, seja de maneira intencional ou acidental, esses xenobióticos podem exercer efeitos tóxicos para o ecossistema ao se moverem através do solo, se transferindo para as culturas ou para a biota ou ainda lixiviar e atingir as águas subterrâneas (TANG et al., 2014).

Compostos carbonáceos, como o biochar têm atuado como um eficiente adsorvente para diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos, devido à sua alta área de superfície específica (SSA) e a aromaticidade (KOOKANA et al., 2011; AHMAD et al., 2014; BRENNAN et al., 2014). A microporosidade e os mecanismos de deformação dos poros também interferem na sorção de pesticidas pelo biochar, podendo causar histerese na dessorção, o que sugere que esse tipo de reação está relacionado com a partição e não com processos de superfícies (LOGANATHAN et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

A sorção de poluentes orgânicos é fortemente influenciada pelas propriedades físico-químicas do biochar, e essas são afetadas pelo tipo de biomassa, pelas condições de pirólise e pela temperatura de carbonização (SOHI et al., 2010; KEILUWIET et al., 2010).

De forma geral, biochars produzidos em temperaturas mais altas (>500°C), resultam em materiais mais carbonizados, com maior SSA e poucos grupos funcionais e maior grau de aromaticidade, por sua vez, os biochars de baixas temperaturas de pirólise (< 400°C) resultam em um material parcialmente carbonizado com reduzida SSA e um maior grau de grupos funcionais (CHUN et al., 2004; KOOKANA et al., 2010).

Considerando a remediação de poluentes orgânicos (pesticidas), os biochars com alta SSA possuem maior capacidade adsorvente, diminuindo a disponibilidade da substância na solução do solo, sua mobilidade e os seus efeitos biológicos (TAN et al., 2015).

A biodisponibilidade é um fator crucial tanto no aspecto dos efeitos desejáveis (controle de pragas) quanto nos efeitos indesejáveis (saúde humana e ambiental), além disso, interfere diretamente na persistência e degradação de pesticidas no ambiente (ZHENG et al., 2010; AHMAD et al., 2014).

Sendo assim, o manejo do solo com biochar é tido como uma alternativa viável e econômica, não apenas por que pode remediar os efeitos adversos de pesticidas e outros contaminantes do solo, mas também por que atua como condicionante do solo, promovendo melhorias nas propriedades abióticas e bióticas do solo, concomitantemente, assegurando a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

2.3.2 Efeito da adição do biochar sobre a microbiota do solo

As comunidades microbianas do solo são sensíveis à adição do biochar no solo, sendo o biochar um material resistente (recalcitrante) no solo, podendo permanecer no solo por período de 1000 a 1500 anos. Dessa forma, espera-se que a presença do biochar promova alterações na estrutura e na função das comunidades microbianas do solo (GUL et al., 2015).

Uma vez que o biochar tem sido amplamente recomendado como uma tecnologia para restaurar e recuperar solos inférteis e degradados (CHOPPALA et al., 2012; PURAKAYASTHA et al., 2015), é importante também considerar os seus

efeitos sobre a microbiota do solo, tanto a curto como a longo prazo (QUILLIAN et al., 2013; GUL et al., 2015; KUPPUSAMY et al., 2016).

Nesse contexto, estudos recentes destacam que os principais mecanismos de interação do biochar-microbiota do solo envolvem o fornecimento de novos habitats, refúgio contra predadores, proteção contra dessecação, adsorção de compostos orgânicos e nutrientes inorgânicos pelas superfícies do biochar, além a fração volátil do biochar recém-aplicado, que é tida como fonte preferencial de carbono por colonizadores primários (BREWER e BROWN, 2012; STEWART et al., 2013; QUILLIAN et al., 2013).

A porosidade do biochar exerce forte influência sobre os microrganismos, tanto por fornecer novos nichos quanto por oferecer abrigo e proteção contra predadores. Os macroporos do biochar (> 200 nm) possivelmente atuam com habitats microbianos, uma vez que seu tamanho é compatível com espaço requerido por bactérias (0,3 – 3 μm), fungos (2 – 80 μm) e protozoários (7 – 30 μm), servindo de abrigo e proteção (QUILLIAN et al., 2013; JAAFAR et al., 2014). Os microporos (<2 nm) e mesoporos (2 – 50 nm) podem estocar água e ar, além de substâncias orgânicas dissolvidas necessárias ao metabolismo microbiano, concomitantemente, disponibilizando novos nichos (BREWER e BROWN, 2012; GUL et al., 2015).

Assim como os poros do biochar, suas cargas de superfície podem contribuir com a colonização e o aumento da biomassa microbiana por meio do aumento da adesão das células microbianas às superfícies do biochar (STEWART et al., 2013). Estas cargas podem reter compostos orgânicos solúveis e de fácil degradação, favorecendo a colonização e a multiplicação de bactérias e fungos (SANTOS et al., 2012).

Diversos estudos têm relatado o aumento na biomassa microbiana de solos manejados com biochar, e utilizados em doses de aplicação variando de 1 a 10% da massa do solo (AMELOOT et al., 2013; DAMISIE et al., 2014; DOMENE et al., 2014; ZHANG et al., 2014). A biomassa é descrita como parâmetro importante na determinação da qualidade do solo, sendo seu aumento diretamente proporcional ao crescimento microbiano (ZHANG et al., 2014).

Vale destacar, que mesmo sendo de natureza recalcitrante, o biochar é passível de servir como fonte de nutrientes para a biomassa microbiana. Sua maior influência sobre a microbiota do solo advém de materiais prontamente metabolizáveis (remanescentes do processo de pirólise), da sua capacidade de reter

água e nutrientes, além das alterações do pH do solo (KUPPUSAMY et al., 2015; SINGH et al., 2015).

Alguns estudos têm destacado a influência do biochar na estruturação das comunidades microbianas do solo. O biochar interfere principalmente na relação bactéria-fungo, sendo observado em grande parte destes estudos, uma maior abundância de organismos pertencentes ao domínio Bactéria nos solos adicionados de biochar (SUN et al., 2012; GOMEZ et al., 2014; MUHAMMAD et al., 2014). As mudanças no pH do solo induzidos pelo biochar são mais favoráveis a multiplicação bacteriana nos períodos pós-aplicação do biochar. Com o passar do tempo, o pH do solo tende a cair, favorecendo então a maior multiplicação de fungos (ZIMMERMANN et al., 2012). O biochar também induz alterações na abundância de grupos microbianos relacionados a funções mais específicas no ecossistema, por exemplo, grupos microbianos envolvidos na fixação biológica de nitrogênio (DUCEY et al., 2013), e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (SOLAIMAN et al., 2010), além da redução na abundância de microrganismos fitopatogênicos (THIES e RILLIG, 2009). Desta forma, pode-se sugerir que o biochar favorece a ciclagem de nutrientes, aumenta a fertilidade do solo, e diminui a ocorrência de patógenos no solo, conseqüentemente levando a um aumento na produtividade e sustentabilidade das culturas.

Por outro lado, a literatura relata efeitos negativos da aplicação do biochar sobre as comunidades microbianas, por exemplo, a redução na biomassa microbiana do solo, a diminuição da atividade microbiana e da atividade enzimática e decréscimo da abundância de FMA (CHAN et al., 2008; GEORGE et al., 2012; AMELOOT et al., 2013). Embora não sejam totalmente esclarecidos os mecanismos que explicam estes efeitos negativos, sugere-se que a presença de substâncias tóxicas aos microrganismos remanescentes do processo de pirólise, tenham ação bactericida ou fungicida, dessa forma alterando de maneira deletéria a estrutura dessas comunidades no solo (PAINTER, 2001).

2.4 Comunidade microbiana do solo e a degradação de pesticidas

O solo possui uma das maiores reservas de diversidade biológica do planeta, composta por organismos pertencentes aos domínios evolutivos *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* (BELL et al., 2005; LAMBAIS et al., 2005; STURSA et al., 2009),

aos quais são atribuídos importantes papéis em todos os processos que ocorrem no ecossistema (BARRIOS, 2007; HARTMANN et al., 2015). Recentes estimativas têm mostrado que a população de procariotos em solos é estimada entre $10^8 - 10^{10}$ células bacterianas por grama de solo, compreendendo entre 5.000 a mais de 1.000.000 de diferentes espécies (BURNS et al., 2013).

Os microrganismos que habitam o solo estão diretamente relacionados a funções de grande importância para o funcionamento do solo, tais como os ciclos biogeoquímicos, a decomposição da matéria orgânica, a fixação biológica de N_2 , a solubilização de nutrientes e a degradação de substâncias xenobióticas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2014). No entanto, pouco é conhecido sobre microrganismos envolvidos em funções mais restritas, por exemplo, a degradação de substâncias xenobióticas (OLIVEIRA et al., 2014).

Com os avanços do conhecimento científico acerca da capacidade que os microrganismos possuem de biodegradar substâncias orgânicas xenobióticas, estes vêm sendo utilizados como agentes remediadores de sítios de contaminação por metais pesados, pesticidas e outros xenobióticos (SOARES et al., 2011; POLONIO et al., 2014).

Diversos trabalhos já descreveram experimentos utilizando microrganismos na biorremediação dos mais diversos ambientes, evidenciando o potencial biotecnológico de fungos e bactérias. Essa capacidade inerente aos microrganismos tem sido explorada tanto *in situ* (bioestimulação e bioaugmentação) quanto em *ex situ* (biorreatores aeróbicos ou anaeróbicos) (POLONIO et al., 2014). Para a escolha de um microrganismo com potencial uso na remediação de áreas contaminadas, tem-se recorrido ao *screening*, isolamento, caracterização e testes de laboratório, onde são avaliados a capacidade para degradar o contaminante alvo e o tempo necessário que o processo ocorra (SOARES et al., 2011).

Nesse contexto, diversos estudos têm relatado gêneros de fungos com capacidade para biodegradar parcial ou totalmente vários xenobióticos. Por exemplo, COLLA et al. (2008) verificam que os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* mostraram-se promissores quanto à capacidade de degradar os compostos triazínicos. O mesmo trabalho sugere a possibilidade da aplicação desses fungos em estudos de biorremediação de solos contaminados com herbicidas triazínicos. Do mesmo modo, BORDJIBA et al. (2001) realizaram o isolamento de fungos a partir de amostras de solos contaminados e não

contaminados com pesticidas. As espécies mais frequentes foram os fungos *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Absidia corymbifera* e *Rhizopus microsporus*, que não apresentaram sensibilidade aos pesticidas.

As bactérias também são consideradas importantes agentes degradadores de poluentes ambientais, isto devido a sua rápida multiplicação e capacidade de adaptação as variações ambientais, alta versatilidade metabólica e plasticidade genética (TONINI et al., 2010). Conhecidas por sua versatilidade adaptativa, bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido frequentemente descritas por degradarem uma variada gama de compostos xenobióticos, tais como, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (derivados do petróleo), pesticidas organoclorados (DDD, dieldrin, PCP), herbicidas (2,4-D, atrazina), além da biosorção de metais pesados (TONINI et al., 2010; KASEMODEL, PORTO e NITSCHKE, 2014; UETA et al., 1999).

Em estudo recente, DENG et al. (2015) observaram rápida degradação de inseticidas organofosforados por linhagem bacteriana isolada da lama de drenagem da fábrica de clorpirifos. Nas primeiras 24 horas, a linhagem estudada de *Stenotrophomonas* sp. degradou 100% do metil paration, metil paraoxon, dianona e foxima, 95% do paration, 63% do clorpirifos, 38% dos profenofós e 34% dos triazofós. Recorrendo a técnica de isolamento, FAY et al. (2006) encontraram linhagens de *Arthrobacter* sp. que exibiram elevada capacidade degradadora para o organoclorado clorotalonil, essas linhagens promoveram dissipação de 100% do pesticida em 20 dias.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da diluição da comunidade microbiana do solo sobre a dissipação do clorotalonil no solo adicionado ou não de biochar.

3.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a alteração da comunidade microbiana do solo afeta a mineralização do clorotalonil;
- Avaliar o efeito do biochar sobre a biodisponibilidade do clorotalonil e sobre a estrutura da comunidade de bactérias;

3.2 Hipótese

O presente trabalho teve como hipótese o fato de que a alteração na comunidade microbiana do solo, promovida pela metodologia de 'diluição para extinção' afeta a dissipação do fungicida clorotalonil no solo, sendo esta repostada distinta em solos onde correu ou não a aplicação de biochar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra de solo

O solo utilizado neste trabalho foi coletado em uma área pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Lat. 22°43’3,06” S, Long. 47°36’58.33” O). O local de amostragem do solo caracterizava-se pela ausência de histórico de aplicação de pesticidas. As amostras de solo foram obtidas na camada 0 – 10 cm, em três pontos de coleta distintos, que posteriormente ocorreu a mistura, constituindo em uma amostra composta.

As propriedades físicas e químicas do solo foram determinadas no laboratório de análise de solo do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ. As características foram determinadas tanto para o solo sem alteração - solo natural (SN), quanto para o solo alterado pelo processo de esterilização, solo autoclavada (SA), os parâmetros determinados foram: areia total, silte e argila, pH em CaCl_2 0,01 mol L⁻¹, M.O., P, K, Ca, Mg, acidez potencial (H + Al) e os cálculos SB, CTC, V % e são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas e classificação do solo utilizado no estudo

Propriedades físicas e químicas	Latossolo Vermelho Álico (LVa) *	
	Solo Natural	Solo Estéril
(1) Areia (g Kg ⁻¹)	723,00	720,00
Silte (g Kg ⁻¹)	67,00	54,00
Argila (g Kg ⁻¹)	210,00	226,00
(2) M.O. (g dm ⁻³)	41,00	48,00
(3) pH (CaCl ₂)	5,00	5,20
(4) P (mg dm ⁻³)	25,00	17,00
K (mmolc dm ⁻³)	2,90	3,60
Ca (mmolc dm ⁻³)	18,00	22,00
Mg (mmolc dm ⁻³)	11,00	12,00
(5) H + Al (mmolc dm ⁻³)	28,00	22,00
(6) SB (mmolc dm ⁻³)	31,90	37,60
(7) CTC (mmolc dm ⁻³)	59,90	59,60
(8) V (%)	53,00	63,00

*Torrado e Sparovek (2003); (1) granulometria determinada por densímetro de Buyoucos; (2) matéria orgânica; (3) potencial hidrogeniônico; (4) P, K, Ca e Mg – método da resina trocadora de íons; (5) acidez potencial determinada por SMP; (6) Soma de bases; (7) capacidade de troca de cátions; (8) saturação por bases (%).

4.2 O biochar utilizado

O biochar utilizado no estudo foi gentilmente cedido pelo grupo de trabalho do professor do Departamento de Ciências do Solo da ESALQ-USP, Dr. Carlos Eduardo Pellegrino Cerri. O biochar foi produzido a partir da palha de cana-de-açúcar, em temperatura de pirólise de 650°C, e caracterizado por CONZ (2015) (Tabela 2).

Tabela 2 – Características da matéria prima do biochar e do biochar utilizado no estudo de microcosmos de dissipação do clorotalonil

Caraterísticas físico-químicas	Palha de cana-de-açúcar	
	Matéria prima	Biochar 650 °C
pH	5,80	9,20
CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1847,10	1947,36
CTC (mmolc kg^{-1})	190,00	172,00
C (%)	43,00	70,00
N (%)	1,10	1,50
O (%)	50,70	26,70
H (%)	6,00	2,46
P (g kg^{-1})	0,90	2,60
K (g kg^{-1})	9,64	13,77
Mg (g kg^{-1})	1,65	3,75
Ca (g kg^{-1})	5,90	7,90

Adaptado de: CONZ (2015)

4.3 Padrão do pesticida e os reagentes de rotina

O pesticida empregado no ensaio foi o fungicida clorotalonil (CHT), radiomarcado com isótopo ^{14}C (^{14}C -CHT), possuindo atividade específica de $0,20 \text{ MBq } \mu\text{mol}^{-1}$ e grau de pureza $\geq 98\%$ e o padrão analítico com pureza $> 95\%$, ambos fornecidos pela ISK Biosciences (Mentor Ohio, part of Zeneca Inc.). Os reagentes analíticos utilizados na rotina para a análise do pesticida clorotalonil foram acetona,

metanol e tolueno (Biosciences Mallinckrodt, St. Louis, MO). Para determinar as contagens por Cintilação Líquida (SL) utilizou-se o coquetel cintilador de RUEGG e MESQUITA (1984).

4.4 Microcosmos

4.4.1 Montagem dos microcosmos

O experimento foi conduzido em laboratório, contando com a montagem de dois microcosmos simultâneos, sobre as mesmas condições (mesmos tratamentos), diferindo apenas quanto a aplicação da molécula do clorotalonil.

No microcosmo I, utilizou-se a molécula fria do clorotalonil (produto com grau técnico não-radioativo) e a partir da incubação em solos hospedando diferentes comunidades microbianas, avaliou-se resposta da comunidade bacteriana no solo manejado com ou sem biochar. Já no microcosmo II foi aplicado a molécula radiomarcada do clorotalonil (^{14}C -CHT), e foram avaliados os seguintes parâmetros: taxa de mineralização, degradação, resíduos ligados e formação de metabólitos tanto no solo manejado com biochar como no solo sem biochar.

O delineamento experimental utilizado nos microcosmos foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial conforme apresentado no quadro 1.

Microcosmo I = 2 TRT x 1 PST x 4 NC x 3 RPT x 3 TMP = 72 amostras

Microcosmo II = 2 TRT x 1 PST x 4 NC x 2 RPT x 4 TMP = 64 amostras

Quadro 1 – Esquema experimental dos microcosmos. TRT – tratamentos (com biochar e sem biochar); PST – pesticida (clorotalonil); NC – níveis da comunidade (SN, 10-3, 10-3 e 10-6); RPT – repetições; TMP – tempo de avaliação (0, 7*, 21, 42 dias). *Não foi analisado no microcosmo I

4.4.2 Avaliação da comunidade bacteriana

4.4.2.1 A alteração da comunidade microbiana por diluição

A alteração na comunidade microbiana do solo foi realizada através da esterilização do solo, seguida de posterior inoculação com níveis distintos da comunidade microbiana do solo natural, obtidos através da 'diluição para extinção' (WERTZ et al., 2006; VAN ELSAS et al., 2012). Basicamente, uma suspensão inicial do solo (10% m/v) foi utilizada para gerar diferentes diluições da comunidade microbiana inicial.

O princípio da diluição é eliminação de grupos microbianos menos abundantes na comunidade, dando origem a solos com menor quantidade de espécies de microrganismos ao longo da diluição. Esse tipo de abordagem tem sido descrito como uma ferramenta para simular perturbações na comunidade microbiana, de modo que, possibilita a previsão dos impactos de sua alteração nos serviços ecossistêmicos prestados pela biodiversidade dos solos (HERNANDEZ-RAQUET et al., 2013).

Concomitantemente, amostras do mesmo solo foram secas ao ar, tamisadas em peneira de 2,0 mm, e separadas em alíquotas de 25 g cada. Estas foram submetidas ao processo de esterilização, promovido por autoclavagem (120°C, 1,0 atm, durante 3 ciclos de 60 minutos). A eficiência deste processo foi verificada através da diluição e plaqueamento das amostras de solo após a autoclavagem em meio de cultura rico em nutrientes (Apêndice A).

As amostras de solo esterilizado receberam posteriormente, a inoculação de diferentes suspensões geradas pela diluição da amostra de solo inicial, sendo os níveis de diluição utilizados no experimento 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} . Como controle foi utilizado o solo natural.

A estruturação diferencial da comunidade microbiana foi realizada utilizando a comunidade bacteriana como indicadora. Esta foi estudada pela técnica de PCR-DGGE, sendo os períodos de coleta de 0, 5, 10 e 15 dias antes da aplicação do clorotalonil e do biochar. Já no período pós aplicação do CHT e do biochar, a estrutura da comunidade bacteriana foi estudada nos tempos 0, 21 e 42 dias.

4.4.2.2 Aplicação do biochar e do clorotalonil nos microcosmos

Uma vez que é conhecido que este sistema precisa de um período para que a quantidade de organismos seja uniforme entre os tratamentos, a aplicação do biochar e da molécula alvo nos tratamentos foi realizada 15 dias após a montagem dos tratamentos com as diferentes diluições.

O biochar foi adicionado as amostras de solo na dose de 10 ton ha⁻¹ (1% m/m). Enquanto o clorotalonil foi aplicado na dose de campo de 1,8 kg do i.a. ha⁻¹ (1,385 µg do i.a. g⁻¹ de solo).

4.4.2.3 Análise da estrutura da comunidade bacteriana

Para esta análise, o DNA total das amostras coletadas foi extraído com auxílio do *kit* comercial *Power Soil DNA Isolation* (MoBio, Carlsbad, EUA), seguindo as especificações técnicas do fabricante. A qualidade do produto extraído (~100µL) foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo as amostras, posteriormente, coradas em solução de brometo de etídeo e visualizadas em luz ultravioleta.

A comunidade bacteriana do solo foi avaliada através da técnica de *fingerprinting* PCR-DGGE (*Polimerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (MUYZER et al., 1993). O DNA total foi usado para a amplificação do gene 16S rDNA domínio Bactéria, realizado por meio de PCR contendo os *primers* 027F/1492R (HEUER et al., 1997), com tamanho esperado dos amplicons de aproximadamente 1500 pares de base. A reação de PCR para amplificar o fragmento de DNA alvo consistiu de 2,5 µL de PCR buffer 1x, 3,75 µL de MgCl₂ (3,75 mM), 0,25 µL de BSA, 2,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,05 µL dos primers (0,20 pmol), 0,25 µL de Taq Polimerase (0,05 U/µL), 15,15 µL de milli-Q e 1,0 µL do DNA molde (~ 50ng) para um volume final da reação de 25 µL. As condições de amplificação no termociclador (Viriti® Applied Biosystems) consistiram em 94 °C por 1 min, seguidas por 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 63 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C durante 10 min, 4° C até a retirada das amostras do termociclador, conforme NÜBEL et al. (1996).

Para confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA alvo, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e o tamanho

dos amplicons foi determinado por comparação com o marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences), este procedimento aplicou-se em todas as reações subsequentes.

A segunda reação (*Nested-PCR*), consistiu de 1,0 µL do produto da primeira reação de PCR, sendo submetido à amplificação através dos *primers* 968-GC/1387R (KOZDRÓJ e VAN ELSAS, 2001). Esses *primers* têm como alvo a região hipervariável V6-V8 do gene 16S rDNA domínio Bactéria (VALASKOVÁ e BALDRIAN, 2009), com tamanho de amplicons esperado de aproximadamente 450pb.

A reação de PCR constituiu de 5,0 µL PCR buffer 1x, 5,0 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 0,50 µL de formamida, 4,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,10 µL dos primers (0,20 pmol), 0,50 µL de Taq Polimerase (5,0 U/µL) e 33,80 µL de milli-Q e 1µL do DNA resultando no volume final de 50 µL. As condições de amplificação no termociclador (Viriti® Applied Biosystems) foram 94 °C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56°C por 1 min, 72 °C por 2 min e uma extensão final a 72 °C por 10,00 min.

Para confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA alvo, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e o tamanho dos amplicons foi determinado por comparação com o marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences), este procedimento aplicou-se em todas as reações subsequentes.

A análise por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada no Ingeny PhorU2 System (Ingeny, Goes, Holanda), em gel na concentração de 6% de poliacrilamida para separação de fragmentos de DNA de 300 - 1000 pares de base, essa janela de separação é utilizada bactérias.

O gradiente desnaturante utilizado foi 45% a 65%, onde 100% de desnaturação corresponde a concentração de 7 M de uréia e 32% de formamida. Foram aplicados 12 µL do produto da reação de PCR amplificado através do *primer* com o “grampo-GC” (MUYZER et al.,1993) acrescido de 5 µL de LB (*Loading Buffer* 6x) e posteriormente carregados no gel.A corrida de DGGE foi realizada a 60°C e submetida a uma corrente de 100 volts durante 16 horas. Os géis foram corados com SYBR-green® (Invitrogen, Breda, The Netherlands), em TAE 0,5 x, por 15 minutos na ausência de luz e escaneados em Storm 845: New Phosphorimager/Gel Scanner.

4.4.2.4 PCR quantitativo (qPCR) do gene 16S rRNA

A quantificação do gene 16S rDNA nas diferentes amostras de solo foi realizada através de reações em PCR quantitativa (qPCR), utilizando o marcador fluorescente Syber® Green PCR Master Mix 2 x (Applied Biosystems®).

Para as reações de PCR foram utilizados os *primers* 341F 1 (5' - CCTACGGGAGGCAGCAG- 3') e 534R 2 (5' -ATTACCGCGGCTGCTTGG- 3'), os quais têm como alvo de amplificação o gene 16S rDNA (marcador filogenético para o domínio Bactéria) (LOPEZ-GUTIERREZ et al., 2004). As reações foram montadas em placas de MicroAmp Optical 48-Well, sendo o volume final de cada reação 25 µL (24 µL do mix + 1µL do DNA da amostra), para cada em ensaio foram utilizados três controles negativos (ausência de DNA) para assegurar que não houvesse contaminação externa, submetidos às mesmas condições de amplificação das amostras com DNA alvo, além disso foram adicionadas as curvas *melting* em cada reação de amplificação para monitorar a pureza dos produtos da PCR. As condições de amplificação foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial equivalente a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, sendo realizada ao término uma extensão final de 72 °C por 45 s (MOSONI et al., 2007).

As curvas padrões conhecidas foram utilizadas em diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-8}) em todas reações realizadas, possibilitando que os dados obtidos nas amostras de solo (valor de Ct) fossem interpolados entre os valores das curvas, determinando o número de cópias do gene 16S rDNA por grama de solo (PEREIRA, 2014).

4.5 A dissipação do clorotalonil

4.5.1 Teste de sorção

Para este teste, amostras de 5,0 g de solo foram transferidas para frascos de teflon de 50 mL em duplicatas, na sequência, tratadas com a dose 10 ton ha^{-1} de biochar, sendo utilizado três tamanhos de biochar (fino, 2 mm e inteiro), o controle não recebeu biochar. O clorotalonil radiomarcado (^{14}C) foi aplicado na solução de CaCl_2 $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ (solução de trabalho), em uma concentração de $0,2740 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,1644 \text{ kBq mL}^{-1}$), posteriormente, 25 mL da solução de trabalho foram adicionados

em cada frasco. Os frascos foram submetidos a agitação de 120 rpm durante 4 horas, após esse período, as suspensões nos frascos foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e 1 mL do sobrenadante da suspensão foi coletado e quantificado por cintilação líquida. A quantidade sorvida do fungicida foi obtida a partir da diferença entre a concentração inicial e o remanescente do pesticida na solução.

4.5.2 Mineralização do clorotalonil

A mineralização do pesticida foi acompanhada durante 42 dias, sendo os períodos de análises (1, 7, 21 e 42 dias), o experimento constou de 64 amostras tratadas com dose de 1,8 kg do i.a. de CHT ha⁻¹, e solo foi manejo com 10,0 ton ha⁻¹ de biochar, sendo 16 amostras utilizadas em cada período de análise.

O experimento de mineralização foi realizado através da metodologia do respirômetro de Bartha, o ¹⁴C-CHT respirado foi capturado em 10 mL de solução de 0,2 N de NaOH, alíquotas 1 mL, em duplicata, de cada amostra, foram pipetadas em 10 mL do coquetel cintilador de RUEGG e MESQUITA (1984), e submetidas à contagem no cintilador líquido, durante 3 minutos.

4.5.3 Degradação do clorotalonil

O Clorotalonil radiomarcado (¹⁴C-CHT) foi extraído nos períodos de 0, 1, 7, 21 e 42 dias, a extração foi realizado a partir solo incubado no respirômetro de Bartha, logo após a retirada da alíquota de ¹⁴C-NaOH para a contagem, o solo foi transferido para frascos de teflon (250 mL), em seguida, foram adicionados 50 mL de acetona e os frascos foram submetidos a agitação no *shaker* horizontal a 200 rpm durante 4 horas. Na sequência os frascos foram centrifugados por 15 minutos a 3000 RPM, e alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante foram coletadas e submetidas à contagem no cintilador líquido. O restante do sobrenadante foi coletado, os frascos foram pesados e adicionou-se outros 50 mL de acetona para a segunda bateria de extração, seguindo a mesma sequência já descrita anteriormente.

No período T = 0 dia, foram utilizados 4 frascos (pré-teste), sendo 2 para o solo adicionados de biochar e outros 2 para o solo sem adição de biocarvão, após a

aplicação do ^{14}C -CHT foram adicionados 50 mL de acetona em cada frascos, os quais foram submetidos as condições de extração anteriormente descritas.

4.5.4 Resíduos ligados

A determinação dos resíduos não extraíveis foi realizada pelo método de combustão seca no *Biological Oxidizer-OX 500*. Amostras de 0,2 g de solo (triplicatas) foram submetidas ao processo de combustão a 900°C , com fluxo de $270\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$ de O_2 , por 3 minutos. O $^{14}\text{CO}_2$ liberado na combustão das amostras foi coletado em 10 mL da solução cintiladora de MESQUITA e RUEGG (1984) e mensurado por cintilometria (PEIXOTO et al., 2000; REGITANO et al., 2001).

4.5.5 Formação de metabólitos

Os metabólitos presentes no sobrenadante (extratos), formados a partir da degradação do ^{14}C -CHT foram determinados por TLC. Para tanto, os extratos foram concentrados em rotavapor e ressuspendidos em 3,0 mL de acetona, na sequência, 100 μL de cada extrato foi aplicado em placa de sílica gel, com auxílio do aplicador automático, as placas foram eluídas em de fase móvel que consistiu de tolueno/metanol/acetona (2:1:1). Os valores de R_f obtidos foram avaliados em Analisador Linear Automático de TLC (REGITANO et al., 2001). O produto técnico do clorotalonil foi utilizado como padrão analítico para comparar quanto da molécula parental ainda estava presente em cada amostra.

4.6 Forma de análise dos dados

Os dados gerados a partir do ensaio de dissipação do fungicida clorotalonil foram tabulados e as curvas de dissipação foram plotadas a partir do balanço de massa. Os fragmentos de DNA separados no gel de eletroforese em gradiente desnaturante constituíram o perfil da comunidade bacteriana do solo, de forma que cada banda formada no gel foi tomada como uma unidade taxinômica operacional distinta. Através da marcação das bandas no gel, com o auxílio do software

IMAGEQUANT® (GE Healthcare Life Sciences), o perfil dessa comunidade foi obtido, na sequência foi gerada uma matriz de similaridade.

A matriz foi submetida à análise de multivariada no Software PAST® (HAMMER et al., 2001), sendo aplicada a análise de Coordenadas Principais (PCoA) para ordenar as amostras de acordo com as dissimilaridades (RAMETTE et al., 2007). Os grupos formados na PCoA também foram submetidos a análise de similaridade (ANOSIM) com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da comunidade bacteriana

5.1.1 Alteração da comunidade bacteriana por diluição

Foi possível observar a ordenação de 4 grupos microbianos distintos, formados por amostras oriundas de diferentes níveis de diluição da comunidade microbiana original (Figura 2). No período inicial (0 dia), esses agrupamentos já foram influenciados pela diluição da comunidade microbiana do solo. A dinâmica de agrupamentos consistiu dos grupos “g1”, “g2” e “g3”, compostos por SN, D1 – D3 e D6, respectivamente (Figura 2 A). Pela análise de similaridade (ANOSIN), o agrupamento “g1” se mostrou distinto dos agrupamentos “g2” e “g3”, mas exibiu separação com sobreposição do agrupamento “g2” ($R_{\text{Bray Curtis}} = 0,6975$, $p < 0,0001$) (Anexo A).

O tempo de incubação exerceu influencia no distanciamento dos grupos bacterianos formados durante a estruturação da comunidade. Comportamento similar ao período inicial foi observado na dinâmica de estruturação da comunidade bacteriana ao longo dos períodos 5 e 10 dias (Figura 2 B e C), entretanto, a análise de similaridade indicou maior separação entre os agrupamentos ($R_{\text{Bray Curtis}}$ variando de 0,7963 – 1,000, $p < 0,0001$) (Anexo A). Já no período de 15 dias, a distribuição dos grupos microbianos sofreu forte mudança em sua dinâmica, havendo alteração na ordenação dos grupos (SN > D1 > D3 - D6), sendo que a comunidade bacteriana do SN se mostrou bastante distinta (com maior diversidade) das comunidades nos solos diluídos e foi mais próxima da apresentada pela D1 (Figura 2 D). Essa modificação deve-se a remoção de grupos microbianos menos abundantes, que são perdidos ao longo dos fatores de diluição, dessa forma ocorre a diminuição no número de espécies microbianas na amostra, permanecendo àquelas com maior abundância de espécies na amostra (WERTZ et al., 2007; CRAVO-LAUREAL et al., 2011; PETER et al., 2011).

No entanto, há o consenso que comunidades microbianas com maior diversidade devem apresentar melhor desempenho em termos de funcionamento, estabilidade, ciclagem e transferência de nutrientes, além de maior resistência às perturbações externas, o que foi o caso do SN (TILMAN et al., 1996; CARDINALE et al., 2002; GUL et al., 2014).

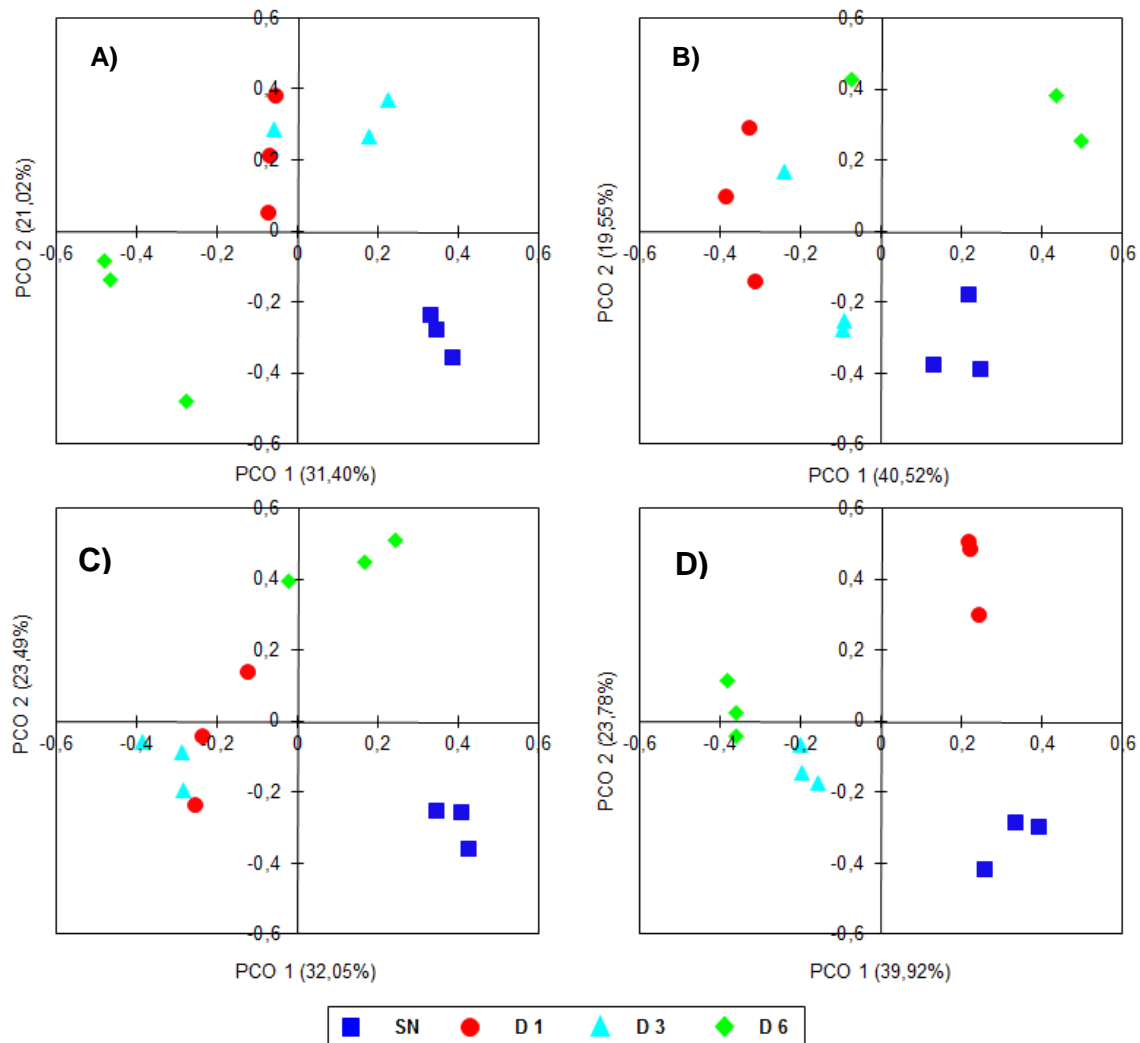


Figura 2 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de bandas do gene 16S rDNA dos níveis de diluição da comunidade bacteriana do solo antes da aplicação do fungicida clorotalonil e do manejo do solo com biochar. A – 0 dia; B – 5 dias; C – 10 dias; D – 15 dias. Onde, SN – solo natural; D1 – 10⁻¹; D3 – 10⁻³ e D – 10⁻⁶

A partir dos índices de riqueza (R), dominância (D) e índice de diversidade de Shannon (H) foi evidenciada a relação das alterações promovidas no SN pela esterilização, diluição e reintrodução da comunidade bacteriana do solo. O SN apresentou maior diversidade que as diluições D1 e D3, que por sua vez foram superiores a D6 (Tabela 3). De forma geral, quanto o maior fator de diluição menor índice de diversidade. Esta relação também foi observada no estudo de CRAVO-LAUREAU et al. (2011), uma vez que a diluição promove a remoção da diversidade, e interfere na riqueza e na dominância de grupos microbianos no solo.

Tabela 3 – Índices de riqueza (número de bandas), de dominância e de diversidade (Shannon) calculados a partir do perfil de bandas obtidos por meio do DGGE (médias de três repetições), referentes ao acompanhamento da comunidade bacteriana do solo submetida a ‘diluição para extinção’, nos períodos de tempo de 0, 5, 10 e 15 dias após a diluição

Tempo (d)	Tratamentos	Riqueza	Dominância (D)	Shannon (H)
0	SN	49,667	0,026	3,750
	D 1	32,333	0,036	3,386
	D 3	34,333	0,036	3,407
	D 6	20,333	0,056	2,952
5	SN	36,333	0,034	3,466
	D 1	17,333	0,063	2,809
	D 3	20,667	0,062	2,885
	D 6	18,667	0,064	2,841
10	SN	30,667	0,038	3,341
	D 1	23,000	0,049	3,072
	D 3	16,667	0,066	2,759
	D 6	14,000	0,084	2,546
15	SN	31,333	0,036	3,378
	D 1	28,667	0,039	3,301
	D 3	27,000	0,043	3,212
	D 6	16,667	0,070	2,722

SN = solo natural; D1 = 10^{-1} ; D3 = 10^{-3} e D = 10^{-6}

Nesse contexto, a abordagem da ‘diluição para extinção’ permitiu a obtenção de um gradiente da comunidade microbiana original do solo (diferentes níveis), o qual foi testado quanto à capacidade para degradação do clorotalonil no solo. A maioria dos estudos dentro desta abordagem tem se limitado aos serviços ecossistêmicos mais gerais, os quais possuem alta redundância funcional, de modo que um grande número de espécies pode exercer a mesma função. Este princípio não se aplica a funções mais específicas, como a degradação de moléculas xenobióticas, onde a capacidade de realizar tais funções é atribuída a grupos microbianos mais restritos (YACHI e LOREAU, 1999; HERMANDEZ-RAQUET et al., 2013).

5.1.2 Perfil da comunidade bacteriana do solo

A aplicação de biochar e clorotalonil promoveu ordenação complexa da comunidade microbiana do solo nos diferentes períodos (Figura 3). No tempo inicial ($t = 0$ dia), a formação de 4 agrupamentos distintos ($R_{\text{Bray Curtis}} = 0,8741$, $p < 0,0001$) (Anexo B) só pode ser atribuída ao efeito da diluição na diversidade microbiana do solo, tratado ou não (Figura 3 A). No período de 21 dias, houve maior dispersão entre os grupos bacterianos, embora os agrupamentos “g1” (SN CB e SN SB), quando comparado aos agrupamentos “g2” (D1 CB e D1 SB), “g3” (D3 CB e D3 SB) e “g4” (D6 CB e D6 SB), tenham sido bastante similares (Figura 3 B e Anexo B). Já o agrupamento “g2” exibiu separação com sobreposição aos demais agrupamentos ($R_{\text{Brays Curtis}} = 0,58$, $p < 0,0001$) (Anexo B). Neste período (21 dias), de forma geral, os grupos bacterianos não sofreram segregação significativa na presença do biochar, exceto para o SN que apresentou leve distanciamento entre os grupos com e sem biochar (Figura 3B). Após 42 dias, o perfil da comunidade mostrou maior dispersão entre os grupos bacterianos presentes nas amostras com biochar (SN CB, D1 CB, D3 CB e D6 CB) (Figura 3 C). Já as amostras sem biochar apresentaram menor dispersão e, portanto, maior proximidade entre os grupos (D1 SB, D3 SB e D6 SB).

O SN, em todos os tratamentos, apresentou maiores índices de diversidade de Shannon-Weiner (H), evidenciando a maior capacidade de resiliência da sua comunidade. A diluição D1 apresentou índices H próximos aos encontrados no SN, diferindo quanto ao número de bandas (riqueza) e a dominância (D) (Tabela 4). Já o número de bandas de DNA bacteriano sofreu pouca variação ao longo do período de incubação. Inicialmente, não foi observada influência do biochar e nem do pesticida, pois a coleta das amostras foi realizada logo após a aplicação. No período intermediário (21 d), o número de bandas do perfil da comunidade bacteriana do solo com biochar aumentou para D1, D3 e D6. A recuperação da diversidade foi mais rápida para D1, que apresentou maior índice de diversidade de Shannon e, conseqüentemente, menor dominância dos grupos (Tabela 4). SUN et al. (2012) e GOMEZ et al. (2014) também relataram mudanças na estrutura da comunidade microbiana do solo manejado com biochar, sendo que em ambos os trabalhos houve a predominância da comunidade bacteriana sobre a fúngica. Portanto, a proporção de bactérias em relação à de fungos aumenta na presença do biochar, o que

normalmente é atribuído ao seu pH alcalino, o que pode favorecer o desenvolvimento de bactérias gram-negativas. No entanto, com o envelhecimento do biochar, ocorre a perda de grupos funcionais superficiais, liberando H^+ para a solução do solo, com subsequente decréscimo no valor de pH, o que favorece o crescimento da população de fungos (SANTOS et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2012). Além disso, o biochar promove alteração da comunidade microbiana através do efeito da “charosfera” (em analogia a rizosfera), o qual reflete à sua capacidade de reter compostos de baixo peso molecular, nutrientes, ar, água, além da própria fração volátil do biochar, o que possibilita o surgimento de novos nichos de colonização microbiana tanto na superfície quanto no interior do biocarvão (QUILLIAM et al., 2013).

Outro fator que pode ter contribuído para a alteração da comunidade bacteriana seria a biodisponibilidade do pesticida na solução do solo, a qual tem impacto direto na eficácia agrônômica, no destino e no impacto ambiental do mesmo. Portanto, a menor biodisponibilidade do clorotalonil na presença do biochar pode ter contribuído para a modulação da comunidade microbiana dentro de cada nível de diluição. Contudo, o clorotalonil e outros dois fungicidas não promoveram alteração significativa na comunidade bacteriana do solo (BENDING et al. 2007). Já a azoxistrobina afetou negativamente a atividade da desidrogenase e a comunidade fúngica no solo sem adição de biochar, sendo menor o impacto no solo com biochar, apesar deste não ter apresentado nenhum efeito sobre a sorção ou degradação do fungicida (SOPEÑA e BENDING, 2013). Esse resultado mostra o efeito positivo da aplicação do biochar sobre a comunidade microbiana exposta aos pesticidas, uma vez que sua presença mitiga os seus efeitos tóxicos sobre os microrganismos.

Paralelamente, verificou-se que houve aumento no número de bandas (riqueza) e no índice de Shannon-Weiner ao longo do período de incubação (42 dias). SUN et al. (2013) observaram que o índice de Shannon-Weiner (H) do perfil de bandas do DGGE da comunidade bacteriana foi cerca de três vezes maior no solo adicionado de biochar do que no solo sem biochar, após 96 dias de incubação em potes. HU et al. (2014) também verificaram aumento substancial na diversidade microbiana do solo manejado com biochar. Estes achados corroboram com a maior diversidade microbiana detectada nos Antrossolos de Amazônia (Terra Preta de Índio) quando comparados aos solos adjacentes (GUL et al., 2015).

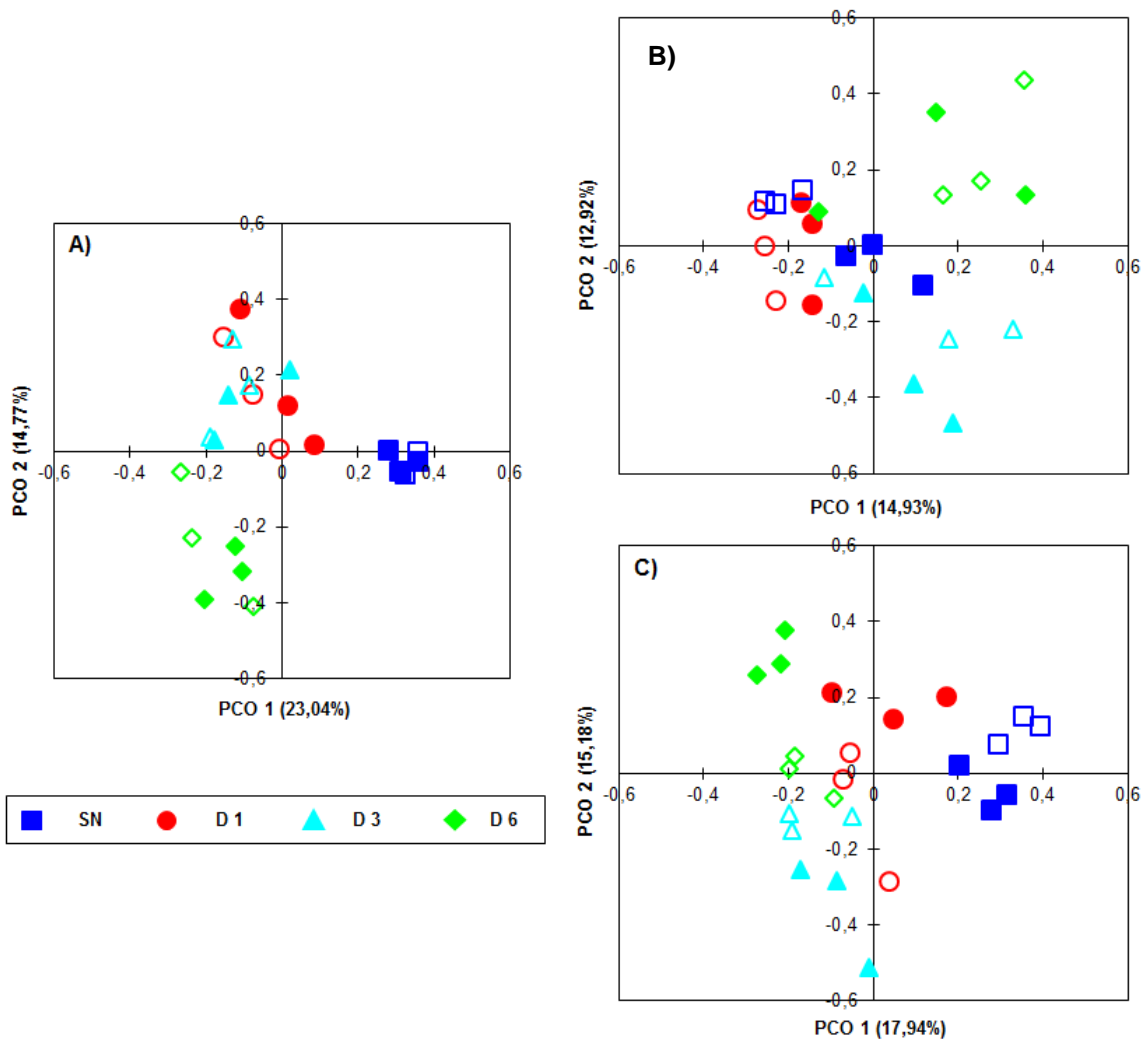


Figura 3 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de bandas do gene 16S rDNA dos níveis de diluição da comunidade bacteriana do solo após da aplicação do fungicida clorotalonil em solo com e sem manejo com biochar. A – 0 dia; B – 21 dias; C – 42 dias; símbolos preenchidos – com biochar; símbolos vazados – sem biochar; SN – solo natural, D1 – 10^{-1} ; D3 – 10^{-3} e D 6 – 10^{-6}

Tabela 4 – Índices de riqueza (número de bandas), de dominância e de diversidade (Shannon) calculados a partir do perfil de bandas obtidos por meio do DGGE (médias de três repetições), referentes ao perfil da comunidade bacteriana do solo submetida ao manejo do solo com biochar e a aplicação do clorotalonil nos períodos de tempo de 0, 21 e 15 dias pós-manejo do solo

Tempo (d)	Tratamentos	Riqueza	Dominância (D)	Shannon-Weiner (H)
0	SN CB	50,333	0,023	3,833
	SN SB	48,000	0,024	3,793
	D1 CB	24,000	0,053	3,052
	D1 SB	22,000	0,053	3,018
	D3 CB	27,667	0,046	3,195
	D3 SB	18,333	0,067	2,805
	D6 CB	16,000	0,068	2,726
	D6 SB	10,667	0,111	2,294
21	SN CB	45,333	0,027	3,692
	SN SB	49,667	0,024	3,793
	D1 CB	51,667	0,023	3,838
	D1 SB	50,667	0,022	3,850
	D3 CB	38,333	0,031	3,518
	D3 SB	35,000	0,033	3,458
	D6 CB	38,000	0,031	3,542
	D6 SB	42,000	0,030	3,578
42	SN CB	72,000	0,015	4,220
	SN SB	71,333	0,016	4,203
	D1 CB	63,667	0,018	4,087
	D1 SB	50,667	0,022	3,850
	D3 CB	38,333	0,031	3,518
	D3 SB	35,000	0,033	3,458
	D6 CB	38,000	0,031	3,542
	D6 SB	53,333	0,022	3,894

SN – solo natural; D1 – 10^{-1} ; D3 – 10^{-3} e D – 10^{-6}

5.1.3 Quantificação do gene 16S rDNA

As reações de PCR para quantificação do gene 16S rDNA apresentaram eficiência de 96,3 ($R^2 = 0,9905$), o qual foi utilizado para a construção da curva padrão de amplificação. O número de cópias do gene 16S rDNA por grama de solo não apresentou grandes variações dentro dos tratamentos, bem como ao longo do tempo de incubação ($\text{Log}_{10} = 5,5$ a $7,7$) (Figura 4). No período inicial (0 dia),

aparentemente, o SN e a D6 CB apresentaram o menor número de cópias do gene 16S, embora tenha ocorrido ligeira recuperação ao longo do tempo de exposição ao biochar e ao pesticida ($\text{Log}_{10} = 5,5$ a $7,4$). No entanto, devido aos elevados valores do desvio padrão nesses tratamentos, esse menor número pode ter ocorrido meramente ao acaso, ou seja, devidos a erros no processo de determinação. O fato de esta diferenciação ter ocorrido no período inicial sugere que os efeitos das perturbações ambientais foram mínimos. Por outro lado, a abundância desse gene nos tratamentos D1, D3 e D6 SB não sofreu alteração ao longo do tempo ($\text{Log}_{10} = 6,3$ a $7,1$ e $7,1$ a $7,7$, respectivamente) (Figura 4).

Além disso, nos períodos de 21 e 42 dias, ocorreu leve recuperação do número de cópias do gene 16S no SN e D6 CB, provavelmente em resposta à perturbação provocada pela aplicação do clorotalonil e do biochar ao solo. Não podemos esquecer que a resposta da comunidade microbiana às perturbações ambientais é dada por duas possíveis relações: 1) 'extinção', em que a diversidade está negativamente correlacionada com o aumento do nível de perturbação; 2) 'exclusão competitiva', na qual o efeito do estresse ambiental promove a remoção de grupos microbianos mais abundantes, o que possibilita a ocupação dos nichos pelos grupos microbianos menos abundantes (GILLER et al 1998).

HOWELL et al. (2014), em estudo recente, verificaram que a comunidade bacteriana não sofreu alteração significativa em sua abundância quando exposta ao fungicida azoxistrobina ($p = 0,622$). Em média, o número de cópias do gene 16S rDNA por grama de solo foi de $3,15 \times 10^6$ para controle e de $2,28$ a $3,78 \times 10^6$ para as amostras tratadas com a azoxistrobina. Neste trabalho, o número de cópias do gene 16S rDNA variou de $2,07 \times 10^6$ a $6,74 \times 10^7$ nos diversos tratamentos (Figura 4).

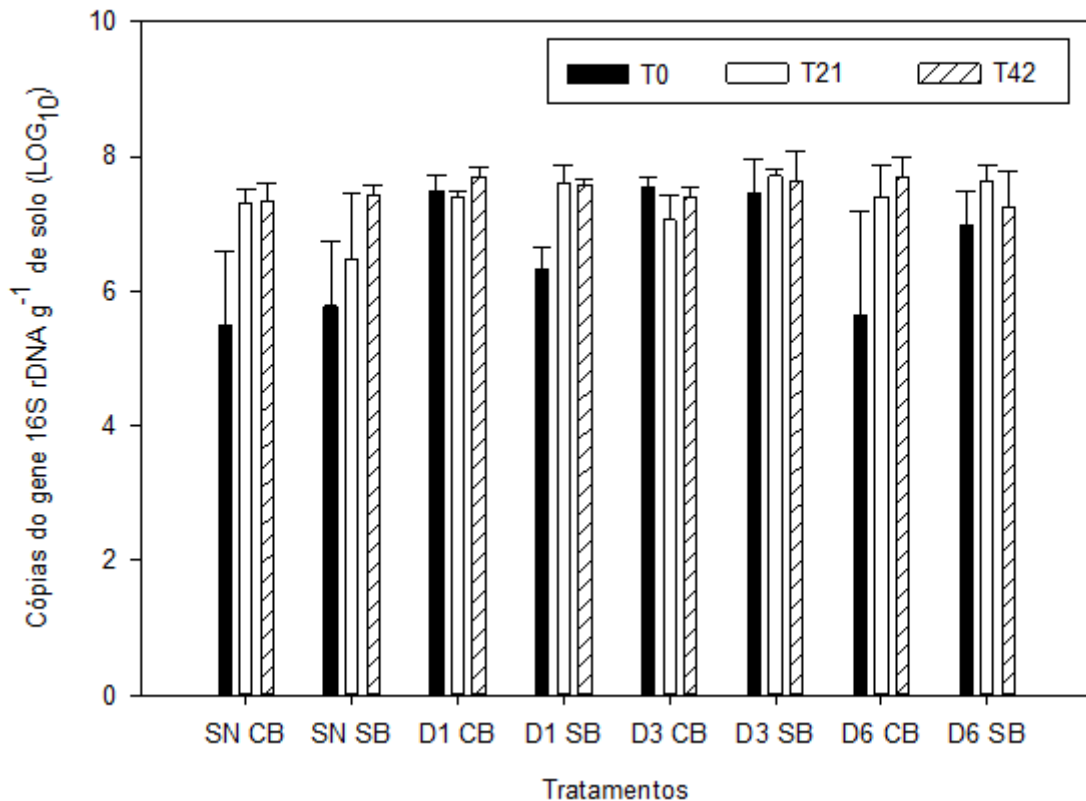


Figura 4 – Número de cópias do gene 16S rDNA por grama de solo sobre diferentes tempos de incubação. SN CB – Solo natural com biochar; SN SB – Solo natural sem biochar; D1 CB – 10^{-1} com biochar; D1 SB – 10^{-1} Sem biochar; D3 CB – 10^{-3} com biochar; D3 SB – 10^{-3} Sem biochar; D6 CB – 10^{-6} com biochar; D6 SB – 10^{-6} sem biochar. T0 – 0 dias; T21 – 21 dias; T42 – 42 dias

5.2 Dissipação do clorotalonil

De forma geral, o CHT apresentou baixa taxa de mineralização (< 11,0% da quantidade aplicada), pelo menos em parte devido ao seu elevado potencial de sorção ($K_d^{ap} = 17,3 - 34,5 \text{ L kg}^{-1}$), o que traduz sua baixa disponibilidade na solução do solo (Tabela 5). A biodisponibilidade é um dos principais fatores que interfere no impacto de pesticidas sobre a microbiota do solo, uma vez que é controlada pelos processos de sorção/dessorção e, portanto, tem peso direto na sua concentração, bioatividade e biodegradabilidade (HUSSIAN et al., 2009). Paralelamente, a diluição da comunidade microbiana original do solo promoveu considerável redução na sua taxa de mineralização quando comparada ao SN (Figura 5). Após 42 dias de incubação, a mineralização do CHT foi bastante baixa (desprendimento de $^{14}\text{C-CO}_2$ < 0,59% da quantidade aplicada) (Figura 5), não havendo diferenças entre os três

fatores de diluição, tanto na presença como na ausência do biochar. Já no SN, 3,57 e 11,01 % da quantidade aplicada de CHT foram mineralizados nos tratamentos com e sem biochar, respectivamente. Isto provavelmente deveu-se em parte à maior diversidade da comunidade bacteriana presente no SN. Apesar da D1 ter apresentado diversidade mais próxima ao SN, isto não refletiu em aumento da mineralização do produto em relação às outras diluições (D3 e D6).

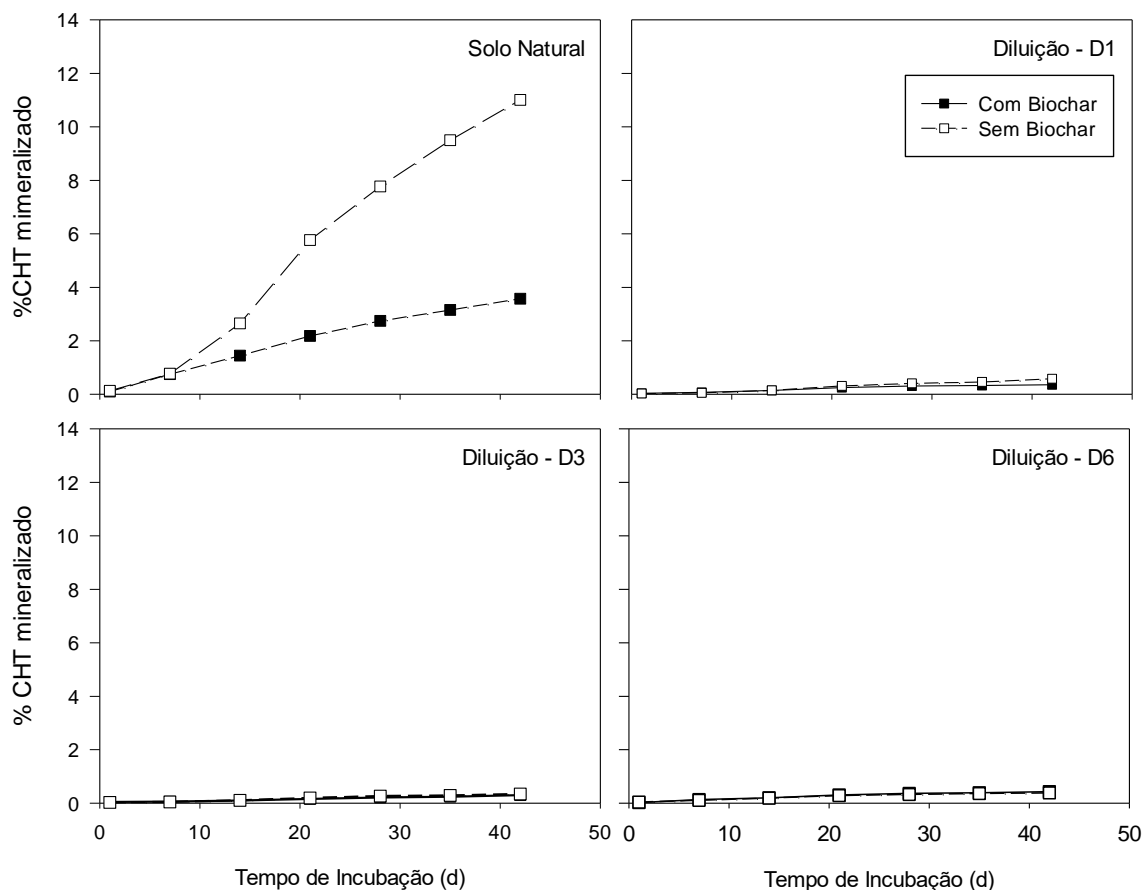


Figura 5 – Taxa de mineralização do fungicida clorotalonil no solo manejado com biochar sob diferentes níveis de diversidade microbiana. Solo Natural (controle); diluição D1 – 10^{-1} ; diluição D3 – 10^{-3} ; diluição D6 – 10^{-6}

No entanto, os índices de diversidade da comunidade bacteriana no SN com e sem biochar foram praticamente iguais. Portanto, a menor mineralização na presença do biochar provavelmente deveu-se ao maior potencial de sorção e, subsequentemente, menor disponibilidade do CHT na presença do biochar. O estudo de sorção mostrou que 87 % do CHT aplicado foi sorvido na presença do biochar, enquanto que 76 % foi sorvido na sua ausência (Tabela 5). Paralelamente, após 1 dia de incubação em condições mais realísticas, apenas 4,7 e 9,6 % da

quantidade aplicada foram extraídos com CaCl_2 $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ do SN com e sem biochar, respectivamente. Essas porcentagens estão muito próximas aos valores mineralizados nestes tratamentos. Após 7 dias de incubação, diferentemente do esperado, esses valores aumentaram para 6,9 e 16,2 %, respectivamente. Provavelmente, isto se deveu à rápida degradação do CHT e subsequente formação de pelo menos um metabólito mais solúvel em meio aquoso. Outros estudos já haviam mostrado a capacidade do biochar em aumentar a retenção de pesticidas no solo, diminuindo assim sua biodisponibilidade e seus efeitos deletérios no ambiente (CAO et al., 2009; SPOKAS et al., 2009; WANG et al., 2010; MARTIN et al., 2012; DECHENE et al., 2014).

Tabela 5 – Sorção e coeficiente de sorção aparente do fungicida clorotalonil no solo sem manejo e com manejo de biochar, valores das médias obtidos de duas repetições

Tratamento	S (%)	K_d^{ap} (L kg⁻¹)
Controle	76,4	17,3
BC fino	86,6	34,5
BC 2mm	82,3	24,8
BC inteiro	84,6	29,3

S – Percentual sorvido; K_d^{ap} – Coeficiente de sorção aparente; controle – solo sem biochar; BC fino – solo com biochar fino (< 2,0 mm); BC 2 mm – solo com biochar 2mm; CB inteiro – solo com biochar inteiro.

HERMANDEZ-RAQUET et al. (2013), também utilizando a abordagem da diluição para extinção, verificaram forte impacto da perda de diversidade na comunidade microbiana de um lodo ativado sobre a mineralização do fenantreno. Esses autores observaram que a comunidade microbiana perdeu parcialmente a capacidade de mineralizar o fenantreno a partir da diluição a 10^{-3} , enquanto as comunidades derivadas de fatores de diluição mais altos (10^{-5} e 10^{-8}) não foram capazes de mineralizá-lo. No presente trabalho, não houve perda da capacidade de mineralização do CHT ao longo dos fatores de diluição (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}), mas as taxas foram extremamente baixas e similares em todas as diluições. Além disso, a baixa taxa de mineralização do CHT na D1, a qual tem diversidade bastante próxima do SN, sugere que a mínima alteração na diversidade microbiana do SN é capaz de

afetar a taxa de mineralização deste fungicida. Contrariamente, HERMANDEZ-RAQUET et al. (2013) mostraram que a comunidade de um lodo de esgoto na mesma diluição (10^{-1}) foi capaz de mineralizar 100% do fenantreno após 25 d de incubação.

O CHT apresentou rápida taxa de dissipação em todos os tratamentos, sendo que ele representava apenas ~62% da sua quantidade aplicada no tempo zero (extraído imediatamente após a aplicação), em todos os tratamentos (Figura 6). REGITANO et al. (2001) também observaram rápida taxa de dissipação do CHT nos três solos brasileiros (DT_{50} = 0,4 a 13 dias). Outros valores de DT_{50} (4 a 90 dias) têm sido relatados na literatura (US EPA, 1999). Neste mesmo período (0 dia), houve a formação de três metabólitos não identificados, os quais inicialmente representavam 9-16 % da quantidade aplicada, mas tiveram suas concentrações consideravelmente diminuídas ao longo do período de incubação (42 d) (Figura 7). Isto sugere que a principal rota de degradação do CHT seja química devido à instantaneidade da reação e o emprego de um extrator tóxico (acetona) à população microbiana do solo. Isto pode ser corroborado pelo fato de que as curvas de dissipação do CHT (Figura 6) e de seus metabólitos (Figura 7) seguiram a mesma tendência independente do fator de diluição, ou seja, da diversidade microbiana do solo. Neste sentido, pode-se observar que os valores de meia-vida (DT_{50}) foram < 1 dia para todos os tratamentos (Figura 6). No solo sem biochar, os valores de DT_{90} foram iguais a 10, 13, 19 e 20 d no SN, D1, D3 e D6, respectivamente. Os valores de DT_{90} para os tratamentos com biochar não puderam ser estimados (Figura 6). Aqui convém salientar que diferentemente do esperado pelo estudo de sorção, a acetona é capaz de extrair mais CHT do solo com biochar, provavelmente por ser capaz de dilatar todo o material orgânico do solo (matéria orgânica do solo e o próprio biochar), favorecendo o processo de dessorção.

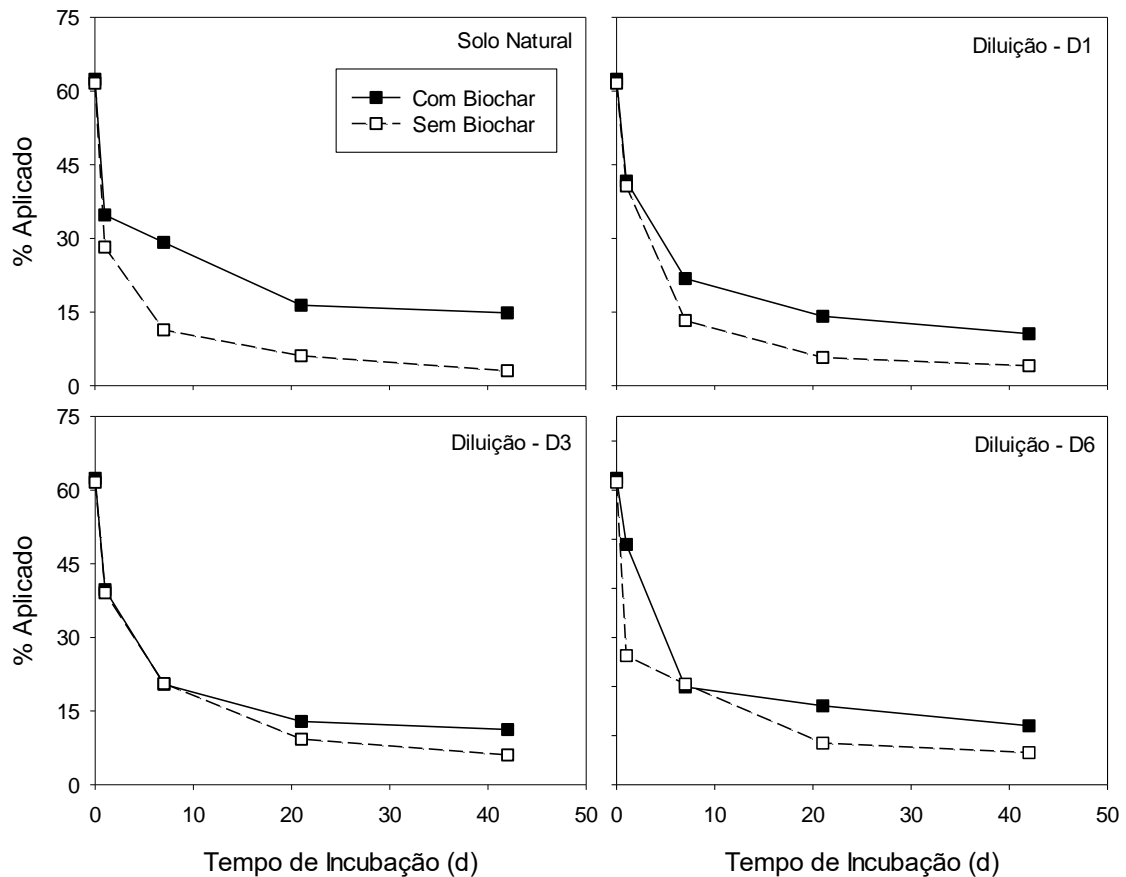


Figura 6 – Degradação do clorotalonil no solo manejado e não-manejado com biochar sob diferentes níveis da diversidade microbiana. Solo natural – controle; Diluição D1 – 10⁻¹; Diluição D3 – 10⁻³; Diluição D6 – 10⁻⁶

CHAVES et al. (2007) também verificaram que 44% do CHT aplicado foi dissipado nas primeiras horas após a aplicação em um solo cultivado com banana. Após aplicação e extração sequencial, verificou-se que ~48% do CHT aplicado foi dissipado e que era baixa a formação de resíduos ligados (< 3 % do total), corroborando com o fato de que sua degradação seja química. No entanto, produtos oriundos de sua degradação (metabólitos) são mais tóxicos que a molécula parental (menor DL₅₀) e são mais suscetíveis à lixiviação, o que agrava os problemas ambientais com esse pesticida (KATAYAMA et al., 1991; CAUX, 1996). Por exemplo, o hidroxiclortalonil, que além de elevada toxicidade aos organismos aquáticos, também possui ação antibiótica, inibindo dessa forma a sua degradação microbiana. Portanto, aplicações sucessivas do CHT tendem a reduzir sua taxa de degradação no solo (MOTONAGA et al., 1996).

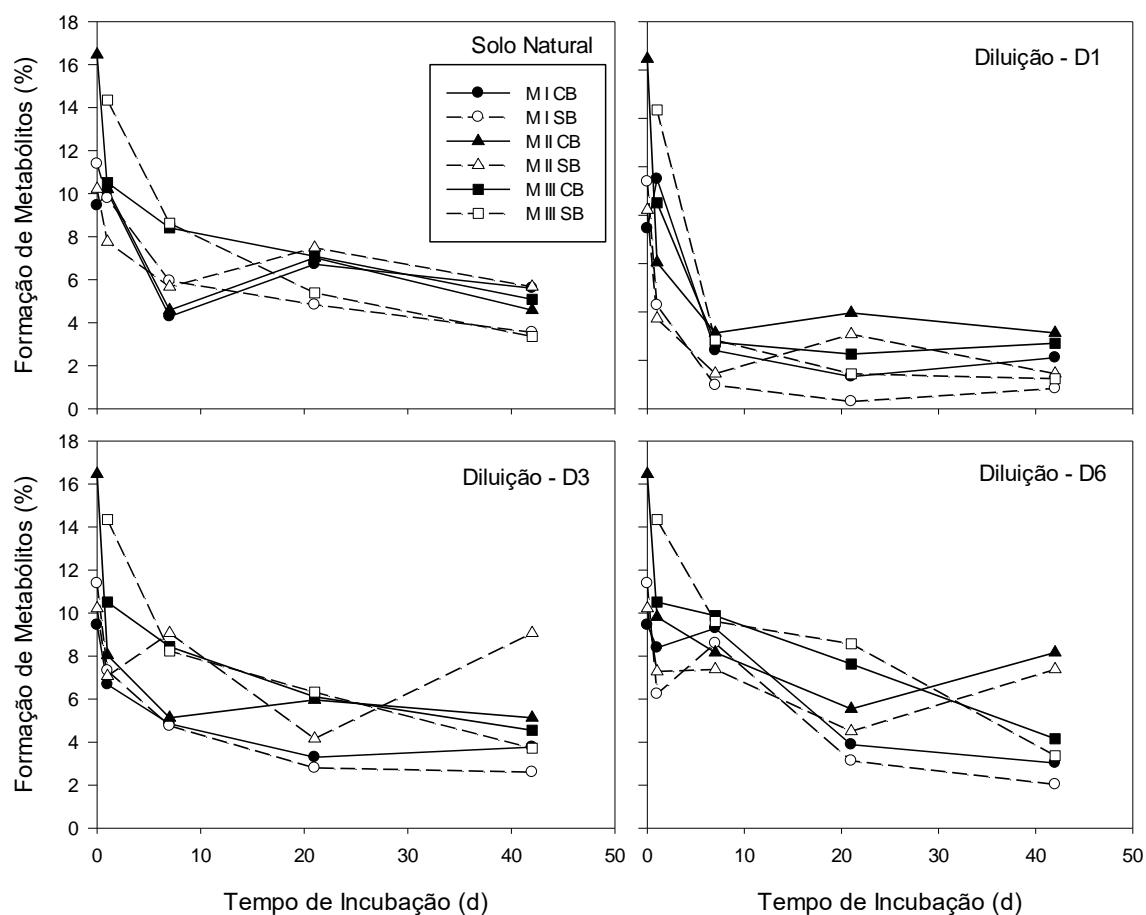


Figura 7 – Formação de metabólitos a partir do fungicida clorotalonil no solo manejado e não-manejado com biochar sob diferentes níveis da diversidade microbiana. Solo natural – controle; Diluição D1 – 10^{-1} ; Diluição D3 – 10^{-3} ; Diluição D6 – 10^{-6} . M I – metabólito 1 ($R_f = 0,2$); M II – metabólito 2 ($R_f = 0,4$); M III – metabólito 3 ($R_f = 0,6$). CB – Com biochar; SB – Sem biochar

Além da degradação química do CHT, outra rota importante de dissipação seria a formação de ^{14}C -resíduos não extraíveis (antigamente denominados de resíduos ligados). Esta fração corresponde a mais que 50% da quantidade aplicada 7 dias após o início dos tratamentos (diluições e aplicação do biochar) (Figura 8). O alto potencial de sorção do CHT sugere a importância da formação desta fração na sua dissipação. REGITANO et al. (2001) já haviam observado que a formação de resíduos não extraíveis (resíduos ligados) consiste em uma das principais rotas de dissipação do CHT no solo. Os autores reportaram relação positiva entre o conteúdo de matéria orgânica do solo (MOS) e o aumento na sorção e da fração de resíduos ligados desse fungicida, o que está de acordo com os resultados de PATAKIOUTAS e ALBANIS (2002). A forte interação do CHT com a MOS reflete seu alto potencial

de sorção e sua baixa mobilidade na matriz do solo (VAN SCOY e TJEERDEMA, 2014). O fato da recuperação da radioatividade aqui aplicada ter variado de 88 a 99% para todos os tratamentos ratificam a confiabilidade de nossos resultados.

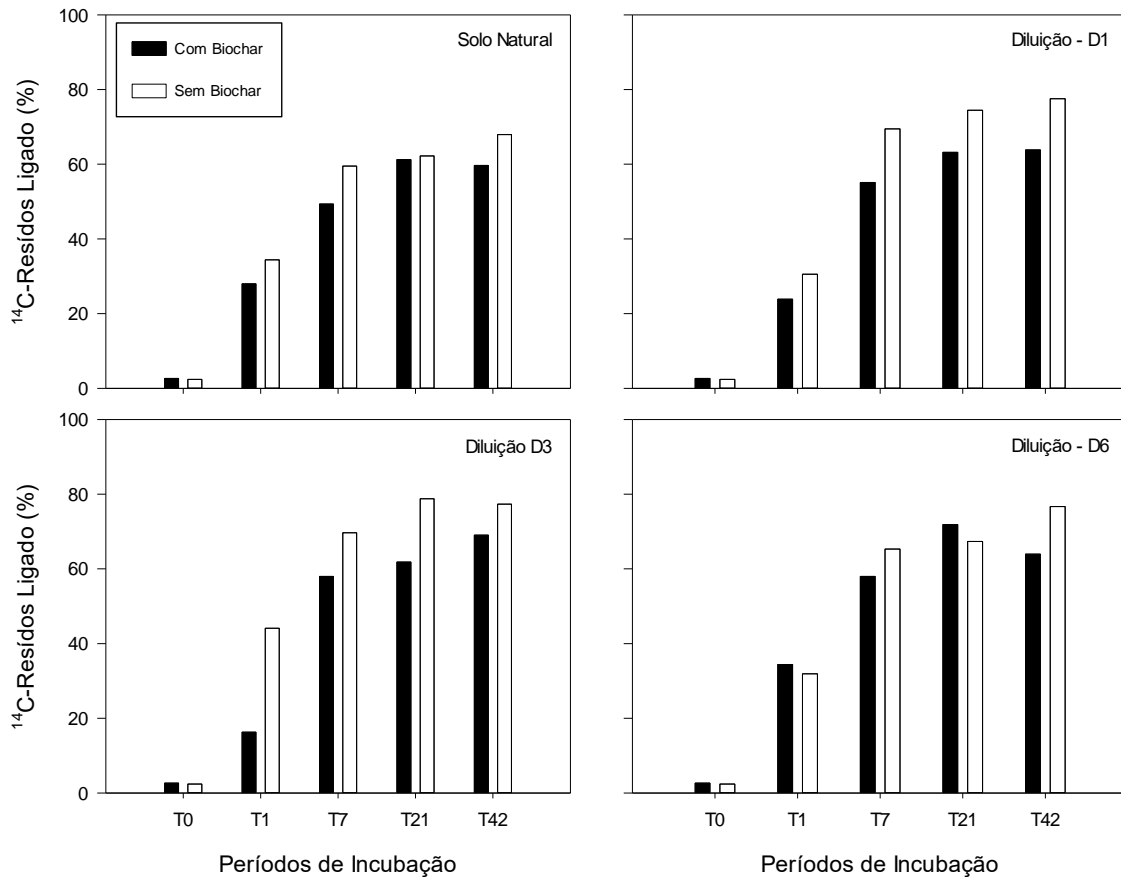


Figura 8 – Taxa formação de ¹⁴C-resíduos não extraíveis no solo manejado com e se sem biochar sob diferentes níveis de diversidade microbiana do solo. T0 – pré-teste; T1 – 1 dia; T2 – 7 dias; T3 – 21 dias; T4 – 42 dias. Solo natural – controle; Diluição D1 – 10⁻¹; Diluição D3 – 10⁻³; Diluição D6 – 10⁻⁶

7 CONCLUSÕES

- A comunidade bacteriana foi pouco afetada pela presença do biochar e do CHT;
- Diluição da comunidade microbiana se mostrou um forte modulador da comunidade bacteriana;
- Foi detectado forte impacto da remoção da diversidade microbiana sobre a mineralização do clorotalonil;
- Para todos os fatores de diluição da diversidade microbiana a taxa de mineralização foi similar;
- Para o clorotalonil a remoção da diversidade microbiana em todos os fatores afetou a taxa mineração;
- O solo natural (controle) não-manejado com biochar apresentou maior taxa de mineralização que o solo manejado;
- A taxa de mineralização do clorotalonil apresentou-se de forma geral baixa em todos os tratamentos;
- O biochar aumentou a taxa de sorção do fungicida e diminui a sua disponibilidade na solução;
- Foram detectados três produtos da transformação (metabólitos) a partir da degradação do CHT;
- O CHT apresentou rápida taxa de dissipação independentemente do nível de diluição aplicado;

Alterações na diversidade da comunidade microbiana do solo podem comprometer funções mais restritas do ecossistema, tais como a degradação de pesticidas e outros xenobióticos. Ainda que a microbiota do solo possua uma vasta diversidade genética e uma alta capacidade metabólica, a degradação de substâncias sintéticas, tais como os pesticidas é dificultada pelo fato de que essas substâncias não são de ocorrência natural ambiente. Aliado a isto, os pesticidas atuam em processos biológicos comuns a maioria dos organismos vivos, dessa forma, exercem efeitos adversos na comunidade microbiana, o que pode comprometer outras funções do ecossistema, além da própria degradação do composto xenobiótico. No caso do clorotalonil, não foi observada uma resposta negativa da comunidade bacteriana, já

a remoção da diversidade da comunidade microbiana por diluição reduziu drasticamente a sua mineração, além disso, o manejo de solo com um material adsorvente (biochar) também promoveu redução na degradação microbiana do pesticida, provavelmente devido a menor biodisponibilidade do pesticida.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Consulta de ingrediente ativo: clorotalonil. 2015. Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons >. Acesso em: 20 nov.2015.
- AHMAD, M.; RAJAPAKSHA, A.U.; LIM, J.E.; ZHANG, M.; BOLAN, N.; MOHAN, D.; VITHANAGE, M.; LEE, S.S.; OK, Y.S. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. **Chemosphere**, Oxford, v. 99, p. 19-33, 2014.
- ALVES FILHO, J.P. **Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188p.
- AMELOOT, N.; DE NEVE, S.; JEGAJEEVAGAN, K.; YILDIZ, G.; BUCHAN, D.; FUNKUIN, Y.N.; PRINS, W.; BOUCKAERT, L.; SLEUTEL, S. Short-term CO₂ and N₂O emissions and microbial properties of biochar amended sandy loam soils. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v. 57, p. 401-410, 2013
- ANDRÉA, M.M. **Formação e bioliberação de resíduos-ligados de [14C]-lindano e [14C]-paration em dois solos brasileiros**. 2002. 130p. (Tese de Doutorado na área de Tecnologia Nuclear Básica) - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.I.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 61-72, 2007.
- BALLEE, D.L.; DUANE, W.C.; STALLORD, D.E.; WOLFE, A.L. Chlorothalonil. In: ZWEIG, G.; SHERMA, J. (Ed.). **Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators**, New York: Academic Press, 1976. p.263-274.
- BARRIOS, E. Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 269-285, 2007.
- BELL, T.H.; NEWMAN, J.A.; SILVERMAN, B.W.; TURNER, S.L.; LILLEY, A.K. The contribution of species richness and composition to bacterial services. **Nature Letters**, London, v. 436, p. 1157-1160, 2005.
- BENDING, G.D.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.S.; LINCOLN, S.D. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. **Chemosphere**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 82-88, 2007.
- BENEVIDES, J.A.J.; MARINHO, G.M. Degradação de pesticidas por fungos: uma revisão. **Holos**, Natal, v. 2, p. 110-129, 2015.
- BOLLAG, J.M.; LIU, S.Y. Biological transformation processes of pesticides. In: CHENG, H.H.; BAILEY, G.W.; GREEN, R.E.; SPENCER, W.F. (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling**. Madison: SSSA, 1990. p.169-212.
- BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, n. 2, p. 418-426, 2001.
- BRENNAN, A.; MORENO-JIMÉNEZ, E.; ALBURQUERQUE, J.A.; KNAPP, C.W.; SWITZER, C. Effects of biochar and activated carbon amendment on maize growth and the uptake and measured availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and potentially toxic elements (PTEs). **Environmental Pollution**, Barking, v. 193, p. 79-87, 2014.
- BREWER, C.E.; BROWN, R.C. Biochar. In: SAYIGH, A. (Ed.). **Comprehensive Renewable Energy**. Oxford: Elsevier, 2012. p.357-384.

BURNS, R.G.; DeFOREST, J.L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R.L.; STROMBERGER, M.E.; WALLENSTEIN, M.D.; WEINTRAUB, M.N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 58, p. 216-234, 2013.

CAO, X.; MA, L.; GAO, B.; HARRIS, W. Dairy-Manure Derived Biochar Effectively Sorbs Lead and Atrazine. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 3285-3291, 2009.

CARDINALE, B.J.; PALMER, M.A.; COLLINS, S.L. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. **Nature**, London, v. 415, n. 6870, p. 426-429, 2002.

CARNEIRO, F.F.; AUGUSTO, L.G.S; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. **Dossiê ABRASCO**: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624p.

CARRIGER, J.F.; RAND, G.M.; GARDINALI, P.R.; PERRY, W.B.; TOMPKINS, M.S.; FERNANDEZ, A.M. et al. Pesticides of Potential Ecological Concern in Sediment from South Florida Canals: An Ecological Risk Prioritization for Aquatic Arthropods. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, London, v. 15, n. 1, p. 21-45, 2006.

CASSAL, V.B.; AZEVEDO, L.F.; FERREIRA, R.P.; SILVA, D.G.; SIMÃO, R.S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 437-445.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático, **Química Nova**, São Paulo, v. 34, p. 1021-1031, 2011.

CAUX, P.Y., KENT, R.A.; FAN, G.T.; STEPHENSON, G.L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a Canadian perspective. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. London, v. 26, p. 45-93, 1996.

CERNANSKY, R. Agriculture: State-of-art soil - A charcoal-rich product called biochar could boost agricultural yields and control pollution. Scientists are putting the trendy substance to the test. . **Nature**, London, v. 517, n. 7534, p. 258-260, 2015.

CHAN, K.Y.; VAN ZWIETEN, L.; MESZAROS, I.; DOWNIE, A.; JOSEPH, S. Using poultry litter biochars as soil amendments. **Soil Research**, Austrália, v. 46, n. 5, p. 437-444, 2008.

CHAVES, A.; SHEA, D.; COPE, W. G. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rican banana plantation. **Chemosphere**, Oxford, v. 69, n. 7, p. 1166-1174, 2007.

CHOPPALA, G.K.; BOLAN, N.S.; MEGHARAJ, M.; CHEN, Z.; NAIDU, R. The Influence of Biochar and Black Carbon on Reduction and Bioavailability of Chromate in Soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 41, n. 4; p. 1175-1184, 2012.

CHUN, Y.; SHENG, G. CHIOU, C.T.; XING, B. Compositions and Sorptive Properties of Crop Residue-Derived Chars. **Environmental Science and Technology**, Washington: American Chemical Society. V. 38, p. 4649-4655, 2004.

COLLA, L.R.; LIMA, M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 809-813, 2008.

CONZ, R.F. **Caracterização de matérias-primas e biochars para aplicação na agricultura**. 2015. 132p.. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 15, p. 65-72, 2005.

CRAVO-LAUREAU, C.; HERNANDEZ-RAQUET, G.; VITTE, I.; JEZEQUEL, R.; BELLET, V.; GODON, J.-J.; CAUMETTE, P.; BALAGUER, P.; DURAN, R. Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 9, p. 888-895, 2011.

CRUZ, G.V. **O quadro da contaminação de frutas, legumes e verduras (FLVs) com resíduos de agrotóxicos no Brasil e as oportunidades emergentes**. 2014. 135p. (Dissertação de Mestrado em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DAVIES, P.E. Disappearance rates of chlorothalonil (TCIN) in the aquatic environment. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer, v. 40, n. 3, p. 405-409, 1988.

DECHENE, A.; ROSENDAHL, I. LAABS, V.; AMELUNG, W. Sorption of polar herbicides and herbicide metabolites by biochar-amended soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 109, n. 0, p. 180-186, 2014.

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

DENG, S.; CHEN, Y.; WANG, D.; SHI, T.; WU, X.; MA, X.; LI, X.; HUA, R.; TANG, X.; LI, Q.X. Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 297, p. 17-24, 2015.

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

DRAPER, A.; CULLINAN, P.; CAMPBELL, C.; JONES, M.; TAYLOR, A.N. Occupational asthma from fungicides fluazinam and chlorothalonil. **Occupational and Environmental Medicine**, London, v. 60, p. 76-77, 2003.

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

FAY, E.F.; SILVA, C.M.M.S. Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. In: FAY, E. F. e SILVA, C. M. M. S. (Ed.). **Agrotóxico e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap. 3, p.107-143.

FAY, E.F.; SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F. Degradação do fungicida clorotalonil por *Arthrobacter* spp. In: Congreso Virtual Iberoamericano Sobre Gestión de Calidad en Laboratorios, 2., 2003, Valladolid. Resúmenes... Valladolid: ITACYL, 2003.

FERREIRA, J.V.R.; PECKLE, B.A.; SILVA, A.S.; SILVA GOMES, A.; SANTANA, V.M.; DIREITO, I.C.N. Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: Uma revisão da literatura. **Cadernos UniFOA**, Três Poços, n. 24, p. 87-103, 2014.

FLORES, A.V.; RIBEIRO, J.N.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, E.L.R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 111-124, 2004.

FORTES NETOS, P.; FERNANDES, S.A.P.; JAHNEL, M.C. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Ed.). **Microbiologia do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2007. .320p.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 34, p. 36-43, 2005.

GILL, H.K.; GARG, H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Ed.). **Pesticides Toxic Effects**. Rijeka: InTech, 2014. p.187-230.

GEORGE, C.; WAGNER, M.; KÜCKE, M.; RILLIG, M.C. Divergent consequences of hydrochar in the plant–soil system: Arbuscular mycorrhiza, nodulation, plant growth and soil aggregation effects. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 68-72, 2012.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 10–11, p. 1389-1414, 1998.

GOMEZ, J. D.; DENEFF, K.; STEWART, C.E.; ZHENG, J.; COTRUFO, M.F. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. **European Journal of Soil Science**, Malden, v. 65, n. 1, p. 28-39, 2014.

GONÇALVES JR., A. C. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Revista Inclusão Social**, Brasília, v. 6, n.4, p.105-113, 2013.

GUERRA, M.S.; SAMPAIO, D.P.A. **Receituário Agrônomo**. São Paulo: Editora Globo, 1991.

GUL, S.; WINANS, K.S.; LEILA, M.; WHALEN, J.K. Sustaining soil carbon in bioenergy cropping systems of northern temperate regions. **CAB Reviews**, Wallingford, v. 9, n. 026, p. 1-23, 2014.

GUL, S.; WHALEN, J.K.; THOMAS, B.W.; SACHDEVA, V.; DENG, H. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 206, p. 46-59, 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2001. **PAST – Palaeontological statistics**. Disponível em: [www. uv. es/~ pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past. pdf](http://www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf), acessado em: 10/07/2015.

HARTMANN, M.; FREY, B.; MAYER, J.; MADER, P.; WIDMER, F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. **ISME Journal**, New York, v. 9, n. 5, p. 1177-1194, 2015.

HERNANDEZ-RAQUET, G.; DURAND, E.; BRAUN, F.; CRAVO-LAUREAU, C.; GODON, J. Impact of microbial diversity depletion on xenobiotic degradation by sewage-activated sludge. **Environmental Microbiology Reports**, Malden, v. 5, n. 4, p. 588-594, 2013.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HOWELL, C.C.; HILTON, S.; SEMPLE, K.T.; BENDING, G.D. Resistance and resilience responses of a range of soil eukaryote and bacterial taxa to fungicide application. **Chemosphere**, Oxford, v. 112, p. 194-202, 2014.

HUSSAIN, S.; SIDDIQUE, T.; SALEEM, M.; ARSHAD, M.; KHALID, A. Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. In: (Ed.). **Advances in Agronomy**. San Diego: Academic Press, v.102, 2009. p.159-200.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos – Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos. 2014. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> >. Acesso em: 20 nov 2015.

JAAFAR, N.M.; CLODE, P.L.; ABBOTT, L.K. Microscopy Observations of Habitable Space in Biochar for Colonization by Fungal Hyphae From Soil. **Journal of Integrative Agriculture**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 483-490, 2014.

KASEMODEL, M.C.; PORTO, A.L.M.; NITSCHKE, M. Biodegradação bacteriana de compostos organoclorados. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 8, p. 1351-1356, 2014.

KATAYAMA, A.; ISEMURA, H.; KUWATSUKA, S. Population Change and Characteristics of Chlorothalonil-Degrading Bacteria in Soil. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 16, n. 2, p. 239-245, 1991.

KEILUWEIT, M.; NICO, P.S.; JOHNSON, M.G.; KLEBER, M. Dynamic Molecular Structure of Plant Biomass-Derived Black Carbon (Biochar). **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1247-1253, 2010.

KOOKANA, R.S.; SARMAH, A.K.; VAN ZWIETEN, L.; KRULL, E. SINGH, B. Biochar Application to Soil: Agronomic and Environmental Benefits and Unintended Consequences. In: DONALD, L. S. (Ed.). **Advances in Agronomy**. San Diego: Academic Press, v. 112, 2011. p.103-143.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 197-212, 2001.

KUGLER, H. Paraíso dos agrotóxicos. **Revista Ciência Hoje**. Rio de Janeiro, v. 50, p. 20-25, 2012.

KWON, J.W.; ARMBRUST, K.L. Degradation of chlorothalonil in irradiated water/sediment systems. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 10, p. 3651-3657, 2006.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARRETA, C.R.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VITAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.4, 2005. cap. 2, p.43-84.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J.B. Comportamento de pesticidas em solos: fundamentos. In: CURI, N.; MARQUES, J.J.; GUILHERME, L.R.G.; LIMA, J.M.; LOPES, A.S.; VENEGAS, V.H.A. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa - MG: Editora UFV, v.3, 2003. p.335-400.

LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for Environmental management: An Introduction. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation**. London: Taylor & Francis, 2015. p. 1-14.

LOGANATHAN, V.A.; FENG, Y.; SHENG, G.D.; CLEMENT, T.P. Crop-Residue-Derived Char Influences Sorption, Desorption and Bioavailability of Atrazine in Soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, n. 3, p. 967-974, 2009.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa-AS-PTA, 2011. 190p.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J.C.; HENRY, S.; HALLET, S.; MARTIN-LAURENT, F.; CATROUX, G. PHELIPPOT, L. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 399-407, 2004.

LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. Dinâmica de Agrotóxicos no Ambiente. **Programa de Defesa Ambiental Rural**. Ministério do Meio Ambiente: Fórum Nacional de Secretários de Agricultura. Brasília, Textos Orientadores, 2002. 27-44 p.

MAIA, C.M.B.F. **Biochar: uma nova ferramenta no manejo de solos**. II SEMINÁRIO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL, 2., SEMANA DE ESTUDOS FLORESTAIS, 11., Irati: UNICENTRO, 2010. 7p.

MALHOTRA, J.; APARNA, K.; DUA, A.; SANGWAN, N.; TRIMURTULU, N.; RAO, D.L.; LAL, R. Microbial and genetic ecology of tropical Vertisols under intensive chemical farming. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 1, p. 1-17, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: Estatísticas e Dados Básicos de Economia Agrícola. Brasília, DF, 2015. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/Pasta%20de%20Junho%20-%202015.pdf >. Acesso em: 25 ago. 2015.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense**. 2003. 90p. (Dissertação de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá-MT.

MARTIN, S.M.; KOOKANA, R.S.; VAN ZWIETEN, L. KRULL, E. Marked changes in herbicide sorption–desorption upon ageing of biochars in soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 231–232, p. 70-78, 2012.

MARTINS, T.L.; VARGAS, V.M.F. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**. Campinas, v. 8, p. 1-11, 2013.

MCCMAHON, T.A.; HALSTEAD, N.T.; JOHNSON, S.; RAFFEL, T.R.; ROMANSIC, S.; CRUMRINE, P.W.; BOUGHTON, R.K.; MATRIN, L.B.; ROHR, J.R. The fungicide chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. **Environmental Health Perspectives**. North Carolina, v. 119, n. 8, p. 1098-1103, 2011.

MELO, R.F.; BRITO, L.T.L.; PETRERE, V.G. ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A.A. **Pesticidas e seus impactos no ambiente**. In: BRITO, L.T.L.; MELO, R.F.; GIONGO, V. (Ed.). **Impactos Ambientais Causados pela Agricultura no Semiárido Brasileiro**. 1. Petrolina: Embrapa Semiárido, v.1, 2010. p.101-136.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOSONI, P.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; BERA-MAILLET, C.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 103, n. 6, p. 2676-85, 2007.

MOTONAGA, K.; TAKAGI, K.; MATUMOTO, S. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 23, p. 340-345, 1996.

MUHAMMAD, N.; DAI, Z.; XIAO, K.; MENG, J.; BROOKES, P.C.; WANG, H.; WU, J.; XU, J. Changes in microbial community structure due to biochars generated from different feedstocks and their relationships with soil chemical properties. **Geoderma**, Oxford, v. 226–227, p. 270-278, 2014.

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

NOVOTNY, E. H.; MAIA, C.M.B.F.; CARVALHO, M.T.M.; MADARI, B.E. Biochar: pyrogenic carbon for agricultural use - a critical review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 321-344, 2015.

NRC. **National Research Council: The future role of pesticides in US agriculture**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2000. 332p. Disponível em: < http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9598&page=R2 >. Acesso em: 26 ago. 2015.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWING, W.; BACHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; COSTA, K.R.; FERREIRA, D.C.; MILANI, K.M.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.B.; ZULUAGA, M.Y.A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. Londrina, v. 3, p.. 56-77, 2014.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; REGITANO, J.B. Dinâmica de Pesticidas no Solo. In: MELO, V. D. F.; ALLEONI, L.R.F. (Ed.). **Química e Mineralogia do Solo - Parte 2: Aplicações**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. 188-248p.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M.L.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M.L. Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. In: CHAMY, R. e ROSENKRANZ, F. (Ed.). **Biodegradation – Life of Science**. Rijeka: Intech, 2013. p.251-287.

PAINTER, T.J. Carbohydrate polymers in food preservation: An integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum dominated peat bogs. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 36, p. 335–347, 2001.

PEIXOTO, M.D.F.D.S.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradation and formation of 14C-atrazine bound residues in soils of the Sao Paulo State. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 147-151, 2000.

PELAEZ, V.; SILVA, L.R.; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis. **Science and Public Policy**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 644-656, 2013.

PEREIRA, A.P.A. **Influência da profundidade do solo e do manejo de Eucalyptus grandis e Acacia mangium na estrutura das comunidades microbianas do solo**. 2014. 102p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e meio ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. e MOREIRA, J. C. (Ed.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e meio ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p.21-41.

PETER, H.; BEIER, S.; BERTILSSON, S.; LINDSTRÖM, E.S.; LANGENHEDER, S.; TRANVIK, L.J. Function-specific response to depletion of microbial diversity. **The ISME journal**, New York, v. 5, n. 2, p. 351-361, 2011. PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, Dordrecht, v. 8, p. 17-29, 1995.

PINTO-ZEVALLOS, D.M.; ZARBIN, P.H.G.A Química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, p. 1509-1513, 2013.

POLONIO, J.C.; POLLI, A.D.; BULLA, L.M.C.; ROSSETO, P.; SANTOS, C.M.; RHODEN, S.A.; PAMPHILE, J.A.; CONTE, H. Biorremediation potential of microorganisms: Survey of industrial and municipal treatable waste in Maringá-PR. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 3, p. 31-45, 2014.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, France, v. 33, n. 1, p. 243-255, 2013.

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

PUTNAM, R.A.; NELSON, J.O.; CLARK, J.M. The Persistence and Degradation of Chlorothalonil and Chlorpyrifos in a Cranberry Bog. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 170-176, 2003.

QUILLIAM, R.S.; GLANVILLE, H.C.; WADE, S.C.; JONES, D.L. Life in the ‘charosphere’ – Does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 65, p. 287-293, 2013.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 62, n. 2, p. 142-160, 2007.

REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L.; LAVORENTI, A.; PACOVSKY, R.S. Transformation pathways of 14C-chlorothalonil in tropical soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 40, n. 3, p. 295-302, 2001.

RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T.S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e a saúde e a saúde e meio ambiente meio ambiente. **Revista Liberato**. Novo Hamburgo, v. 10, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, B.A.L.; CAMELLO, T.C.F. Reflexões sobre o uso de agrotóxicos e suas consequências. **Revista Sustinere**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 27-35, 2014.

RIGOTTO, R.M.; VASCONCELOS, D.P.E.; ROCHA, M.M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

ROBERTS, T.; HUTSON, D. Metabolic pathways of agrochemicals. Part 2: Insecticides and fungicides In: ROBERTS, T.; HUTSON, D. (Ed.). **Metabolic Pathways of Agrochemicals: Insecticides and fungicides**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. p.1380–1384.

SAMPAIO, I. A. Especial: O que esperar dos defensivos agrícolas para 2015? , Curitiba, 2015. Disponível em: < <http://www.agrural.com.br/especial-o-que-esperar-dos-defensivos-agricolas-para-2015/> >. Acesso em: 26 ago 2015

SANTANA, E.L.; MACHINSKI JUNIOR, M. O uso de praguicidas por trabalhadores do setor agrícola atendidos ambulatorialmente em Maringá no período de 2002 a 2003. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 325-329, 2008.

SANTOS, F.; TORN, M.S.; BIRD, J.A. Biological degradation of pyrogenic organic matter in temperate forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 51, p. 115-124, 2012.

SATO, K.; TANAKA, H. Degradation and metabolism of a fungicide, 2,4,5,6-tetra-chloroisophthalonitrile (TPN) in soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 3, p. 205-209, 1987.

SCORZA JÚNIOR, R. P. **Pesticidas, agricultura e recursos hídricos**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 9p.

SILVA, J.M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H.P.; PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 891-903, 2005.

SILVEIRA, A.V.T.D.; FILHO, N.R.A. Proposta de alternativas menos tóxicas para ingredientes ativos de agrotóxicos no mercado brasileiro. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 23, p. 11-24, 2013.

SINGH, R.; BABU, J.N.; KUMAR, R.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, P.; RAGHUBANSHI, A.S. Multifaceted application of crop residue biochar as a tool for sustainable agriculture: An ecological perspective. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 77, p. 324-347, 2015.

SOARES, I.A.; FLORES, A.C.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.P.; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 78, p. 341-350, 2011.

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

SOLAIMAN, Z.M.; BLACKWELL, P.; ABBOTT, L.K.; STORER, P. Direct and residual effect of biochar application on mycorrhizal root colonisation, growth and nutrition of wheat. **Soil Research**, Australia, v. 48, n. 7, p. 546-554, 2010.

SOPEÑA, F.; BENDING, G. D. Impacts of biochar on bioavailability of the fungicide azoxystrobin: A comparison of the effect on biodegradation rate and toxicity to the fungal community. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, n. 11, p. 1525-1533, 2013. SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (**Documentos**, 42).

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**. São Miguel: FMR, 2006. p. 1-9.

SPADOTTO, C.A.; SCORZA JÚNIOR, R.P.; DORES, E.F.G.C.; GELBER, L.; MORAES, D.A.C. **Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos** Campinas - SP: Embrapa Monitoramento por Satélite: 46 p. 2010. (**Documentos**, 78.)

SPOKAS, K.A.; KOSKINEN, W.C.; BAKER, J.M.; REICOSKY, D.C. Impacts of woodchip biochar additions on greenhouse gas production and sorption/degradation of two herbicides in a Minnesota soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 77, n. 4, p. 574-581, 2009.

STURSA, P.; UHLIK, O.; KURZAWOVÁ, V.; KOUBEK, J.; IONESCU, M.; STROHALM, M.; LOVECKÁ, P.; MACEK, T.; MACKOVÁ, M. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 55, n. 9, p. 389-396, 2009.

STEWART, C.E., ZHENG, J.; BOTTE, J.; COTRUFO, M.F. Co-generated fast pyrolysis biochar mitigates green-house gas emissions and increases carbon sequestration in temperate soils. **Global Change Biology - Bioenergy**, Malden, v. 5, n. 2, p. 153-164, 2013.

SUN, D.; JUN, M.; ZHANG, W.; GUAN, X.; HUANG, Y.; LAN, Y.; GAO, J.; CHEN, W. Implication of Temporal Dynamics of Microbial Abundance and Nutrients to Soil Fertility under Biochar Application – Field Experiments Conducted in a Brown Soil Cultivated with Soybean, North China. In: IRANPOUR, R.; ZHAO, J.; WANG, A.; YANG, F.; LI, X. (Ed.). **Advances in Environmental Science and Engineering**. Switzerland: Trans Tech Publications, v.518–523 2012. p.384-394.

SUN, D.; MENG, J.; CHEN, W. Effects of abiotic components induced by biochar on microbial communities. **Acta Agriculturae Scandinavica B — Soil & Plant Science**, Oslo, v. 63, n. 7, p. 633-641, 2013.

SZALKOWSKI, M.B.; STALLARD, D.E. Effect of pH on the hydrolysis of chlorothalonil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 25, p. 208-210, 1977.

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

TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 116, n. 6, p. 653-659, 2013.

THIES, J.E.; RILLIG, M.C. Characteristics of Biochar: Biological Properties. In: LEHMANN, J. e JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**. London: Earthscan, 2009. p.85-104.

TILMAN, D.; WEDIN, D.; KNOPS, J. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. **Nature**, London, v. 379, n. 6567, p. 718-720, 1996.

TONINI, R.M.C.W.; DE REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**. Rio de Janeiro, v. 14, p. 1027-1035, 2010.

TORRADO, P.V.; SPAROVEK, G. **Mapa pedológico detalhado do Campus Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo**. Piracicaba: Piracicaba ESALQ-Depto Ciência do Solo, 1993.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.10, p. 10-13, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S. E. P. A. **Health Advisory: Chlorothalonil**. WASHINGTON, D. O. O. D. W., US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1988.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S. E. P. A. **Special Review and Reregistration Division Reregistration eligibility decision: chlorothalonil**. Washington, DC: Office of Pesticide Programs Special Review and Reregistration Division, US Environmental Protection Agency 1999.

VALASKOVA, V.; BALDRIAN, P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. **Plant Soil Environmental**, Prague, v. 55, n. 10, p. 413-423, 2009.

VAN DER WERF, H.M.G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 60, n. 2-3, p. 81-96, 1996.

VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVĀ, D.; KRIŠTŮFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 109, n. 4, p. 1159-1164, 2012.

VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S. Environmental Fate and Toxicology of Chlorothalonil. In: WHITACRE, D.M. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, v.232, 2014. p.89-105.

WALTZ, C.; ARMBRUST, K.; LANDRY, G. **Chlorpyrifos and chlorothalonil in golf course leachate**. GCSAA. Georgia: Golf Course Superintendents Association of America Golf Course Superintendents Association, 2002. 3p.

WERTZ, S.; DEGRANGE, V.; PROSSER, J. I.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; GUILLAUMAUD, N.; LE ROUX, X. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 9, n. 9, p. 2211-2219, 2007.

WERTZ, S.; DEGRANGE, V.; PROSSER, J.I.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; FREITAG, T.; GUILLAUMAUD, N.; ROUX, X. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 8, n. 12, p. 2162-2169, 2006.

WANG, H.; LIN, K.; HOU, Z.; RICHARDSON, B.; GAN, J. Sorption of the herbicide terbuthylazine in two New Zealand forest soils amended with biosolids and biochars. **Journal of Soils and Sediments**. Heidelberg, v. 10, p. 283-289, 2010.

YACHI, S.; LOREAU, M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.96, p. 1463-1468, 1999.

ZHANG, H.; LIN, K.; WANG, H.; GAN, J. Effect of Pinus radiata derived biochars on soil sorption and desorption of phenanthrene. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 158, n. 9, p. 2821-2825, 2010.

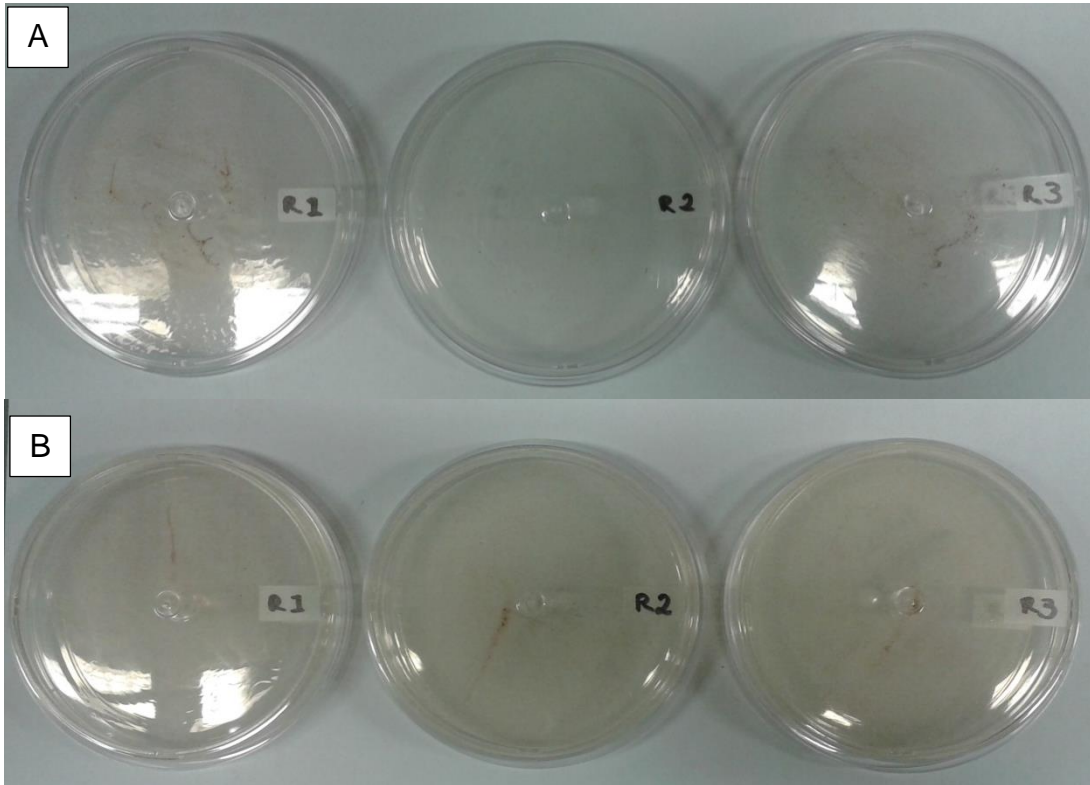
ZHANG, M.-Y.; TENG, Y.; ZHU, Y.; WANG, J.; LUO, W.-M., UDEIGWE, T.K. Isolation and Characterization of Chlorothalonil-Degrading Bacterial Strain H4 and Its Potential for Remediation of Contaminated Soil. **Pedosphere**, Beijing, v. 24, n. 6, p. 799-807, 2014.

ZHENG, W.; GUO, M.; CHOW, T; BENNETT, D.N.; RAJAGOPALAN, N. Sorption properties of greenwaste biochar for two triazine pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 181, n. 1/3, p. 121-126, 2010.

ZIMMERMANN, M.; BIRD, M.I.; WURSTER, C.; SAIZ, G.; BARTA, J.; CAPEK, P.; SANTRUCKOVA, H.; SMERNIK, R. Rapid degradation of pyrogenic carbon. **Global Change Biology**, Malden, v. 18, n. 11, p. 3306-3316, 2012.

APÊNDICES

Apendice A – Verificação da eficiência do processo de autoclavagem do solo. A) amostra de solo esterilizado plaqueadas em meio de cultura rico após 24 horas de inucação; B) amostra de solo esterilizado plaqueadas em meio de cultura rico após 48 horas de inucação



ANEXOS

Anexo A - Análise de similaridade de ANOSIM baseada no algoritmo de *Bray-Curtis*.

Agrupamentos da comunidade de bactérias (16S rDNA) em cada nível de diluição acompanhados nos períodos de 0, 5, 10 e 15 dias após a alteração da comunidade do solo natural.

Tempo (d)	R values	g1	g2	g3
0	g 1	0,0000	0,6975*	1,0000
	g 2	-	0,0000	0,7099*
	g 3	-	-	0,0000
5	g1	0,0000	0,9012*	1,0000
	g2	-	0,0000	0,7963*
	g3	-	-	0,0000
10	g1	0,0000	1,0000*	0,8889
	g2	-	0,0000	0,09074*
	g3	-	-	0,0000
15	g1	0,0000	1,0000	0,9753*
	g2	-	0,0000	0,9321*
	g3	-	-	0,0000

*(*p*) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, $R > 0,5$ indicam separação com sobreposição e $R < 0,5$, as amostras não apresentam diferenças significativas. "g1", solo natural (SN); "g2", diluições 10^{-1} e 10^{-3} ; e "g3", diluição 10^{-6}

Anexo B - Análise de similaridade de ANOSIM baseada no algoritmo de *Bray-Curtis*.

Agrupamentos da comunidade de bactérias (16S rDNA) em cada nível de diluição acompanhados nos períodos de 0, 21 e 42 dias após a alteração da comunidade do solo natural.

Tempo (d)	R values	g1	g2	g3	g4
0	g1	0	0,8611*	0,8407*	0,8741*
	g2	-	0	0,3278	0,7185*
	g3	-	-	0	0,4963*
	g4	-	-	-	0
	R values	g1	g2	g3	g4
21	g1	0	0,2537	0,3056	0,4611*
	g2	-	0	0,5370*	0,5870*
	g3	-	-	0	0,4463*
	g4	-	-	-	0
	R values	g1	g2	g3	g4
42	g1	0	0,6296*	0,8426*	0,8333*
	g2	-	0	0,6167*	0,5000*
	g3	-	-	0	0,6222*
	g4	-	-	-	0

*(p) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, $R > 0,5$ indicam separação com sobreposição e $R < 0,5$, as amostras não apresentam diferenças significativas. "g1", solo natural (SN CB e SN SB); "g2", diluições 10^{-1} CB e 10^{-1} SB; "g3", diluições 10^{-3} CB e 10^{-3} SB e "g4", diluição 10^{-6} CB e 10^{-6} SB.