Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Decomposição no solo da torta de filtro derivada do processamento da cana-de-açúcar: *emissão de gases de efeito estufa e aspectos microbiológicos*

Karina da Rocha

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

Piracicaba
2013

Karina da Rocha
Bacharel em Ciências Biológicas

Decomposição no solo da torta de filtro derivada do processamento da cana-de-açúcar: emissão de gases de efeito estufa e aspectos microbiológicos

Orientadora:
Profa. Dra. **BRIGITTE JOSEFINE FEIGL**

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

Piracicaba
2013

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

Rocha, Karina da
Decomposição no solo da torta de filtro derivada do processamento da cana-de-açúcar: *emissão de gases de efeito estufa e aspectos microbiológicos* / Karina da Rocha. - - Piracicaba, 2013.
98 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Gases de Efeito Estufa 2. Ciclagem de Nutrientes 3. Comunidade Microbiana 4. Atividade enzimática 5. T-RFLP I. Título

CDD 633.61
R672d

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

minha família...

...Meus pais Luis Carlos e Ivanilde, e ao meu irmão Leandro,

que me apoiam a cada dia,

que acreditaram mesmo quando eu não mais...

...pela presença e amor incondicional. Meus eternos orientadores.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao meu Deus e Pai por todos os momentos de aprendizado que vivi;

Agradeço a minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, e tiveram muita paciência e compreensão nos dias mais difíceis;

Ao programa de PPG em Microbiologia Agrícola, em especial ao professor Dr. Fernando Dini Andreote, pelos ensinamentos transmitidos; e à ESALQ pela oportunidade;

A Capes, pela concessão da bolsa de estudo;

A minha orientadora Dra. Brigitte Feigl, pelo auxílio em todo o processo de desenvolvimento deste trabalho, pela confiança, imensa paciência, apoio, e claro, amizade. Obrigada!!

Aos professores Dr. Carlos Clemente Cerri e Dr. Carlos Eduardo Pellegrino Cerri, por suas grandes ideias, pelo apoio e auxílio que permitiu a execução do trabalho;

Ao pesquisador Christian Andrew Davies (Shell International Exploration and Production Inc., Houston, Texas, USA), por suas ideias e colaboração;

Ao professor Dr. Marcos Tótola, que prontamente nos recebeu em seu laboratório de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa, e permitiu que acompanhássemos as análises feitas de atividade enzimática e T-RFLP;

Ao pós-doutorando Dr. Marcos Siqueira Neto, pela enorme contribuição no presente trabalho, por todo o auxílio e dedicação, estaria perdida sem você! Obrigada!

A pós-doutoranda Dra. Fabiana de Souza Cannavan por me socorrer nas análises de T-RFLP e pelas sugestões;

Aos funcionários do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental: Lilian, Ralf, Admilson, Dagmar e Sandra, que sempre auxiliaram na parte prática do trabalho. Em especial ao Admilson, sempre presente nas árduas coletas; e a Lilian e Ralf, que auxiliaram no desenvolvimento e entendimento do trabalho; assim como os estagiários que também auxiliaram bravamente nas coletas, e na parte prática;

A todos que me ajudaram nas coletas. Muito obrigada!!

Ao Zezinho pelo auxílio na parte burocrática;

A Usina Costa Pinto por ceder as áreas de estudo e os materiais necessários para a pesquisa;

As amizades que aqui surgiram, e que fizeram da minha vida acadêmica um grande aprendizado, pessoal e profissional;

Aos colegas do laboratório de Biogeoquímica Ambiental pela amizade, sabedoria e convivência; e aqueles pontuais que foram excepcionais no meu aprendizado e desenvolvimento desta pesquisa;

A todos os meus amigos, por todos os momentos divertidos que passamos juntos, pelo carinho e força sempre que precisei, e por entenderem também minha ausência;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

“A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma”.

John Ruskin

“Devemos ser gratos a Deus pelos pequenos detalhes. Nos detalhes descobrimos o valor de uma realidade. Olhar as miudezas da vida faz a diferença”.

Padre Fábio de Mello

SUMÁRIO

RESUMO 11

ABSTRACT 13

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

2.1 Gases de efeito estufa na agricultura 19

2.2 Torta de filtro 22

2.2.1 Sistema de Armazenamento e distribuição da torta de Filtro nas Usinas 23

2.2.1.1 Compostagem 23

2.2.1.2 Aplicação da torta de filtro no plantio da cana-de-açúcar 26

2.3 Comunidade Microbiana 27

3 MATERIAL E MÉTODOS 31

3.1 Localização e caracterização da área de estudo 32

3.2 Descrição das abordagens 34

3.3 Aplicação de Questionário às usinas do grupo Raízen 34

3.4 Caracterização da torta de filtro 37

3.5 Quantificação das emissões de gases do efeito estufa (GEE) 39

3.5.1 Amostragem de GEE proveniente da torta de filtro quando em pilhas 39

3.5.2 Quantificação do fluxo de GEE provenientes da pilha de torta de filtro 40

3.5.3 Conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente 41

3.6 Amostragem de GEE proveniente do solo após aplicação da torta de filtro 41

3.7 Avaliação da decomposição da Torta de filtro no solo: “Litter bags” 44

3.7.1 Amostragem dos “litter bags” 45

3.7.2 Análises biológicas dos “litter bags” 48

3.7.2.1 Biomassa Microbiana 48

3.7.2.2 Análises Enzimáticas 49

3.7.2.3 Extração do DNA, PCR e T-RFLP 49

3.7.3 Caracterização química da torta de filtro nos “litter bags” 53

3.8 Análises estatísticas 54

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

4.1 Emissões de GEE provenientes das Pilhas da Torta de Filtro 55

4.1.1 Fluxos de C-CO_2 55

4.1.2 Fluxos de N-N_2O 55

4.1.3 Fluxos de C-CH_4 56

4.1.4 Conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente 57

4.2 Emissões de GEE provenientes do solo com aplicação de torta de filtro 59

4.2.1 Fluxos de C-CO_2 59

4.2.2 Fluxos de C-CH_4 59

4.2.3 Fluxos de N-N_2O 60

4.2.3.1 Fator de emissão de N_2O devido à aplicação da torta de filtro nos sulcos 63

4.2.4 Conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente 64

4.3 Comparação dos fluxos de GEE proveniente da torta de filtro 66

4.4 Balanço do Carbono emitido em Carbono equivalente 66

4.5 Decomposição da torta de filtro no solo 67

4.5.1 Massa de carbono emitido (CO_2 e CH_4) e a perda de massa da torta de filtro 68

4.5.2 Qualidade da torta de filtro 69

4.5.3 Caracterização química da torta de filtro 70

4.5.4 Estrutura das comunidades microbianas total 77

4.5.4.1 Biomassa Microbiana 77

4.5.4.2 Análise Enzimática 78

4.5.4.3 Polimorfismo de fragmento de restrição terminal – T-RFLP 81

5 CONCLUSÕES 87

REFERÊNCIAS 89

RESUMO

Decomposição no solo da torta de filtro derivada do processamento da cana-de-açúcar: *emissão de gases de efeito estufa e aspectos microbiológicos*

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, voltada para a produção de açúcar, etanol e derivados. O aproveitamento de resíduos da usina, como torta de filtro e vinhaça no condicionamento do solo pode contribuir com a manutenção da sua fertilidade. Por outro lado, a cada operação agrícola necessária para o cultivo da cana-de-açúcar está associada uma emissão de GEE que deve ser contabilizada. O objetivo desta pesquisa foi estimar a emissão dos principais GEE (CO_2, N_2O e CH_4) pela torta de filtro, e avaliar as alterações de alguns atributos das comunidades microbianas durante o processo de decomposição. Após avaliação de uma enquete sobre o modo de utilização da torta de filtro por diversas usinas, um estudo foi desenvolvido na Usina Costa Pinto localizada em Piracicaba (SP). A torta aplicada no sulco de plantio da cana foi monitorada quanto à emissão dos gases, sendo que as concentrações dos mesmos nas amostras foram determinadas por cromatografia gasosa. Os atributos microbiológicos examinados foram a biomassa, a atividade enzimática (fosfatase ácida, alcalina e β-glicosidase) e a estrutura da comunidade através do polimorfismo de fragmento de restrição terminal (T-RFLP). Foi observada emissão significativa dos principais GEE predominantemente da torta quando aplicada nos sulcos de plantio, com destaque para o N_2O, com uma proporção doze vezes maior em massa do que o CH_4, em 56 dias de experimento. Quanto aos aspectos microbiológicos, o maior valor encontrado de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana para a dose usualmente aplicada (25 Mg ha^{-1}), foi com dois meses de experimento, com respectivamente 484,89 µg C g solo $seco^{-1}$ e 62,95 µg N g solo $seco^{-1}$, e correlacionado pelo coeficiente de Pearson com a atividade enzimática no material. Pela técnica de T-RFLP foi possível avaliar a estrutura dos Domínios de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* na comunidade microbiana da torta de filtro. Não houve modificação dessa estrutura ao longo do tempo analisado. Os resultados obtidos reforçam a importância dos atributos microbiológicos aliados a fatores químicos e físicos e a influência dos mesmos sobre as emissões de GEE.

Palavras-chave: Gases de Efeito Estufa, Ciclagem de Nutrientes, Comunidade Microbiana, atividade enzimática, T-RFLP.

ABSTRACT

Decomposition of the filter cake in the soil from the sugarcane processing:
emission of greenhouse gases and microbiological aspects

Brazil is the greatest worldwide producer of sugarcane with production of sugar, ethanol and derived. Usually applied to soil as fertirrigation, filter cake and vinasse on soil conditioning have contributed to the maintenance of fertility. On the contrary, each agricultural operation is associated to GHG emissions that must be accounted for the balance of products. This work aims evaluate GHG emissions (CO_2, N_2O and CH_4) from the filter cake, as well as evaluate the main differences in the microbiological community available within the decomposition process. After evaluation of a survey about to use the filter cake by industries, the study has been developed at Usina Costa Pinto located in Piracicaba (SP). The filter cake applied to the row of sugarcane planting have been monitored by taking regular samples of the emissions. The concentration of the three gases in the samples has been determined by gas chromatography. The microbiological aspects has been evaluated by biomass, enzymatic activity (acid phosphatase, alkaline phosphatase, and beta-glycosidase) and the community structure through terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Significant GHG emission has been observed; mainly from the filter cake applied to the row of sugarcane planting especially N_2O, with ratio twelve times greater than CH_4 in 56 days of experiment. For microbiological aspects, the maximum of carbon and nitrogen from the microbial biomass for the treatment usually applied (25 Mg ha^{-1}), within two months of experimentation, with respectively 484,89 µg C g dry $soil^{-1}$ e 62,95 µg N g dry $soil^{-1}$, and correlated by the coefficient of Pearson with the enzymatic activity existent in the material. The T-RFLP analysis has allowed evaluate the community structures of *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* in the microbiological community of the filter cake. Modification in the community structures was not observed over this time examined. The results obtained reinforce the importance of microbiological aspects combined with chemical and physical factors and their influence on GHG emissions.

Keywords: Greenhouse Gases, Nutrient Cycle, Microbial Community, Enzymatic Activity, T-RFLP.

1 INTRODUÇÃO

A exploração da lavoura da cana-de-açúcar é uma das atividades produtivas mais antigas do Brasil. Seu início foi dado por volta de 1530 com a ocupação dos portugueses, passando por diversos ciclos de fracasso e expansão, que acabou por conferir ao Brasil o destaque como grande produtor mundial. Entretanto, o aumento dessa produção foi realmente impulsionado na década de 70 com a implantação do programa Pró-Álcool, que tinha por objetivo a substituição dos derivados do petróleo pelo etanol. Por meio desse programa houve aumento da produção agrícola, modernização e instalação de novas usinas (BIODIESELBR, 2010).

De acordo com um trabalho colaborativo iniciado em fevereiro de 2008, por Aryeverton Fortes de Oliveira, realizado pela Embrapa Monitoramento por Satélite, com a finalidade de mapear as usinas de cana-de-açúcar e destilarias, foi demonstrado que o estado de São Paulo possui aproximadamente 180 usinas (CARVALHO, 2007), respondendo por 55% da produção nacional, um total de 4.400.000 hectares plantados com cana-de-açúcar (AGRONEGÓCIOS, 2011).

O destaque do estado de São Paulo é decorrente da proximidade com o mercado consumidor, dos centros de pesquisa e do setor sucroenergético, envolvendo a indústria de máquinas e equipamentos, conferindo menor custo de produção e de logística (BRASIL, 2007).

Aliado a esse crescimento, observa-se o uso intensivo da terra, convertendo a vegetação nativa em pastagens e agricultura, certamente levando a efeitos negativos para o ambiente e para a produtividade agrícola (NASSAR et al., 2008). Através destas mudanças de uso da terra e condições atuais do manejo do solo, pode-se obter a emissão de gases estufas na atmosfera. Além disso, alterar a quantidade de matéria orgânica produzida e a composição, e a diversidade de microrganismos residentes no solo, afeta-se assim, a produtividade agrícola e econômica daquela determinada região.

Desta forma, torna duvidosa a própria sustentabilidade do atual padrão de consumo energético, crescendo a preocupação com o ambiente, principalmente com as mudanças climáticas globais, já que, de acordo com os relatórios do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2007), a queima de combustíveis fósseis é responsável por mais de dois terços das emissões antrópicas de gases do efeito estufa (GEE) causadores do aquecimento global.

Atendendo a demanda global por uma produção mais limpa, as usinas tem adequado suas práticas de manejo de forma a diminuir as emissões de gases do efeito estufa e favorecer a fixação de carbono no solo. Assim, o aproveitamento de resíduos como a torta de filtro no condicionamento do solo pode contribuir com a manutenção de sua fertilidade e melhorias no solo se forem manejados adequadamente.

Para a diagnose da fertilidade do solo, a ferramenta mais utilizada é a análise química e granulométrica (textura) (SANTOS et al., 2009). De maneira geral, as plantas necessitam de macro e micronutrientes para uma alta produtividade, portanto, a ordem padrão decrescente de macronutrientes essenciais fica a seguinte: N>K>Ca>Mg>P=S; e micronutrientes: Cl, Fe, Mn, Zn, B, Cu e Mo (VALE et al., 2010). Dessa forma, através do monitoramento dos elementos essências às plantas, pode-se realizar o manejo adequado da fertilização das culturas, buscando aperfeiçoar o uso dos insumos (SANTOS et al., 2009).

Assim como a torta de filtro, os resíduos têm sido atualmente muito estudados, com a finalidade de reutilizar e de determinar seus possíveis destinos após a proibição de despejo desses produtos nos cursos d'água (CORTEZ et al.,1992). Como exemplos têm-se a cinza que apresenta potencial na substituição parcial do cimento Portland em argamassa (PAULA et al., 2007) e a palha, que assim como o bagaço, é apresentada como alternativa em potencial para a co-geração de energia (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2011).

Diante dessas atividades no setor sucroenergético, como o uso intensivo da terra, o solo como um sistema complexo sofre drásticas alterações decorrentes do uso e das mudanças na dinâmica da matéria orgânica do solo trazendo influências nas comunidades microbianas residentes, em função das modificações na umidade, temperatura, pH, aeração, entre outros.

Os microrganismos presentes na matéria orgânica do solo são responsáveis pelo armazenamento de nutrientes, assim como a transformação desses em forma mineral disponível. Além de serem decompositores da matéria orgânica, são sensíveis às interferências dos sistemas de manejos, sendo considerados como bons indicadores da qualidade do solo, podendo ter ampla aplicação na avaliação da qualidade (BARROS et al., 2007).

Assim, para se estabelecer atributos físico-químicos ao solo em questão, é importante conhecer a variação da composição físico-química e biológica da torta de filtro, observando possíveis mudanças na estrutura da comunidade microbiana.

A torta de filtro e a vinhaça são os principais resíduos da indústria sucroenergética. Sabe-se que contribuem muito com a fertilidade, fornecendo nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal, além de apresentar consideráveis quantidades de carbono (C) e nitrogênio (N) em sua composição que pode resultar em emissões significativas de CO_2, N_2O e CH_4, desde que existam condições favoráveis para formações destes GEE. Entretanto, para o resíduo torta de filtro ainda não existem pesquisas avaliando a taxa de emissão dos principais GEE nem o perfil da comunidade microbiana que decompõem este substrato. Diante do exposto, esta pesquisa se baseou na hipótese da torta de filtro ser uma fonte de GEE em potencial, sobretudo em condições de decomposição, devendo dessa forma ser contabilizada no “carbon footprint” do sistema sucroenergético.

O principal objetivo em função da hipótese acima é estimar a emissão dos principais GEE (CO_2, N_2O e CH_4) e observar as alterações nas comunidades microbianas durante o processo de decomposição da torta de filtro no solo.

Para alcançar o objetivo principal, foram traçados os seguintes objetivos específicos: i) fazer um levantamento das formas de compostagem e de aplicação da torta de filtro no cultivo da cana-de-açúcar nas principais usinas do grupo Raízen localizadas no estado de São Paulo; ii) caracterizar físico-químico e biologicamente o resíduo torta de filtro; iii) quantificar as emissões dos principais GEE da torta de filtro quando em pilhas e quando aplicada no sulco de plantio e expressá-los em termos de CO_2 equivalente; iv) avaliar as principais diferenças nos atributos microbiológicos e físico-químicos da torta de filtro em “litter bags” durante o processo de decomposição; v) caracterizar estruturalmente a comunidade microbiana que se desenvolve na torta no interior desses “bags”.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gases de efeito estufa na agricultura

Gases de efeito estufa são aqueles gases integrantes da atmosfera, de origem natural ou antrópica, que absorvem e reemitem radiação infravermelha para a superfície da Terra e para a atmosfera, mantendo a temperatura global adequada para a manutenção da vida. Conhecido como Efeito Estufa, esse efeito é natural e necessário para o aquecimento da Terra. No entanto, as ações antrópicas estão intensificando a concentração destes gases, o que pode alterar a temperatura do planeta.

O vapor d'água (H_2O), o dióxido de carbono ou gás carbônico (CO_2), o óxido nitroso (N_2O), o metano (CH_4) e o ozônio (O_3) são os principais GEE na atmosfera; existem também GEE totalmente produzidos por atividades humanas, como os halocarbonetos, como cloro e bromo, e outras substâncias. Dentre estes, CO_2, N_2O e CH_4 são os GEE que apresentam maior relevância quanto ao efeito estufa e as mudanças do clima (IPCC, 2007).

O CO_2 produzido durante a decomposição/oxidação aeróbica de materiais orgânicos tem como principais fontes de emissão a queima de combustíveis fósseis e as queimadas. O metano é produzido pela decomposição anaeróbica de materiais orgânicos, pela digestão animal, e na produção e distribuição de combustíveis fósseis. O óxido nitroso é produzido a partir do uso abusivo de fertilizantes em atividades agrícolas. E o vapor d'água, que é apontado pelo 4º Relatório do IPCC (2007) como um dos principais mecanismos causadores do aquecimento global, pois funciona como um amplificador do aumento das temperaturas (SOARES, 2010).

Dentre os gases de maior relevância para o efeito estufa, o CO_2 é o principal devido à grande quantidade, em torno de 55% do total dos GEE. Os demais GEE estão presentes em menor quantidade, mas o aumento de sua concentração na atmosfera é igualmente preocupante diante do seu maior potencial de aquecimento global (PAG), em comparação ao do gás carbônico (IPCC, 2007).

Apesar da quantidade de CH_4 presente na atmosfera ser bem menor que a de CO_2, sua capacidade de reter radiação infra-vermelha é 25 vezes maior. Já o PAG do N_2O, que ocorre em concentrações menores ainda, está em torno de 298 (IPCC, 2007).

No Brasil, os padrões de contribuição dos GEE são diferentes daqueles observados globalmente. Dentre as contribuições dos GEE provenientes da queima de combustíveis fósseis, agricultura e mudanças do uso da terra (desmatamento), os dois últimos são responsáveis por mais de dois terços das emissões totais (CERRI et al., 2009). A taxa de desmatamento faz com que o Brasil passe da 17ª para a 5ª posição na relação dos países que mais emitem GEE (CERRI et al., 2007).

Fluxos de CO_2

De acordo com os últimos dados do IPCC (2007) a concentração de CO_2 atualmente aumenta a uma taxa estimada de 2,2 ppmv ano^{-1} (partes por milhão em volume); ao passo que no período de 1960 a 2005 o incremento anual médio foi de 1,4 ppmv ano^{-1}. Esse aumento da concentração de CO_2 pode ser atribuído a fatores como ao uso de combustíveis fósseis, às mudanças de uso e manejo da terra, como a queima de biomassa, produção agrícola e conversão de áreas nativas e pastagem para fins agrícolas (DENMAN et al., 2007).

Segundo CARVALHO et al. (2010), a emissão de CO_2 do solo para atmosfera ocorre principalmente através de dois processos biológicos, a degradação de resíduos orgânicos, e a respiração de organismos e o sistema radicular das plantas.

O fluxo de CO_2 para a atmosfera está diretamente relacionado com as variáveis climáticas: umidade do solo e especialmente temperatura, uma vez que, acréscimos podem elevar exponencialmente a taxa de respiração do solo (FANG; MONCRIEFF, 2001).

Fluxos de N_2O

A concentração de N_2O na atmosfera aumentou em torno de 16% (de 270 para 320 ppbv), no período entre 1750 e 2000; e atualmente sua taxa de aumento é de 0,8 ppbv ano^{-1} (IPCC, 2007).

As emissões de N_2O para a atmosfera podem ser naturais e antrópicas. As principais fontes naturais são os processos que ocorrem nos solos e oceanos; sendo que dois terços por bactérias conhecidas pelo processo de nitrificação e desnitrificação; e um terço provém da degradação microbiana de materiais biológicos (LASSEY; HARVEY, 2007) e não biológicos como a decomposição

química do nitrito (NO_2^-) (quimiodesnitrificação), decomposição química da hidroxilamina (NH_2OH; produto intermediário na conversão de amônio (NH_4^+) a NO_2^-), e da reação desta com o NO_2^- (BREMMER, 1997).

As fontes antrópicas respondem aproximadamente por 38% das emissões totais de N_2O, e correspondem à deposição de dejetos animais, queima de biomassa e de combustíveis fósseis, e principalmente pelo uso de insumos nitrogenados ou orgânicos, desde que, para este último, em altas doses de N em sua formulação (CERRI et al, 2009).

O processo de nitrificação citado acima se refere à oxidação aeróbia de amônio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-) por bactérias quimioautotróficas e ocorre em duas etapas: nitritação, em que o NH_4^+ é oxidado a nitrito NO_2^- e nitratação, onde o NO_2^- é oxidado a NO_3^-. O processo de oxidação do NO_3^- até N_2 por bactérias anaeróbias facultativas, é conhecido como desnitrificação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Fluxos de CH_4

Segundo dados do IPCC (2007), no período entre 1750 e 2000 a concentração de CH_4 na atmosfera aumentou cerca de 150%, variando de 700 para 1.745 ppbv, e vem aumentando a uma taxa de 7 ppbv ano^{-1}.

As emissões de CH_4 podem ser de fontes naturais, como fermentação de ruminantes, dejetos animais, cultivos em terras alagadas, aterros (DENMAN et al., 2007; FORSTER et al., 2007); e antrópicas, como queima de combustíveis fósseis (IPCC, 2007).

Das emissões de CH_4 na atmosfera, em torno de 70-80% é originário de fontes biológicas. A formação deste GEE se dá através da fermentação metanogênica, no qual ocorre a completa mineralização da matéria orgânica em ambientes anaeróbios, onde as concentrações de sulfato (SO_4^-) e nitrato (NO_3^-) são baixas, formando no final CH_4 e CO_2 (LE MER; ROGER, 2001).

A degradação da matéria orgânica ocorre através do metabolismo de diversos microrganismos, começando por processos aeróbios, seguidos por bactérias facultativas e/ou anaeróbias que convertem os polímeros orgânicos mais complexos como carboidratos, proteínas e lipídios em monômeros como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, etc., que são então hidrolisados, fermentados e biologicamente convertidos em materiais orgânicos mais simples (LE MER; ROGER,

2001). Esses compostos são reduzidos pelas *Archaeas* metanogênicas a CH_4 (FERRY, 1999).

Diante desse quadro atual, mesmo sendo o setor agrícola uma importante fonte de GEE para atmosfera, este setor pode se comportar como dreno de GEE se for aplicado adequadamente práticas de manejo do solo e incentivado a utilização de resíduos ou co-produtos. A partir disso se torna indispensável entender o impacto e a importância da reciclagem da torta de filtro, um dos resíduos do cultivo da cana-de-açúcar, muito utilizada no condicionamento do solo.

2.2 Torta de filtro

Durante o processo da fabricação do açúcar, cada tonelada de cana processada gera, em média, 30 kg do resíduo torta de filtro (VEIGA et al. 2006), produzido durante a clarificação do caldo obtido em moenda. Como na safra 2011 – 2012 foram moídas 558,7 milhões de toneladas de cana, gerou-se uma média de 16,7 bilhões de kg de torta no país (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2013).

O caldo obtido nas moendas é enriquecido com uma solução de hidróxido de cálcio e enxofre para possibilitar a floculação das substâncias orgânicas coloidais. O caldo clarificado e limpo é evaporado e o lodo formado passa por um período de decantação. Ao lodo mistura-se bagaço de cana moído, para permitir uma consistência apropriada para a próxima etapa, a filtração a vácuo, onde é recuperada a sacarose ainda existente e dá-se origem à torta de filtro (BUSATO, 2008).

Essa mistura de bagaço moído e lodo de decantação têm sido largamente aplicada principalmente nos sulcos de plantio, na tentativa de melhorar as condições de desenvolvimento da cultura com um menor custo (PENATTI; BONI, 1989).

De acordo com o pesquisador Ailto Antonio Casagrande, professor da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) *Campus* Jaboticabal, a torta de filtro é um adubo orgânico que apresenta resultados e benefícios inúmeros, sendo que a principal vantagem é “retornar ao solo o que a planta extraiu” (UDOP, 2009).

Dos benefícios que essa aplicação da torta pode trazer para a cultura, destaca-se o fornecimento de matéria orgânica e nutriente, proporcionando assim

um aumento na capacidade de retenção de água, estimulando a atividade biológica, melhorando também as condições físico-químicas para o desenvolvimento da planta (PENATTI; BONI, 1989).

Essas vantagens nutricionais são conhecidas há muito tempo. Algumas unidades produtoras fazem uso dessa prática desde a década de 70, porém ela se expandiu consideravelmente a partir de 1999, diante do encarecimento dos adubos químicos. Hoje o Brasil é o país que mais utiliza os resíduos da indústria sucro-alcooleira no cultivo da cana-de-açúcar (UDOP, 2009).

Pesquisas em usinas da região de Ribeirão Preto mostraram que a substituição de adubos químicos proporcionou uma economia média de US$ 60 por hectare. Além da redução nos custos, houve a redução da poluição ambiental com o aproveitamento dos resíduos, pois antes dessa técnica os produtos eram despejados diretamente nos rios (UDOP, 2009).

A composição da torta de filtro pode variar de acordo com a variedade da cana, tipo de solo, maturação, processo de clarificação do caldo (a adição de produtos pode aumentar o teor de alguns minerais, principalmente fósforo e cálcio), dentre outros.

2.2.1 Sistema de Armazenamento e distribuição da torta de Filtro nas Usinas

2.2.1.1 Compostagem

A torta de filtro produzida é transportada até um pátio a céu aberto onde é empilhada em leiras de dimensão média de aproximadamente 3 metros de altura, e de 20 metros de comprimento. As pilhas de torta de filtro são revolvidas ocasionalmente para facilitar a secagem e a compostagem aeróbica do material. O tempo de permanência nas pilhas é bastante variável, havendo demanda, a torta de filtro é transportada em caminhão até as áreas de reforma/plantio e aplicada nos sulcos.

Durante o período médio de um mês em que a torta permanece na pilha ocorre um processo de decomposição desenvolvido por microrganismos aeróbicos em duas fases: a primeira, conhecida como degradação ativa, corresponde a reações bioquímicas de oxigenação mais intensas, enquanto que na segunda fase,

conhecida como fase de maturação, ocorre o processo de humificação. Todo esse processo é chamado de compostagem (CARVALHO; GUERRA, 2001).

No decorrer desse processo de compostagem, há três fases de temperatura que indicam uma sucessão de microrganismos saprofíticos (ou decompositores, que se alimentam a partir de tecidos, mortos e/ou em decomposição de plantas ou animais) (CORREA et al., 2007, appud EPSTEIN, 2003).

No início do processo, organismos mesofílicos elevam a temperatura para aproximadamente 45°C (primeira fase mesofílica), favorecendo o desenvolvimento de organismos termofílicos, que aumentam a taxa de decomposição da matéria orgânica. E, como consequência, elevam a temperatura a valores entre 55 - 80°C (fase termofílica). Com o esgotamento da matéria orgânica, há um decréscimo na população de organismos termofílicos e logo os organismos mesofílicos responsáveis pela síntese de matéria húmica voltam a dominar a pilha (segunda fase mesofílica) (CORREA et al., 2007, appud EPSTEIN, 2003).

Como regra básica do processo de compostagem, por se tratar de um processo aeróbio, essas pilhas precisam ser revolvidas frequentemente a fim de renovar o volume gasoso de dentro da pilha.

Ao final desse processo de compostagem é produzido um material estável, higienizado, e que é benéfico para os solos e para o crescimento vegetal.

A velocidade de decomposição do material orgânico e a consequente liberação de CO_2 são determinadas principalmente pelas características intrínsecas da própria matéria orgânica, como: composição do material; relação C/N; grau de agregação; pH; teores de nutrientes; umidade; temperatura; etc. (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A relação C/N (quantidade de carbono e nitrogênio existente em um determinado composto orgânico) infere sobre a origem do composto e dá subsídios para compreender sobre sua composição, como velocidade e efeitos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Uma relação C/N é considerada alta quando maior que 30, ocasionando a imobilização dos nutrientes, diminuindo-os no ambiente; intermediário entre 20 e 30, neste caso, o processo de imobilização se iguala ao de mineralização, não alterando a disponibilidade de nutrientes no ambiente; e baixa quando menor que 20, fazendo com que o processo de mineralização seja maior que o de imobilização,

aumentando a disponibilidade de nutrientes, sendo, portanto, considerado um substrato rico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em comparação, os microrganismos do solo possuem razões C/N variáveis de 4 a 9, indicando que para o processo de mineralização da matéria orgânica (liberação de nutrientes), os microrganismos podem gerar um déficit de nitrogênio para as plantas, ao utilizarem nitrogênio disponível no solo para as necessidades de seu próprio organismo, um processo denominado imobilização. À medida que a decomposição da matéria orgânica continua, os níveis de nitrogênio mineral no solo começam a ficar maiores que as necessidades dos microrganismos, fornecendo as plantas o nitrogênio necessário (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Como citado acima, a composição do substrato é umas das variáveis que regula a sua degrabilidade, e varia em função da assimilabilidade pelos microrganismos e a sua persistência no solo.

A celulose é um polissacarídeo de grande ocorrência natural, porém não é considerada persistente no ambiente, sendo, portanto, prontamente assimilável e decomposta no solo por ação de enzimas (celulases) produzidas pela comunidade microbiana, fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias. Exemplos:

a) Fungos: *Trichoderma, Chaetomium, Penicillium, Fusarium e Phoma.*
b) Anaeróbias e aeróbias facultativas: *Acetovibrio, Bacteroides, Clostridium, Eubacterium, Pseudonocardia*, etc.
c) Aeróbios e anaeróbios facultativos: *Acidothermus, Actinoplanes, Bacillus, Cellulomonas, Pseudomonas, Staphylococcus*, etc.

Os fungos se fazem mais presentes quando em solos úmidos e geralmente em pH ≤ 5,5. Quando em regiões mais secas e pH em torno de 5,7 a 6,2, são as bactérias os principais decompositores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As proteínas e as hemiceluloses são consideradas substratos moderadamente persistentes e assimiláveis. As proteínas são facilmente decompostas por diversos microrganismos que produzem exoenzimas proteolíticas. Quando associadas aos taninos, lignina ou as argilas tornam-se mais resistente à decomposição. (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Representando o segundo maior componente dos vegetais (seguido da celulose), a hemicelulose é decomposta por diversas enzimas, geralmente produzidas inicialmente por fungos, seguidos por bactérias. Quando a hemicelulose se liga a outras substâncias, como por exemplo, fibrilas de hemicelulose, formam-se

pontes de hidrogênio que dificultam a sua decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A lignina, por sua vez, é considerada um substrato persistente e de lenta assimilação pelos microrganismos no solo, um dos biopolímeros mais abundantes, sendo classificada como persistente devido seu alto peso molecular e estrutura química tridimensional. Sua decomposição é feita por lacases e peroxidases (clonadas e sequenciadas); no solo a degradação ocorre principalmente por grupos de Basidiomicetos e Ascomicetos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

À vista disso, a celulose é um substrato prontamente assimilável, com uma maior velocidade de decomposição, provavelmente pela estrutura mais uniforme, necessitando de um menor arsenal enzimático no processo; seguida da hemicelulose e proteínas, com um grau intermediário de assimilação; e por último a lignina, com uma velocidade de decomposição mais lenta, decorrente de uma estrutura ramificada, com anel aromático, o que dificulta a homogeneidade da cadeia, e necessitando-se assim, de mais enzimas para a sua degradação.

2.2.1.2 Aplicação da torta de filtro no plantio da cana-de-açúcar

De acordo com estudos anteriores, como exemplo, NUNES JR. et al. (1988), CARDOZO et al. (1988) e DONZELLI E PENATTI (1997), as doses de torta de filtro usualmente utilizadas no plantio da cana-de-açúcar variam entre 20 e 40 Mg ha^{-1} para aplicação nos sulcos e uma dosagem de 60 a 80 Mg ha^{-1} para aplicação na área total, observando sempre nesses casos, os aspectos econômicos juntamente com a melhoria na disponibilidade de nutrientes para as plantas (NARDIN, 2007).

Em função da concentração dos nutrientes e a capacidade de retenção de água, a torta de filtro pode substituir, em condições específicas, completamente a aplicação de fertilizante fosfatado quando utilizada em doses superiores a 20 Mg ha^{-1} no sulco de plantio (NARDIN, 2007).

Além disso, a aplicação em conjunto da torta de filtro com fosfatos naturais possibilita a disponibilização mais rápida do fósforo, uma vez que melhora a solubilidade destes compostos (SANTOS et al. 2010).

Molina (1995) também sugere que a aplicação de torta de filtro ou o produto da sua compostagem contribui significativamente, com a atividade biológica, a matéria orgânica e a agregação física do solo, bem como a produtividade da cultura.

2.3 Comunidade Microbiana

Os organismos são responsáveis por diversos processos de valor inestimável, uma vez que promovem a manutenção da ciclagem de nutrientes e fertilidade biológica do solo (OSLER; SOMMERJORN, 2007). Reciclam a matéria orgânica do solo (MOS) aumentando a disponibilidade de nutrientes, atuam na estruturação, degradam poluentes, entre diversas outras funções, contribuindo com o equilíbrio dos ecossistemas (YEATES, 2003; YAN et al., 2012). Quanto maior a biodiversidade do solo, maior será sua estabilidade, produtividade e resistência diante de distúrbios naturais/antrópicos.

A ciclagem dos elementos no ambiente é um serviço da natureza extremamente valioso, sendo estimado o valor monetário global ao equivalente o PIB econômico mundial, na ordem de 18 trilhões de dólares ano^{-1} (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os elementos no solo apresentam forte relação com o clima e ações antrópicas, sendo transformados pelos organismos heterotróficos liberando-os em forma mineral disponível. Os organismos são essenciais nessa ciclagem biogeoquímica, atuando de forma regulada e sincronizada com os demais processos. Os elementos da solução do solo são absorvidos e assimilados pela vegetação, por meio da energia solar, são então depositados novamente no solo pela fauna, catalisados pela biomassa microbiana, mineralizados, tornando-se disponíveis, então, são liberados para a atmosfera e para a solução, para novamente serem absorvidos, iniciando um novo ciclo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O que se espera encontrar em compostos ricos em matéria orgânica, como a torta de filtro, é uma sucessão de comunidades bacterianas e fúngicas durante a compostagem. Porém os trabalhos científicos encontrados na literatura relatam somente aumento ou decréscimo de populações microbianas durante o processo de compostagem (MOREIRA et al., 2012) ou na presença de metais pesados no solo (FIRME, 2005) e não a participação destes microrganismos na ciclagem de nutrientes e emissões ou drenos de GEE.

A decomposição da torta de filtro e a consequente emissão de GEE para atmosfera estão relacionadas a alguns grupos de microrganismos, em especial os procariotos, porém, com o resíduo torta de filtro não há estudos que relacione esses

fatores. Faz-se necessário um estudo da comunidade e atividade microbiana presente e ativa, para contribuir com estudos futuros, como o uso de técnicas moleculares a fim de compreender melhor esses microrganismos.

As técnicas empregadas para se analisar as propriedades biológicas do solo no presente trabalho foram: biomassa microbiana, atividade enzimática, e polimorfismo de fragmento de restrição terminal (T-RFLP).

Biomassa microbiana

A biomassa microbiana do solo (BMS) é considerada a parte viva da matéria orgânica, com volume menor que 5.10^3 μm^3. É composta por uma diversidade de organismos de *Archaea*, *Bacteria*, *Fungi*, Protoctista e Animalia (como os nematóides), responsáveis principalmente pela ciclagem e fixação de nutrientes, assim como a supressividade biológica, decomposição de xenobióticos, entre outros (LUPWAYI et al., 2004; HUNGRIA et al., 2009).

A BMS representa de 2 a 5 % do carbono orgânico, e de 1 a 5% do nitrogênio total. A atividade dos microrganismos é influenciada por propriedades ambientais e físico-químicas, sendo assim considerados bioindicadores de alterações ambientais, pois reagem com rapidez diante de perturbações promovidas pelo desequilíbrio ecológico e variações no total de matéria orgânica do solo ocasionadas pelo manejo, sugerindo ser um parâmetro de diagnóstico de qualidade do solo (BALOTA et al., 1998; HUNGRIA et al., 2009).

Entretanto, determinar apenas a biomassa não fornece indicações sobre os níveis de atividade das populações microbianas do solo, sendo importante também avaliar parâmetros que estimem a atividade metabólica das comunidades microbianas, tais como a atividade enzimática.

Atividade enzimática

As enzimas do solo têm origem de macro e microrganismos, sendo a biomassa microbiana a principal fonte das enzimas. Entre elas, as mais estudadas são as oxirredutases, transferases e hidrolases. Neste trabalho, as enzimas estudadas foram as fosfatases ácida e alcalina e a β-glicosidase, todas são

hidrolases, envolvidas no processo de degradação da matéria orgânica e liberação de nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Fosfatases ácidas e alcalinas existentes no solo são classificadas com base no pH de atuação e a síntese e a atividade das fosfatases microbianas são reguladas pela concentração de fósforo disponível, sendo secretadas em condições de ausência (KAPRI; TEWARI, 2010). Ao final, o fósforo acumulado é mineralizado e disponibilizado.

Sabe-se que existem mais bactérias solubilizadoras de fosfato do que de fungos, porém estes últimos apresentam maior capacidade de solubilização. Dentre os microrganismos capazes de solubilizar fosfatos podem-se citar bactérias: *Bacilluspulvifaciens, Pseudomonas putida, Xanthomonas sp., Thiobacillus thiooxidans*, entre outras; e fungos: *Aspergillus niger, Penicillium lilacium, Mortierella sp.*, entre outros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A β-glicosidase é uma enzima que atua na etapa final do processo de decomposição da celulose, na qual, microrganismos celulolíticos, ao atacar a celulose, rompem sua molécula de alto peso molecular, formando o dissacarídeo celobiose. Os fungos são os principais microrganismos celulolíticos quando em solos úmidos, e geralmente em pH ≤ 5,5, ao passo que, em regiões mais secas predominam as bactérias, em pH de 5,7 a 6,2 predominam as do gênero *Cytophaga*, e de pH neutro a alcalino, as do gênero *Vibrio* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Contudo, além determinar a biomassa microbiana e a atividade enzimática, inferindo sobre a qualidade do solo e a atividade metabólica existente, torna-se interessante analisar a comunidade como um todo, e observar o modo como ela apresenta-se na amostra ambiental.

Polimorfismo de fragmento de restrição terminal (T-RFLP)

A análise de T-RFLP, como seu nome sugere, determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos terminais de uma reação de restrição, provenientes da amplificação de ácidos nucléicos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), sendo um dos *primers* marcado com fluorescência, que pode ser detectado por um sequenciador (MARSH, 1999).

Essa análise utiliza métodos rápidos de extração de DNA de comunidades de microrganismos de amostras ambientais, incluindo etapas de: amplificação,

purificação, digestão, precipitação, desnaturação das amostras, e análise dos fragmentos terminais de restrição em sequenciador automatizado. Os fragmentos de restrição terminal resultantes são então medidos e comparados entre as amostras.

É um método reprodutível, sensível a mudanças nas estruturas de comunidades microbianas do solo, permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras, comparando-se então, o perfil de diferentes comunidades de microrganismos, inferindo sobre seu agrupamento (LIU et al., 1997).

Tais técnicas inferem na comunidade microbiana de modo geral; como indicadores sensíveis no monitoramento de alterações de qualidade do solo, decorrentes do uso e das mudanças na dinâmica da matéria orgânica nesse ambiente. Tais ferramentas orientam o planejamento e as práticas de manejo, de modo a mitigar os impactos causados por essa atividade agrícola (SANTANA & BAHIA FILHO, 1998; DORAN & PARKIN, 1994; TURCO et al., 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear da Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba - SP. Uma representação das etapas do trabalho pode ser visualizada na Figura 1.

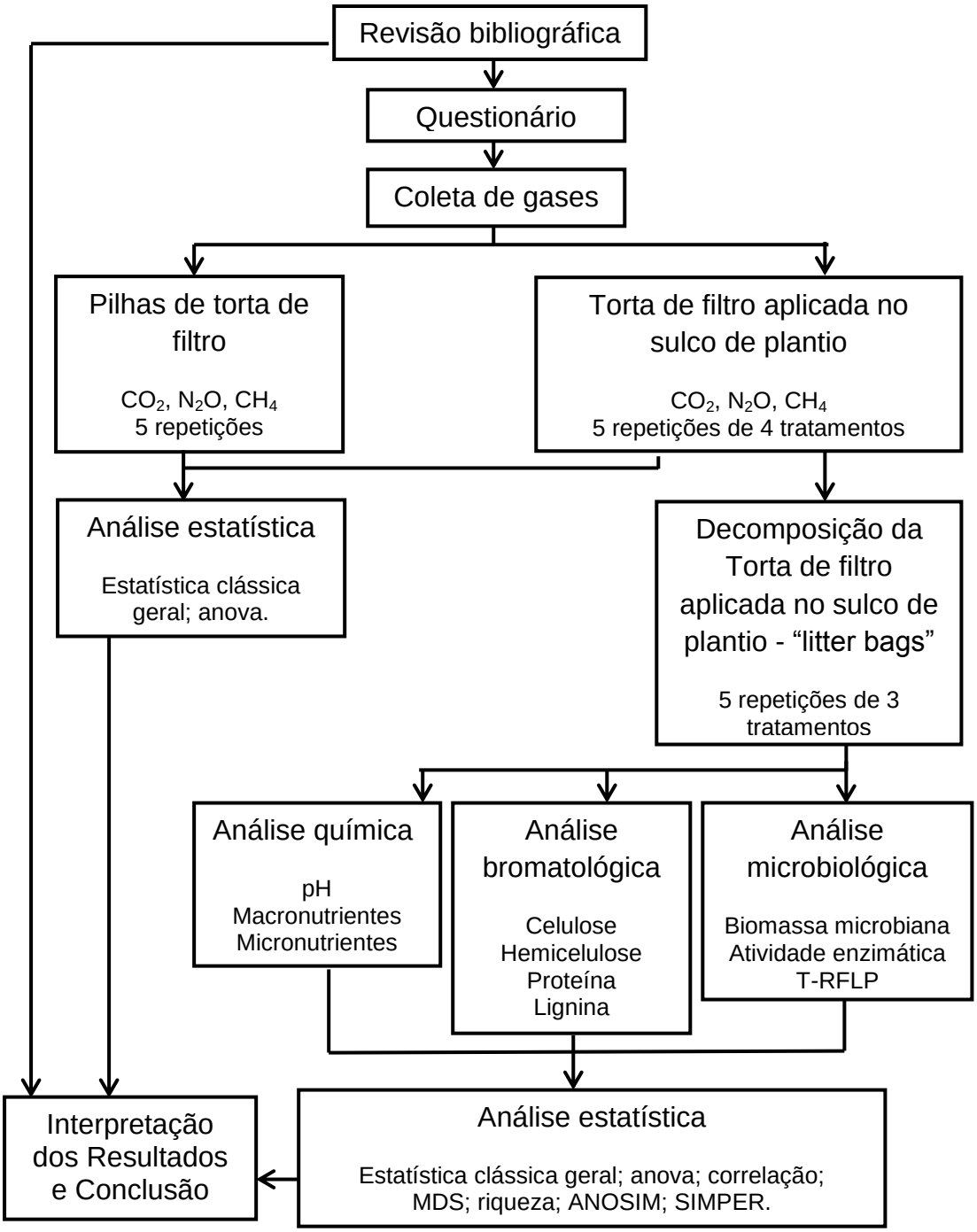

Figura 1 - Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho

3.1 Localização e caracterização da área de estudo

Os estudos para avaliar os efeitos da torta de filtro aplicada no sulco de plantio da cana-de-açúcar na emissão de gases de efeito estufa, decomposição do resíduo e a comunidade microbiana foram realizados na Usina Costa Pinto (22°42' S, 47°38' O), uma das 24 unidades do Grupo Raízen, localizada no município de Piracicaba, SP (Figura 2). Esta unidade é uma das maiores situadas no interior do estado de São Paulo, áreas favoráveis ao plantio de cana-de-açúcar desde as condições edáficas até ao sistema complexo de infra-estrutura benéfica, devido sua proximidade dos centros de pesquisa e da indústria de máquinas e equipamentos do setor sucroenergético.

A unidade foi escolhida devido à facilidade no contato, acesso e adequabilidade das áreas para o desenvolvimento do projeto.

Figura 2 - Mapa do Brasil com destaque para o Estado de São Paulo e a localização da área de estudo (Piracicaba, Usina Costa Pinto).

A Usina Costa Pinto foi construída em 1936, é a matriz do Grupo, sendo situada no município de Piracicaba, região sudeste do estado de São Paulo, no qual recebe constantemente investimentos em pesquisa e inovação tecnológica, sendo, portanto considerada uma das mais modernas do setor sucro-alcooleiro (USINA COSTA PINTO, 2010).

O clima da região segundo Köppen é classificado como Cwa - subtropical úmido com estiagem no inverno (temperatura média do mês mais quente de verão acima de 22º C e temperatura média do mês mais frio inferior a 18ºC), com precipitação anual normalmente acima de 1400 mm. A temperatura mínima e máxima, e a precipitação durante o experimento na Usina Costa Pinto encontra-se apresentada na Figura 3.

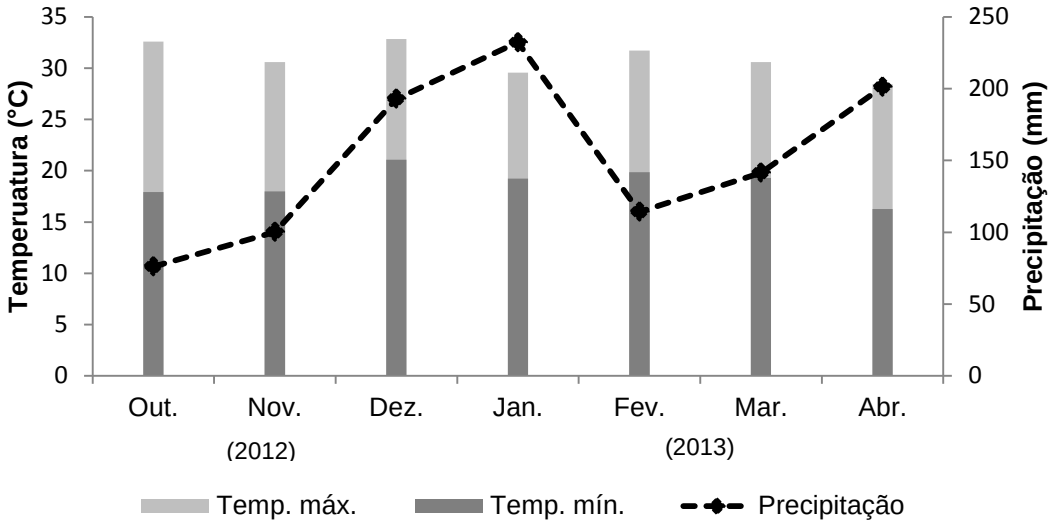

Figura 3 - Temperaturas máximas, mínimas (°C) e precipitação mensal (mm) na Usina Costa Pinto, em Piracicaba (SP). Os dados referem-se aos anos de 2012 (outubro, novembro e dezembro) e 2013 (janeiro, fevereiro, março e abril).

O solo no local do experimento é classificado como Latossolo Vermelho amarelo distrófico (Embrapa, 2006). A caracterização físico-química da camada 0-10 cm do solo foi realizada em 2012. O pH em $CaCl_2$ foi de 5,9, o enxofre e fósforo em mg dm^{-3} foram respectivamente 7 e 233, os demais macronutrientes em $mmol_c$ dm^{-3} foram de 8,8 para potássio, 41 para cálcio, 10 para magnésio, potencial de acidez (H + Al) de 18, capacidade de troca catiônica (CTC) de 78,3, saturação de bases de 77%; para os micronutrientes em mg dm^{-3} foram de 0,18 para boro; 1,2 para o cobre; 160 para o ferro; 16,2 para o manganês; 2,4 para o zinco. A relação C/N foi de 12,93, com carbono e nitrogênio de 1,2 e 0,10 % respectivamente.

3.2 Descrição das abordagens

Para entender a dinâmica envolvendo a torta de filtro, desde sua permanência na pilha até sua decomposição no solo, seguiram-se estudos com a finalidade de entender os processos, monitorar possíveis emissões de GEE provenientes do resíduo, enquanto em pilhas e quando aplicada nos sulcos de plantio e avaliar o processo de decomposição. A seguir serão descritas as características de cada estudo, tal como as metodologias de avaliação.

3.3 Aplicação de Questionário às usinas do grupo Raízen

Para um levantamento e análises dos métodos de tratamento e utilizações do resíduo do sistema sucroenergético (Torta de filtro) foi aplicado um questionário as Usinas do grupo Raízen, visando compreender o ciclo da torta de filtro gerada nesses diferentes sistemas de produção, destacando as particularidades de cada uma. A seguir estão relatadas as questões abordadas:

1. Quantas toneladas de torta de filtro são produzidas por dia?
2. Qual é o primeiro destino da torta de filtro assim que formada? E qual o tempo de permanência nesse local?
3. Qual é o próximo destino da torta de filtro e o tempo de permanência nesse novo local?
4. Nos pátios, aproximadamente quantas pilhas de torta de filtro são formados?
5. Qual altura e comprimento das pilhas?
6. Nos pátios a torta é revolvida? Se for, qual a frequência?
7. É feita alguma análise físico-química da torta?
8. É misturada a essa torta algum outro fertilizante ou resíduo?
9. Qual a proporção desse fertilizante ou resíduo em kg/tonelada de torta?
10. Quais as formas e as dosagens de aplicação da torta de filtro são utilizadas no plantio?
11. Foi observado um melhor desenvolvimento e uma melhor produtividade da cana-de-açúcar após o uso da torta de filtro? Comente.

Mais do que entender o ciclo ao qual a torta de filtro é submetida, as questões levantadas serviram de base e orientação para proceder com os experimentos.

O questionário foi elaborado no site SurveyMonkey, um instrumento que permite uma abordagem mais quantitativa, destacando-se pela rapidez no preenchimento das respostas e largo alcance.

O Website abrange desde uma ferramenta básica, fácil e gratuita para os iniciantes em questionários até ferramentas avançadas para pesquisadores profissionais, com diversos planos e preços de acordo com a finalidade, permitindo análises de avaliações de satisfação de clientes e desempenho de funcionários até avalições de cursos e pesquisas de diversos tipos.

Com base no questionário respondido foi possível visualizar e entender melhor todo o processo acerca da torta de filtro. Das 24 unidades produtoras da Raízen, 11 responderam as questões propostas.

A produção em toneladas de torta de filtro por dia varia de acordo com a capacidade de moagem da usina que vai desde 180 a 1,7 mil ton/dia; com uma média em torno de 450 ton/dia.

Depois de produzida, o primeiro destino da torta em 72,8% é o pátio para estocagem e compostagem; o restante, 27,2% vai direto para aplicação em campo por não possuir um pátio que comporte a estocagem da torta.

Nesse pátio, pilhas de torta de filtro de dimensão média de 3 metros de altura (72,7%) por 20 metros de comprimento (66,7%) são formadas e estocadas por um tempo de permanência de aproximadamente 30 dias (54,5%) (Figura 4). Essas pilhas são assim mantidas até secarem e durante esse processo um trator passa semanalmente revolvendo as pilhas (81,8%).

A essas pilhas, em 63,6% dos casos é adicionado cinzas em quantidades variáveis e em alguns casos adicionam também calcário, fertilizante nitrogenado e cama de frango (Figura 5).

E antes desse material ser aplicado no plantio, em 72,8% são feitas algumas das diversas análises físico-químicas da torta como pH, temperatura, teores de cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S) (Figura 6).

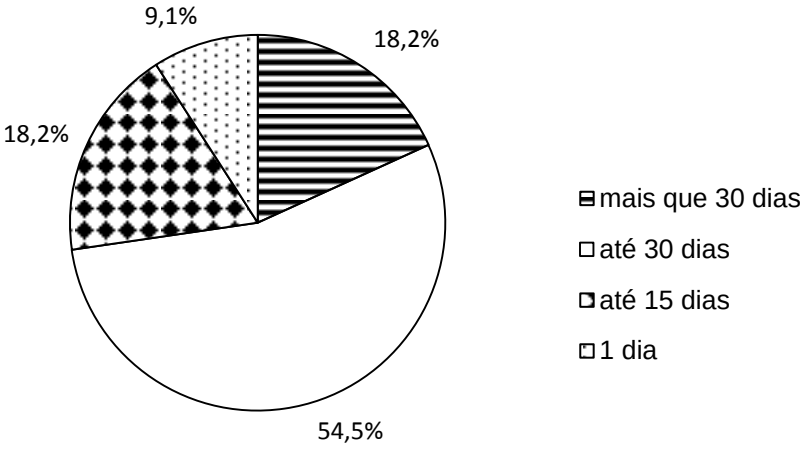

Figura 4 - Tempo médio de permanência da torta de filtro nos pátios das Usinas analisadas.

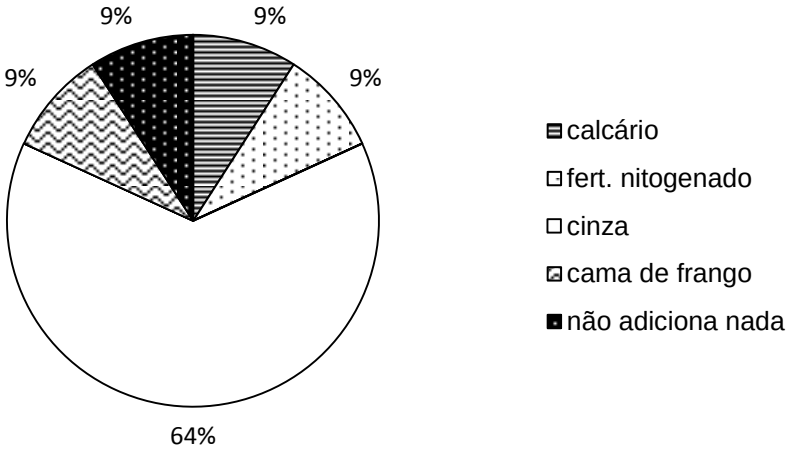

Figura 5 - Resíduos adicionados às pilhas de torta de filtro.

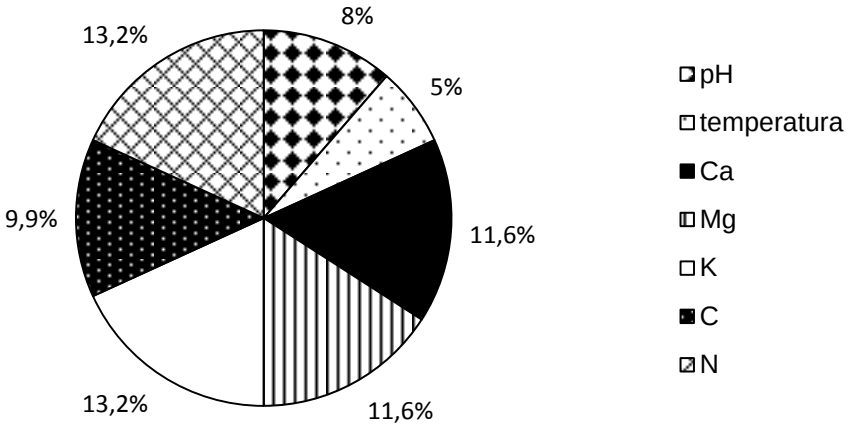

Figura 6 - Análises físico-químicas realizadas no resíduo torta de filtro antes de ser utilizada no plantio.

As doses de torta de filtro usualmente utilizadas no plantio da cana-de-açúcar de acordo com os trabalhos de Nunes Junior et al. (1988), Cardozo et al. (1988), Donzelli e Penatti (1997), Nardin (2007), foram semelhantes as doses aplicadas encontradas com questionário, variando entre 20 e 40 Mg ha^{-1} para aplicação nos sulcos (72,7%) e uma dosagem de 40 a 50 Mg ha^{-1} para aplicação na área total (81,8%).

Com essa aplicação, em 100% dos casos foi observado um melhor desenvolvimento e uma melhor produtividade da cana-de-açúcar após o uso da torta de filtro.

Era esperado um maior número de respostas por parte das usinas, para o questionário proposto. No entanto, apesar de não representativo, as respostas representam o procedimento padrão das usinas em relação ao uso da torta de filtro, e foi importante para orientar a pesquisa, e direcionar o experimento de amostragem de GEE, abordando todos os processos em que a torta de filtro é envolvida, como o estudo da torta quando em pilhas, assim como, o tempo estimado para as coletas, e as doses aplicadas nos sulcos de plantio da cana-de-açúcar.

Além desse direcionamento, o questionário permitiu o retorno das usinas quanto ao uso e benefícios oriundos dessa aplicação, no caso, todas as usinas observaram um melhor desenvolvimento e produtividade da planta com o uso desse “fertilizante”.

3.4 Caracterização da torta de filtro

As análises químicas para a caracterização da torta de filtro da Usina Costa Pinto foram realizadas nas amostras utilizadas no início da montagem dos experimentos, recém-coletada das pilhas de torta no pátio. Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1. Essas características, entretanto, podem variar bastante, de acordo com a variedade da cana, tipo de solo, maturação, processo de clarificação do caldo, dentre outros, como citado anteriormente.

Essas análises foram realizadas com a finalidade de caracterização inicial da torta e permitiu observar as possíveis alterações do material quando em decomposição, para assim talvez, indicar se há condições necessárias para a presença de microrganismos nesse substrato. Foram realizadas análises de pH, macro e micronutrientes.

Tabela 1 - Características físico-química média da torta de filtro do presente trabalho comparando com demais trabalhos de caracterização da torta

Variáveis	Presente estudo*	Referências	
		DEMATTÊ, et al., 2005*	MEUNCHANG, et al., 2005†
pH ($CaCl_2$)	4,6	-	7,7
C total (%)	29,4	11,1	-
N total (%)	1,7	0,9	1,8
C/N	17,6	12,7	14,0
P (%)	0,3	1,2	1,0
K (%)	0,1	0,4	0,4
Ca (%)	0,8	1,0	7,1
Mg (%)	0,1	0,1	0,4
S (%)	0,0	0,1	-
Resíduo mineral (%)	18,5	-	-
Umidade (%)	67	-	-
B (mg/kg)	1,0	-	-
Cu (mg/kg)	11,0	-	1,9
Fe (g/kg)	6,4	-	0,8
Mn (mg/kg)	195,0	-	257,0
Na (mg/kg)	57,0	-	-
Zn (mg/kg)	21,0	-	51,0

* = Análises do material orgânico em umidade natural; † = amostras secas ao ar para um teor de umidade de 10%.

O pH obtido inicialmente também foi inferior aos encontrados na literatura, mas condizente com a maioria dos solos (pH entre 4,0 e 8,5) em climas mais úmidos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Com exceção para os resultados de carbono e nitrogênio total, cobre e ferro, as demais variáveis médias físico-químicas foram inferiores quando comparados à outros estudos.

Relacionando com demais trabalhos que caracterizaram a torta de filtro (RIBEIRO et al., 1979; DEMATTÊ et al., 2005; MEUNCHANG et al., 2005; BUSATO, 2008; FRAVET et al., 2010), os resultados obtidos com essa pesquisa tanto para macro, quanto micronutrientes foram inferiores aos encontrados na literatura, com exceção do Ferro, que foi aproximadamente 800 vezes maior que o trabalho de Meunchang et al. (2005).

3.5 Quantificação das emissões de gases do efeito estufa (GEE)

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Estimativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010) indicam aumento significativo na área plantada nos próximos 10 anos, passando a cobrir uma área de 12,9 milhões de hectares com produção estimada de 893 milhões de toneladas.

Contudo, a ausência de informações sobre o impacto da expansão do cultivo da cana-de-açúcar sobre as emissões de GEE, se torna indispensável entender a importância da reciclagem da torta de filtro no condicionamento do solo e o impacto das emissões de GEE provenientes de todo setor produtivo.

3.5.1 Amostragem de GEE proveniente da torta de filtro quando em pilhas

Para realização do experimento, foi montado em uma área nas proximidades do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (CENA/USP) 5 pilhas de torta de filtro com aproximadamente 360 kg cada (Figura 7), na tentativa de simular as pilhas de torta de filtro estocadas na usina, sendo o experimento cerca de 200 vezes menor. As câmaras possuem dimensão de base: 1 x 1,5 x 0,4 metros; e de tampa: 1 x 1,5 x 0,6 metros.

O experimento durou 14 dias com duas coletas semanais, metade do tempo estimado de permanência das pilhas de torta nos pátios das usinas (cerca de 30 dias).

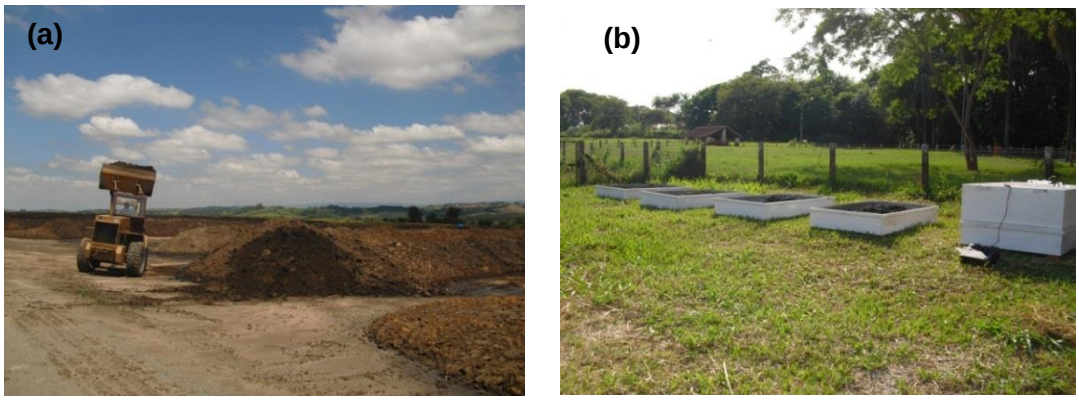

Figura 7 - Pilhas de torta de filtro. (a) Pátio de compostagem da torta de filtro na Usina Costa Pinto; (b) experimento montado em uma área nas proximidades do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (CENA/USP).

Para cada tratamento foi analisado a emissão dos gases de efeito estufa, medindo a alteração das concentrações de CO_2, N_2O e CH_4 no interior das câmaras de incubação. As amostras de GEE foram coletadas em seringas do tipo BD de nylon, com volume de 20 mL. A amostragem foi realizada em intervalos de tempo pré-estabelecidos de 0, 10, 20 e 30 minutos. Simultaneamente, em cada dia de amostragem, foram feitas medições de temperatura do ar no interior da câmara e pressão atmosférica. Para as medidas de temperatura, utilizaram-se termômetros simples de mercúrio.

3.5.2 Quantificação do fluxo de GEE provenientes da pilha de torta de filtro

As análises foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

A determinação das concentrações de CO_2, N_2O e CH_4 foi realizada por cromatografia gasosa no equipamento Shimadzu GC-2014®. Os gases CO_2 e N_2O são detectados por ECD (Electron Capture Detector), enquanto que o CH_4 é detectado por FID (Flame Ionization Detector). O fluxo de cada GEE foi calculado pela alteração linear das concentrações em função do tempo de incubação, de acordo com a equação (1):

$$\textbf{Fluxo} = (d\,[GEE]/\,dt) \times (Vh/A) \times ((1-e/P)/VM) \qquad (1)$$

Onde:

(d[GEE]/ dt) = alteração da concentração do GEE em função do tempo (mol gás mol^{-1} s^{-1});

(Vh) = volume da câmara utilizada na amostragem (m^3);

(A) = área da câmara (m^2);

(1-e/P) = pressão de água/pressão atmosférica na câmara (kPa/kPa);

(VM) = volume molar da câmara (m^3 mol^{-1}).

Para a avaliação das emissões diárias de CO_2, N_2O e CH_4 provenientes do solo, foi obtido o valor médio das cinco câmaras e calculada a emissão total de cada GEE durante toda a avaliação, utilizando a integração das curvas, obtendo-se então a quantidade de GEE emitida no período.

3.5.3 Conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente

Para a obtenção do balanço geral do GEE, foi realizada a conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 equivalente (CO_2 eq). Esta conversão é necessária, visto que cada GEE possui um PAG diferente. A estimativa do cálculo dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 eq, está apresentada nas equações (2) e (3).

$$\mathbf{CO_2\ eq\ (N_2O) = N_2O * (44/28) * 298}^{a} \quad (2)$$

$$\mathbf{CO_2\ eq\ (CH_4) = CH_4 * (16/12) * 25}^{a} \quad (3)$$

Onde:

N_2O = fluxo de N_2O

CH_4 = fluxo de CH_4

(44/28) = relação entre o peso molecular do N_2O e do nitrogênio

(16/12) = relação entre o peso molecular do CH_4 e do carbono

298 = potencial de aquecimento global do N_2O em relação ao CO_2

25 = potencial de aquecimento global do CH_4 em relação ao CO_2.

[a] Valores de referência baseados no International Panel on Climate Change - IPCC (2007).

3.6 Amostragem de GEE proveniente do solo após aplicação da torta de filtro

Para o levantamento das emissões de gases de efeito estufa da torta, assim como sua caracterização, a Usina Costa Pinto destinou uma área na qual foi simulada a aplicação de torta de filtro nos sulcos de plantio.

Foram traçadas 5 linhas de plantio, com profundidade de 30 cm ao longo das quais foram distribuídos um tratamento controle (sem torta de filtro) e 3 tratamentos com as dosagens equivalentes a 15, 25, e 35 Mg ha^{-1}, todos com 5 repetições, dispostas ao acaso, de acordo com teste estatístico elaborado pelo programa SISVAR (Figura 8).

A dose de torta de filtro usualmente aplicada nos sulcos de plantio é de 25 Mg ha^{-1}, sendo assim, com esse experimento objetivou-se avaliar se com uma

dose menor ou maior, altera ou potencializa a emissão dos principais gases de efeito estufa.

Para se avaliar os tratamentos, seguiu-se o equivalente de 70 cm de comprimento da câmara (Figura 9), com dimensões de base: 70 x 45 x 20; e de tampa: 70 x 45 x 7.

Dessa forma, para se calcular o equivalente da dose 15 Mg ha^{-1} divide-se 15.000 kg por 8.333 m (1 ha = 8.333 metros lineares), resultando em 1,8 kg/m linear. Portanto, em 1 metro, utilizar-se-ia 1,8 kg para a dose 15 Mg ha^{-1}, como o tamanho em comprimento da câmara é de 0,7 metros, fez-se o equivalente, obtendo o resultado de 1,20 quilogramas. Assim como para a dose 15 Mg ha^{-1}, foi calculado para as demais dosagens. O equivalente da dose 25 Mg ha^{-1} é 2,10 quilogramas; e da dose 35 Mg ha^{-1} é 2,90 quilogramas.

O experimento durou 56 dias com 14 coletas de GEE, sendo realizadas 3 coletas na primeira semana; 2 coletas semanais durante 4 semanas; e 1 coleta por semana por mais 3 semanas.

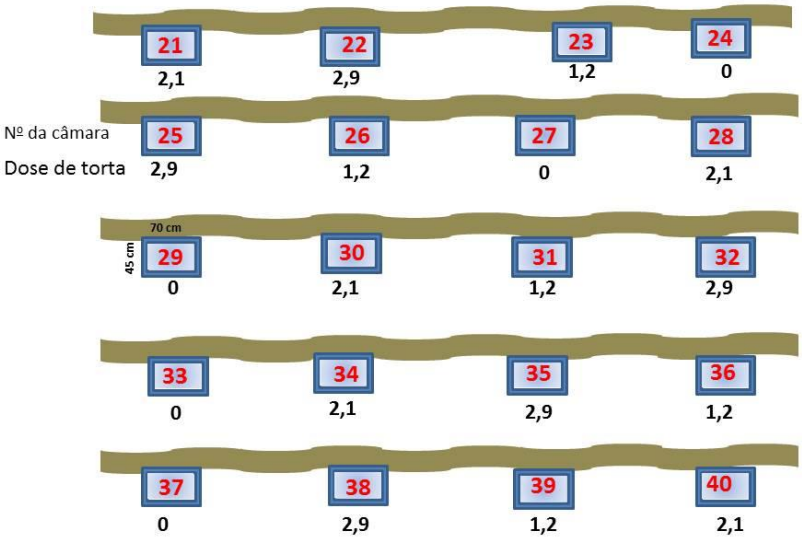

Figura 8: Croqui esquematizando a disposição das bases das câmaras no campo.

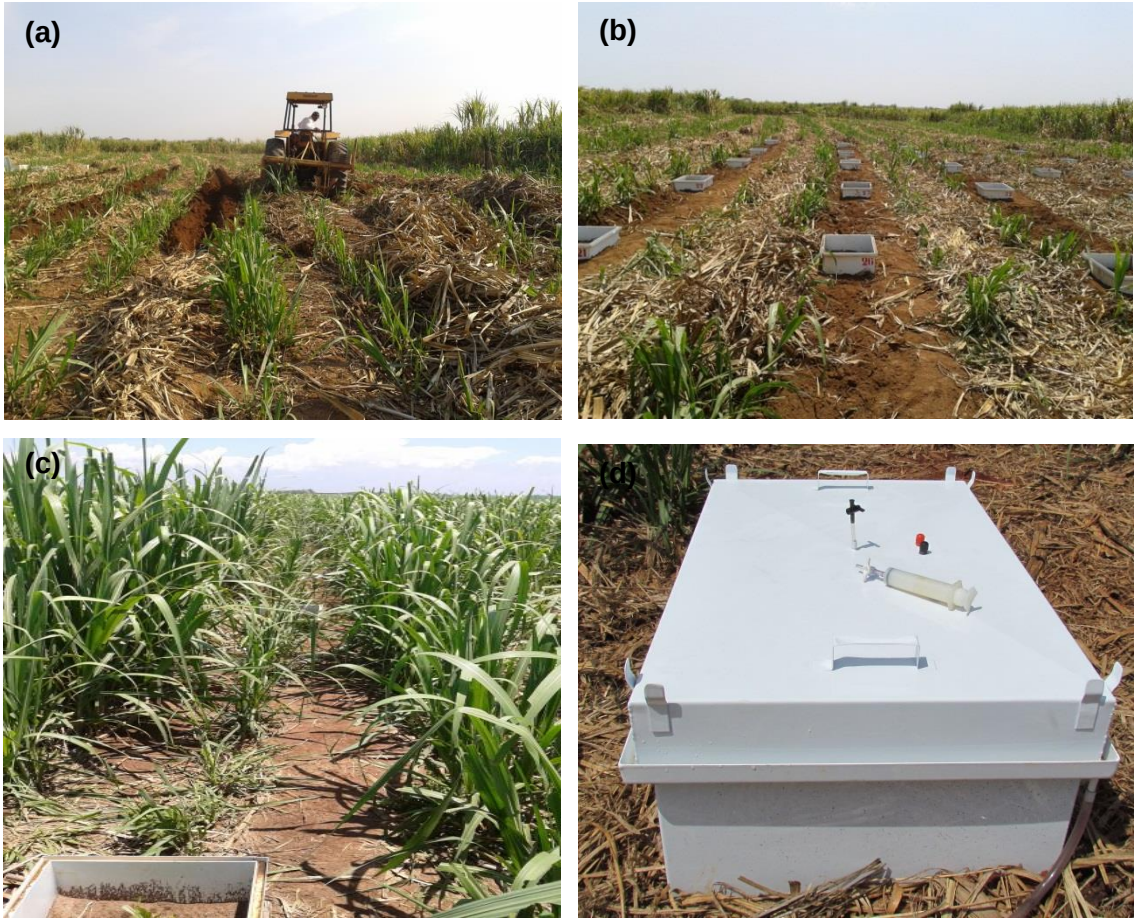

Figura 9 - Instalação do experimento e coleta de gases. (a) Abertura dos sulcos por meio de trator; (b) instalação das câmeras no dia da montagem do experimento; (c) local do experimento após dois meses de instalação; (d) câmara e seringa utilizadas para a coleta de gases.

A montagem dos componentes no sulco de plantio (Figura 10) seguiu-se de acordo com o usualmente aplicado pela usina. Sendo primeiro aplicado a torta de filtro, por cima deste, toletes de cana-de-açúcar, fechando o sulco com aproximadamente 10 cm de solo.

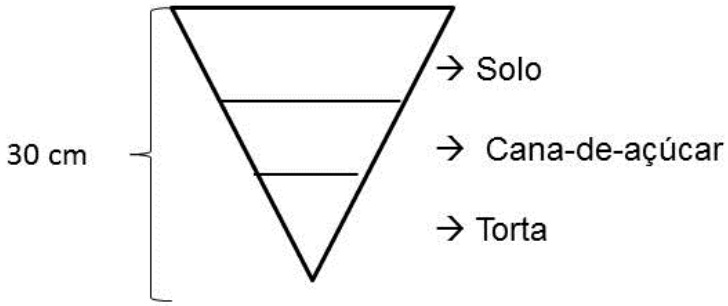

Figura 10 - Esquema representando sulco de plantio.

As análises de GEE provenientes do experimento, o fluxo de cada gás e a conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente, seguiu-se de acordo com o relatado para o estudo com pilhas de torta de filtro. Após a conversão em CO_2 equivalente foi realizada a conversão em Carbono equivalente. Este cálculo foi feito dividindo o resultado obtido do CO_2 equivalente por 3,17. O valor 3,17 é resultado da divisão da massa molar do CO_2 pela massa atômica do Carbono.

Em seguida, foi calculado o fator de emissão da dose usualmente aplicada, 25 Mg ha^{-1}, e as demais doses utilizadas neste trabalho para N_2O em função da aplicação de nitrogênio no solo na forma de torta de filtro. Este cálculo levou em consideração a dose de torta aplicada no solo (2,10 quilogramas) e o conteúdo de nitrogênio presente na torta (1,7 %).

3.7 Avaliação da decomposição da Torta de filtro no solo: “Litter bags”

A torta de filtro, como um material orgânico, quando aplicada nos sulcos de plantio, sofre também o processo de decomposição, com ataque sucessivo de microrganismos e, consequente liberação/imobilização de nutrientes, beneficiando o crescimento das plantas. Foi então estudado o processo de decomposição da torta de filtro nessa etapa de aplicação no plantio de cana-de-açúcar, analisando no decorrer do processo a variabilidade de seus constituintes químicos e da comunidade microbiana presente nesse material.

O experimento de decomposição com os “litter bags” tem como objetivo amostrar a taxa de decaimento e o fator ambiental interferente no processo de decomposição. A decomposição da torta de filtro resulta no aumento do teor de matéria orgânica do solo, e por consequência, a liberação de seus nutrientes para a biota, mantendo dessa forma a fertilidade e produtividade do solo.

A decomposição depende de fatores físicos, químicos e biológicos; como a temperatura, umidade; teores de lignina, celulose; e organismos decompositores (MASON, 1980; SEASTEDT, 1984).

Os benefícios da matéria orgânica para a qualidade do solo são inúmeros, de valor inestimável, visto que mantem a estabilidade do solo por meio da proteção da superfície contra erosão, aumenta a imobilização e a liberação de nutrientes, e a estocagem do carbono terrestre (GREGORICH et al., 1997).

3.7.1 Amostragem dos “litter bags”

O método consistiu em colocar quantidades de torta de filtro em sacos de nylon costurados a mão com abertura de malha 5 mm e dimensões de 20 cm, que permitia a entrada da macrofauna.

A macrofauna ou “engenheiros do ecossistema” assim denominados por Lavelle et al. (1997), influenciam tanto a porosidade do solo quanto a disponibilidade de nutrientes para os outros organismos através das atividades de escavação, ingestão e/ou transporte de material mineral e orgânico do solo.

O experimento teve início em novembro de 2012, início do período chuvoso e quente. A torta utilizada nos “litter bags” foi recém-coletada das pilhas no dia do experimento. Essa recém-coleta foi necessária a fim de se assemelhar as condições reais utilizadas quando aplicada nos sulcos de plantio. Além do que, de acordo com Tanner (1981), a secagem do material antes de experimentos de degradação dificulta a taxa de decomposição, tornando-a mais lenta. Um conjunto de amostras foi destinado às análises, para obter as concentrações inicias do material.

Os sacos, devidamente identificados foram dispostos em 4 linhas de plantio, com profundidade de 10 cm seguindo os mesmos tratamentos da torta de filtro quando aplicada aos sulcos de plantio, ou seja, foram distribuídos os 3 tratamentos com as dosagens equivalentes a 15, 25 e 35 Mg ha^{-1}, todos com 5 repetições, dispostas ao acaso, de acordo com teste estatístico elaborado pelo programa SISVAR (Figura 11).

Para se avaliar os tratamentos, seguiu-se o equivalente de 20 cm de comprimento do “litter bag” (Figura 12), com dimensões aproximadas de 20 cm de comprimento por 8 cm de diâmetro. Para se calcular o equivalente da dose em 20 cm dos “bags”, seguiu-se a mesma sequência de cálculos do experimento da torta de filtro aplicada nos sulcos de plantio.

Dessa forma, para se calcular o equivalente da dose 15 Mg ha^{-1} divide-se 15.000 kg por 8.333 m (1 ha = 8.333 metros lineares), resultando em 1,8 kg/m linear. Portanto, em 1 metro, utilizar-se-ia 1,8 kg para a dose 15 Mg ha^{-1}, como o tamanho em comprimento do “litter bag” é de 0,2 metros, fez-se o equivalente, obtendo o resultado de 360 gramas. Assim como para a dose 15 Mg ha^{-1}, foi calculado para as demais dosagens. O equivalente da dose 25 Mg ha^{-1} é 600 gramas; e da dose 35 Mg ha^{-1} é 840 gramas.

Os adubos orgânicos apresentam geralmente baixa concentração de micronutrientes, mas como são aplicados em grande quantidade, o aporte ao solo pode ser significativo, sendo assim, quando necessário, utiliza-se fertilizante para aumentar a solubilidade dos micronutrientes pela formação de complexos solúveis. A liberação de fósforo (na forma orgânica) e nitrogênio (na forma proteica) ocorrem gradativamente, por mineralização e por ataque de microrganismos no solo, propiciando alto aproveitamento pelas plantas; e o terceiro nutriente, potássio, essencial e obrigatório para manter o adequado desenvolvimento das plantas (SANTOS et al., 2010).

Nos intervalos de 2, 4 e 6 meses depois de enterrados, o material foi recolhido cuidadosamente, retirando solo e raízes que se infiltraram nos “bags”. Foram retirados 15 sacos por coleta (Figuras 11 e 12). Rapidamente as amostras foram enviadas ao laboratório para pesagem e em seguida submetido às análises químicas e biológicas. Algumas análises do sexto mês de coleta não foram possíveis serem realizadas.

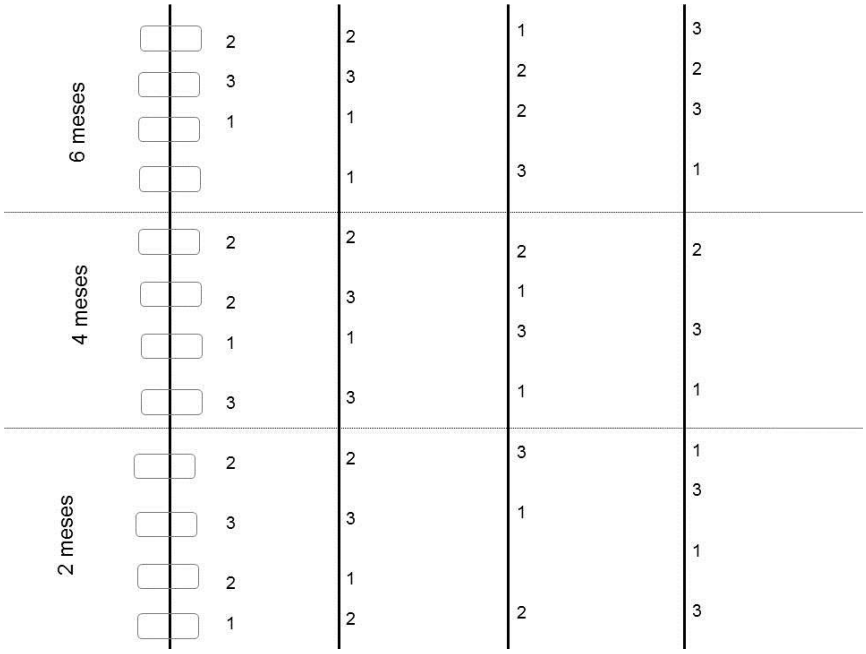

Figura 11 - Croqui do experimento esquematizando a disposição dos “litter bags” no campo. Os números de 1 a 3 representam os tratamentos: (1) dose 15, (2) dose 25, e (3) dose 35 Mg ha^{-1} de torta de filtro.

Figura 12 - Instalação do experimento “litter bags”. (a) “Litter bags” devidamente identificados; (b) abertura dos sulcos e deposição dos “bags”; (c) local do experimento sinalizado; (d) “litter bag” sendo retirado, indicado pela seta.

Segundo o modelo exponencial simples utilizado por Jenny et al. (1949) e Olson (1963), foram estimadas as taxas instantâneas de decomposição (coeficiente K) e os tempos necessários para decomposição de 50% e 95% do material. O seguinte experimento condiz com o modelo exponencial segundo Precott (2005) por ser um estudo de curta duração.

Para o cálculo do coeficiente de decomposição (K) foi utilizada a seguinte fórmula matemática (4):

$$\mathbf{K = - \ln (1 - K')} \quad (4)$$

Onde:

K’ = razão entre a biomassa final pela inicial.

O cálculo do tempo (em anos) necessário para decomposição de 50 e 95% do material seguiram as fórmulas matemáticas (5) e (6):

$$\mathbf{T_{50\%} = 0{,}693/K} \quad (5)$$

$$\mathbf{T_{95\%} = 3/K} \quad (6)$$

3.7.2 Análises biológicas dos “litter bags”

A comunidade microbiana “invisível” presta serviços ambientais de valor inestimável já citado anteriormente como: ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica do solo, atua na estruturação e agregação do solo, entre diversas outras funções, contribuindo com o equilíbrio dos ecossistemas.

As análises biológicas realizadas tiveram por objetivo amostrar a parte viva da matéria orgânica, a biomassa microbiana da torta, estimar a atividade metabólica, por meio da atividade enzimática, e observar o modo como ela apresenta-se no ambiente.

Entender a atividade dos microrganismos é necessário para se avaliar as alterações ambientais, decorrentes de perturbações promovidas pelo desequilíbrio ecológico e variações no total de matéria orgânica do solo ocasionadas pelo manejo, deste modo, a comunidade microbiana funciona como bioindicador das práticas de manejo, sugerindo serem um parâmetro de diagnóstico de qualidade do solo a fim de mitigar os impactos causados por atividades agrícolas.

3.7.2.1 Biomassa Microbiana

Das análises biológicas, a biomassa microbiana foi realizada no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). O princípio do método presume que a fumigação (esterilização parcial) das amostras com clorofórmio lesa a membrana plasmática e a parede celular, quando presente, dos microrganismos sem afetar a matéria orgânica não viva.

Para quantificar a biomassa microbiana, seguiu-se o método proposto por Vance et al. (1987), no qual, duas amostras de 10 g de torta separadas em fumigadas e não-fumigadas (3 repetições), foram incubadas por 24h a -0,03 MPa com clorofórmio purificado, e então submetidas à extração com K_2SO_4 0,5 M,

centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm, e posteriormente filtradas com seringas de Teflon Millipore contendo tela de Silk Screem tratada previamente com K_2SO_4 0,5 M.

A biomassa microbiana foi então determinada pela estimativa feita a partir da extração e quantificação do C das amostras fumigadas e não-fumigadas após 24h. E para a determinação do Carbono e Nitrogênio dessa biomassa foi analisado o teor de C microbiano (por Célula de infravermelho não dispersivo) e N microbiano (por quimiluminescência) ambos medidos pelo equipamento Shimadzu - TOC - VCPN.

3.7.2.2 Análises Enzimáticas

A análise enzimática e a de polimorfismo de fragmento de restrição terminal (T-RFLP) foram realizadas e acompanhadas no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa.

A atividade das fosfatases ácida e alcalina das amostras foi determinada pelo método colorimétrico segundo TABATABAI (1994). As amostras foram incubadas em banho-maria por uma hora em solução tamponada de *p*-nitrofenil fosfato e tolueno a 37°C.

Para analisar a atividade da β-glicosidade, também segundo Tabatabai (1994), as amostras foram incubadas por uma hora a 37°C em solução tamponada de p-nitrofenil β-D-glicosídeo e tolueno.

A leitura foi realizada medindo a intensidade da coloração amarela por espectrofotômetro a 400 nm. A concentração de *p*-nitrofenol liberado após reação enzimática foi estimada a partir de uma curva padrão com os níveis de 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100 µg *p*-nitrofenol. Os resultados obtidos foram expressos em µg *p*-nitrofenol h^{-1} g^{-1}, e as médias submetidas ao teste de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.7.2.3 Extração do DNA, PCR e T-RFLP

Extração do DNA e PCR

A extração do DNA da torta de filtro foi realizada com o *Kit de Extração Power Soil DNA* (MoBIO) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A

qualidade e quantidade aproximada de DNA foram conferidas em gel de agarose 1,2% e também usando o aparelho *Qubit 2.0 Fluorometer* (Life Technologies, Foster City, CA) *com o Kit Genuine Axygen Quality*.

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os iniciadores (*primers*) específicos aos Domínios de interesse (Tabela 2).

Tabela 2 - *Primers* utilizados no trabalho com suas respectivas sequências e grupo alvo

Primer	**Especificidade**	**Sequência**	**Domínios**
BAC63f	16S rRNA	5'- AGG CCT AAC ACA TGC AAG TC - 3'	*Bacteria* Total
BAC1087r		5'- NEDCTC GTT GCG GGA CTT ACC CC - 3'	
ARCAr3F		5'- TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA - 3'	*Archaea* Total
ARCAr927R		5'- HEXCCC GCC AAT TCC TTT AAG TTT C - 3'	
FUNITS1f	ITS4	5'- 6FAMCTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3'	*Fungi* Total
FUNITS4		5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'	

A amplificação das amostras foi realizada contendo um mix de PCR: tampão de reação a 1 X, 2 µL de DNA total, 200 µM dNTPs, 2,0 mM de $MgCl_2$, 2,5 U de *Taq polimerase*, 20 µg de BSA, iniciador BAC63f (10 µM) a 200 nM, iniciador BAC1087r NED (10 µM) a 200 nM, iniciador FUNITS1f FAM (20 µM) a 400 nM, iniciador FUNITS4 (20 µM) a 400 nM, iniciador ARCAr3f (20 µM) a 400 nM, inicidor ARCAr927R HEX (20 µM) a 400 nM, e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 50 µL de reação.

O produto de PCR foi obtido em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e extensão final

a 72°C por 10 minutos. Para a verificação da amplificação dos fragmentos, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, utilizando como padrão molecular *Low mass* DNA *Ladder* (Promega Corporation).

Purificação, Digestão, Precipitação e Desnaturação

Após verificar a amplificação, realizou-se a purificação dos fragmentos, seguindo protocolo descrito pelo fabricante do kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification* (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK). Então, os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática em *master mix* (Applied Biosystem, Foster City, CA) que apresenta sítio de corte C_CGG. A mistura para digestão foi preparada para um volume final de 20 µL contendo 400-100 ng de produto da PCR purificado, 20 U de enzima de restrição *Msp*I, 0,2 µL de BSA acetilado. A digestão foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 37°C por 3 horas, seguido de um período de inativação da enzima de 15 min. a 95 °C.

Os produtos da digestão foram precipitados e posteriormente aplicados em placa de sequenciamento, juntamente com o marcador de tamanho *ET550-R* (GE Healthcare) diluído em *Loading Solution* (Amersham Pharmacia Biotech®). O *mix* na placa foi submetido à desnaturação a 95°C por 5 min. e mantido no gelo até a corrida em sequenciador automático *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics/GE Healthcare®) (Figura 13), utilizando o conjunto de filtros *Genotyping filter set 2*. As condições da corrida foram: tempo de injeção de 45 segundos, tensão de injeção de 3 kV, tempo de corrida de 75 minutos e tensão de corrida de 10 kV.

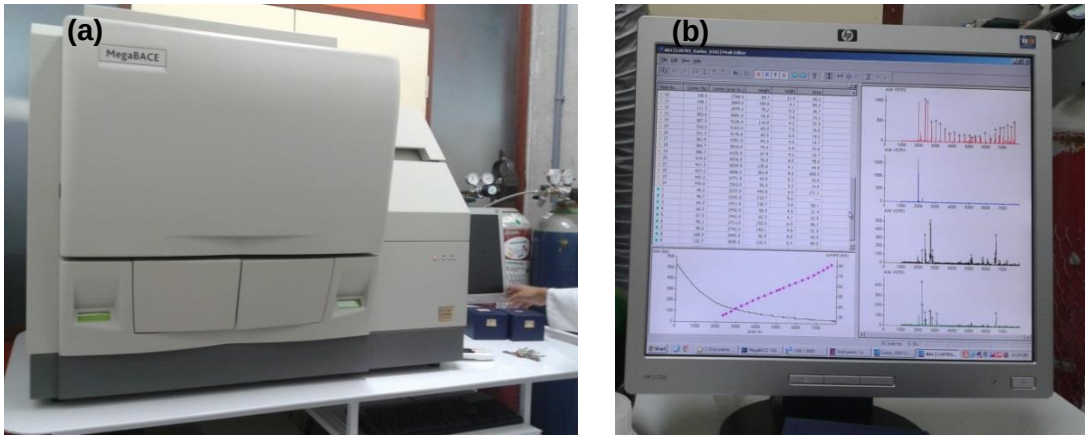

Figura 13 - Equipamento sequenciador. (a) Sequenciador automático utilizado *MegaBACE 1000 DNA Analysis System*; (b) eletroferogramas gerados do sequenciamento.

Análise dos fragmentos de restrição terminais

O resultado gerado foi analisado no programa *Gene Marker 2.4.1Trial Version* (SoftGenetics, State College), após alteração do canal de cores para "*MegaBACE channels*" e aplicação manual de matriz espectral gerada pela análise do sinal de cada corante fluorescente separadamente (Fluorescent Amidite Matrix Standard, Applied Biosystems®).

A análise de fragmentos terminais foi realizada entre 50 e 550 pb. Picos com intensidades menores que 40 unidades de fluorescência foram excluídos, para minimizar os efeitos do ruído, e todos os picos foram checados manualmente. A abundância relativa de cada pico foi calculada como a proporção de todas as alturas de pico na amostra antes das análises estatísticas. Na Figura 14 é apresentado um esquema simplificado da técnica de T-RFLP. A análise dos dados foi feita no programa Primer 6 (Plymounth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

A partir disso, foi possível visualizar o perfil dos Domínios de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* presente nas amostras.

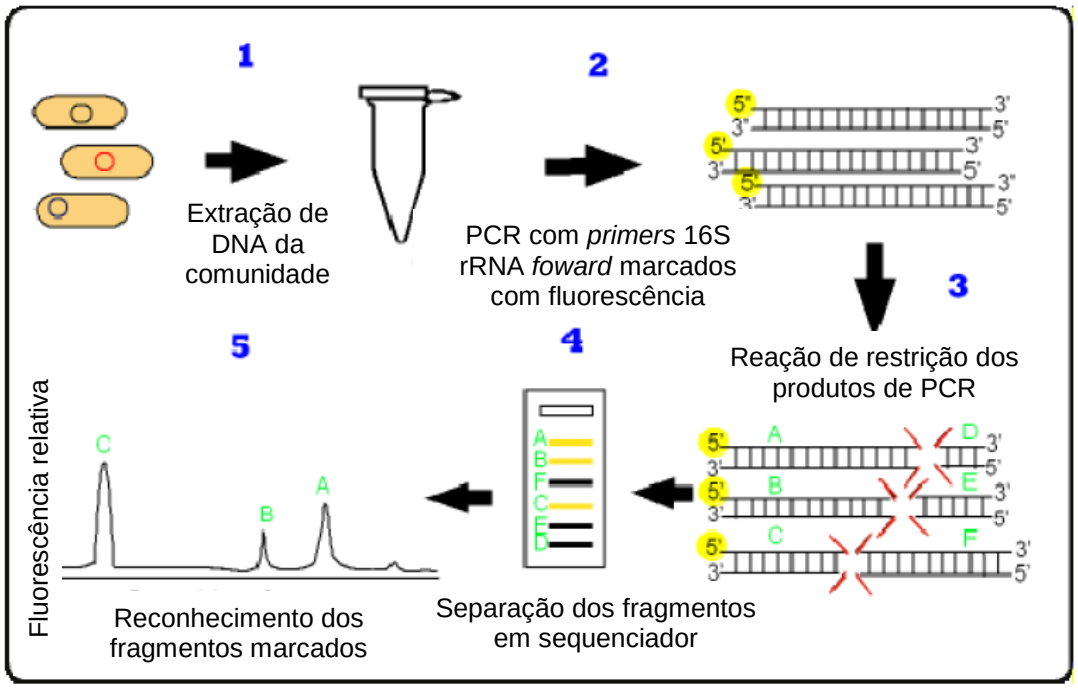

Figura 14 - Esquema ilustrativo dos passos do T-RFLP. 1) Extração de DNA da amostra; 2) Amplificação do gene de interesse por PCR, utilizando *primer* marcado com fluorescência; 3) Produtos de PCR marcados com fluorescência. Despois da purificação segue para a etapa de digestão com enzimas de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. 4) Os fragmentos são separados em sequenciador; 5) Gerando um perfil baseado no comprimento dos fragmentos (GRÜNTZIG et al., 2002).

3.7.3 Caracterização química da torta de filtro nos “litter bags”

Para as análises de carbono e nitrogênio as amostras de solo foram secas em estufa à 45º C e homogeneizadas, e foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pelo método de via seca por combustão no aparelho denominado LECO CN 2000, conforme descrito por Nelson e Sommers (1982).

As análises de N inorgânico ($N\text{-}NH4^{+}$ e $N\text{-}NO3^{+}$) foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), usando um sistema automático de injeção de fluxo contínuo (FIA STAR, FOSS) (RUZICKA; HANSEN, 1981).

As análises químicas de pH, macro e micronutrientes foram realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo da ESALQ-USP.

As análises de bromatologia (lignina, celulose, hemicelulose e proteína), foram realizadas no laboratório de Zootecnia da ESALQ-USP.

3.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas considerando cinco repetições em cada um dos tratamentos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade para caracterizar as diferenças entre os tratamentos. Foram calculados os desvios padrão para as perdas de massa seca e dos elementos bromatológicos nos diferentes tempos de decomposição.

Foram realizados testes de correlação entre a biomassa e a atividade enzimática, MDS, análise de riqueza, teste ANOSIM e SIMPER dos fragmentos de restrição terminal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Emissões de GEE provenientes das Pilhas da Torta de Filtro

4.1.1 Fluxos de C-CO_2

Baseando-se no questionário, o período para o experimento seria de 30 dias, tempo estimado da torta estocada no pátio. O tempo inicial estimado para o experimento era o correspondente tempo de permanência das pilhas nos pátios, no entanto, com as chuvas e o não escoamento da água nas câmaras, mesmo com furos na parte inferior das caixas para a drenagem, o experimento teve que ser interrompido. Sendo assim, o experimento se deteve por 14 dias com 6 coletas de GEE.

A emissão média acumulada foi de 96,58 g C-CO_2 m^{-2} h^{-1}. Foi utilizado o teste Shapiro-Wilk (W) para analisar a normalidade na distribuição dos dados, que considera dados normais um valor maior que 0,95, e, no presente trabalho, foi observado uma distribuição normal dos dados (Tabela 3).

Na Figura 15 é possível visualizar a emissão diária em g C-CO_2 m^{-2} h^{-1}, após a montagem do experimento; pode-se observar um pico maior de emissão com 8 dias, possivelmente relacionado com um período entre chuvas.

4.1.2 Fluxos de N-N_2O

O fluxo médio acumulado de N-N_2O provenientes do monte de torta foi muito baixo, com emissão de 0,42 mg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Foi aplicado o teste W para análise dos dados, nos quais não apresentou normalidade (Tabela 3).

As emissões diárias em mg N-N_2O m^{-2} h^{-1} pode ser observado na Figura 15, em que nota-se uma maior emissão diária na primeira semana do experimento. Possivelmente esse maior pico observado esteja relacionado também com o período entre chuvas.

4.1.3 Fluxos de C-CH_4

A emissão média acumulado de C-CH_4 foi de 17,3 mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. Assim como para os fluxos de N-N_2O, os dados de C-CH_4 não apresentou normalidade (Tabela 3)**.**

O fluxo de emissão diária do GEE pode ser observado na Figura 15**,** com uma variação baixa de emissão de 0,15 a 2,65 mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}, observando uma maior emissão nos últimos dias de coleta.

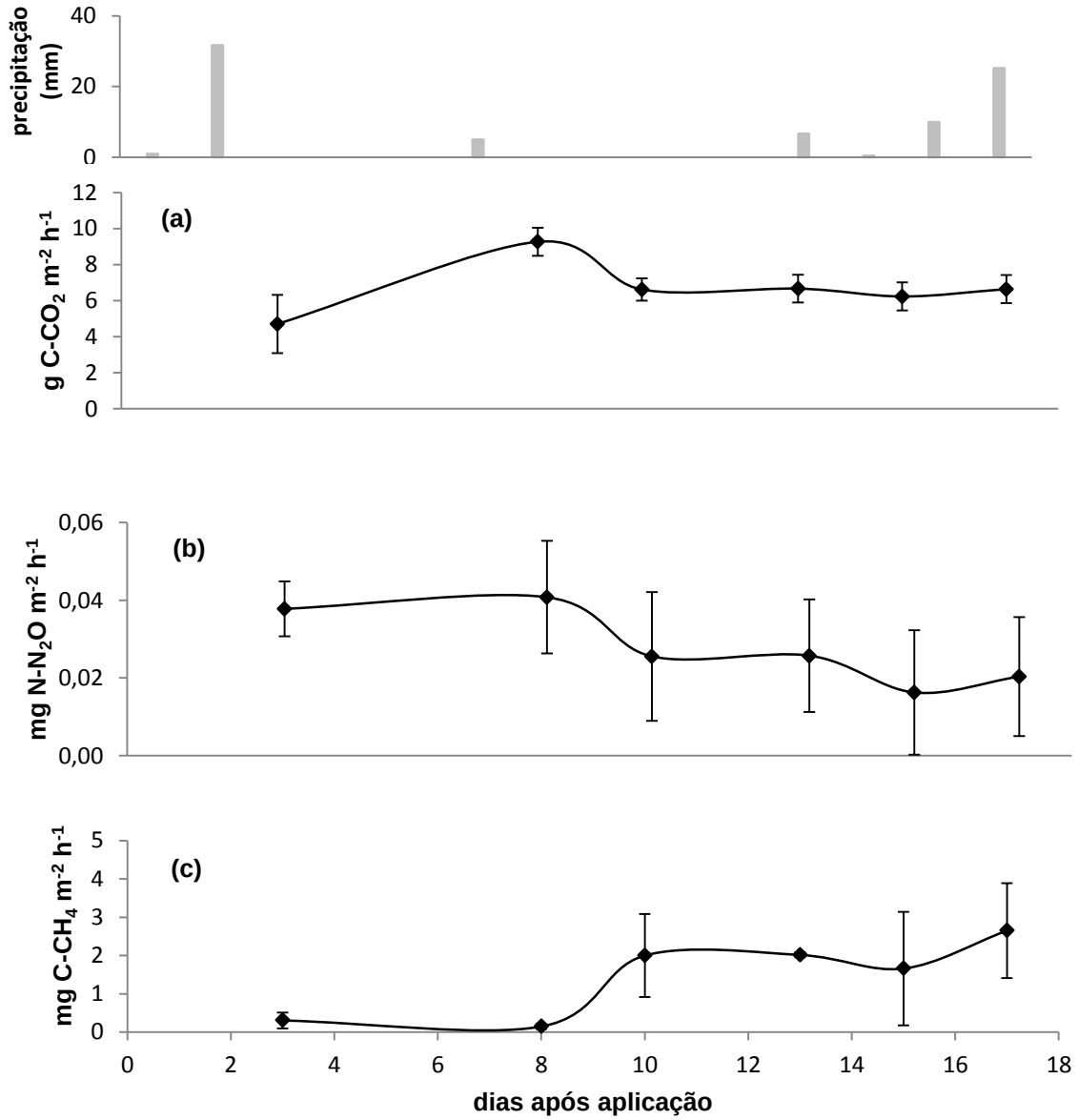

Figura 15 - Emissão diária dos GEE provenientes da torta de filtro nas pilhas, a partir da aplicação. (a) Fluxo médio de CO_2 (g C-CO_2 m^{-2} h^{-1}); (b) de N_2O (mg N-N_2O m^{-2} h^{-1}); (c) e de CH_4 (mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}). Média (n=5) ± desvio padrão. A figura superior representa a precipitação (mm).

Tabela 3 - Valores da estatística clássica aplicada aos fluxos dos GEE obtidos em experimento com pilhas de torta de filtro

Fluxos	Media [1]	Med. [2]	Mín. [3]	Máx. [4]	D.P. [5]	C.V. (%)[6]	Ass. [7]	Curt. [8]	Teste W[9]
$N\text{-}N_2O^{\dagger}$	0,03	0,03	0,00	0,06	0,02	58,1	-0,21	-0,95	0,89 Não
$C\text{-}CO_2^{\ddagger}$	6,69	6,55	2,69	9,75	1.61	24,0	0,01	0,80	0,95 Sim
$C\text{-}CH_4^{\dagger}$	1,46	1,25	0,08	4,26	1,31	89,8	0,93	-0,22	0,86 Não

[1] Média (n = 70); [2] Med. = mediana; [3] Mín. = mínimo; [4] Máx. = máximo; [5] D.P. = desvio padrão; [6] C.V.(%). = coeficiente de variação; [7] Ass. = assimetria; [8] Curt. = curtose; [9] teste W = Teste Shapiro-Wilks ($\alpha = 0,05$). † Fluxos de $N\text{-}N_2O$ e $C\text{-}CH_4$ em µg m^{-2} h^{-1}; ‡ Fluxos de $C\text{-}CO_2$ em g m^{-2} h^{-1}

4.1.4 Conversão dos fluxos de $N\text{-}N_2O$ e $C\text{-}CH_4$ em CO_2 equivalente

A conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 equivalente (CO_2 eq.) é necessária, visto que, como citado anteriormente cada GEE possui um potencial de aquecimento global diferente; ademais de permitir uma melhor comparação entre os fluxos.

Com os fluxos convertidos em CO_2 eq., é feito o cálculo da emissão total de GEE em um determinado sistema, somando ao fluxo de CO_2. No entanto, segundo Cerri et. al. (2004), os fluxos de $C\text{-}CO_2$ provenientes da decomposição da torta neste caso, não precisam entrar no cálculo, uma vez que este gás é cíclico no sistema sucroenergético, sendo reassimilado através da fotossíntese da cultura da cana-de-açúcar.

Na Tabela 4 estão apresentados os fluxos de $N\text{-}N_2O$ e $C\text{-}CH_4$ convertidos em CO_2 equivalente. Após a conversão, observou-se que a emissão diária de CH_4 foi de 138,42 kg CO_2 eq, representando 74,6 % das emissões totais provenientes da aplicação da torta de filtro quando em pilhas. As emissões de N_2O quando convertidas em CO_2 eq., representaram 25,4 % das emissões totais.

Tabela 4 - Conversão dos fluxos de $N\text{-}N_2O$ e $C\text{-}CH_4$ em CO_2 eq.

Emissões	GEE		
	$N\text{-}N_20$	$C\text{-}CH_4$	TOTAL
Emissão média acumulada (kg ha^{-1} dia^{-1})	0,42	17,3	-
Emissão média em CO_2 equivalente (kg CO_2 eq $ha^{-1}dia^{-1}$)	47,0	138,4	185,4

Apesar de positivos, os fluxos de N-N_2O provenientes das pilhas de torta demonstram que neste ambiente ocorre pouca formação de N_2O. Como o nitrogênio é essencial para decomposição de materiais orgânicos, provavelmente a quantidade de N presente na torta foi assimilada pelos microrganismos ou perdida por lixiviação, ocasionando baixa eliminação para atmosfera na forma de N-N_2O, quando comparado à emissão de CH_4.

Os valores positivos representam emissão de CH_4 para a atmosfera. De acordo com Le Mer e Roger (2001), os processos biológicos são responsáveis por aproximadamente 80% do CH_4 presente na atmosfera através da degradação da matéria orgânica em meios anaeróbicos. Vários fatores químicos e biológicos, com destaque, temperatura, pH e a disponibilidade de alimento, influenciam a produção desse gás.

O processo se inicia através do metabolismo de diversos microrganismos decompondo por processos aeróbios, e depois através de bactérias facultativas e/ou anaeróbias, que convertem os polímeros orgânicos mais complexos como carboidratos, proteínas e lipídios em monômeros como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, etc., que são então hidrolisados, fermentados e biologicamente convertidos em materiais orgânicos mais simples (LE MER; ROGER, 2001). Esses compostos mais simples são reduzidos através da fermentação metanogênica, a qual tem como produto final CH_4 e CO_2 (FERRY, 1999).

A quantidade de emissão diária esta baseada em um experimento pequeno, aproximadamente 200 vezes menor que o real, com 360 kg de torta de filtro colocadas nas câmaras na tentativa de simular as pilhas quando nos pátios; extrapolando para as pilhas no pátio, pode-se então tornar uma emissão preocupante.

Por ser um experimento de menor proporção, é necessária a repetição do estudo para que se possam confirmar os dados, e, o experimento sendo interrompido antes do tempo estimado, pode-se observar que nestas condições, a torta quando em pilhas, é muita rica em matéria orgânica, resultando em condições adequadas para a emissão de metano. Assim sendo, para diminuir o impacto referente a essa emissão ao ambiente, talvez como medida mitigadora fosse necessário diminuir o tempo que essas pilhas ficam expostas nos pátios antes da aplicação.

4.2 Emissões de GEE provenientes do solo com aplicação de torta de filtro

4.2.1 Fluxos de C-CO_2

No período do experimento, 56 dias com 14 coletas de GEE, as emissões acumuladas médias foram de 241,0; 317,1; 364,4; 392,7 g C-CO_2 m^{-2} h^{-1} respectivamente para os tratamentos controle, dose 15, dose 25 e dose 35 Mg ha^{-1} de torta de filtro.

Na Figura 16 é possível visualizar a emissão diária em mg C-CO_2 m^{-2} h^{-1} durante todo o experimento a partir da aplicação da torta nos sulcos; pode-se observar um pico de emissão inicial, possivelmente pela maior atividade microbiana (respiração) logo após a aplicação de torta de filtro dos “litter bags” nos sulcos de plantio. Depois mantem-se em uma faixa de 100 a 300 mg C-CO_2 m^{-2} h^{-1}, com pequenos aumentos, provavelmente relacionados aos picos de chuva.

Observou-se um aumento gradativo da emissão de C-CO_2 em mg C-CO_2 m^{-2} h^{-1} em função do aumento das dosagens (Figura 17). A menor dose aplicada, 15 toneladas de torta de filtro no sulco de plantio, apresentou a menor emissão. De maneira oposta, a maior dose aplicada apresentou a maior emissão acumulada. E para a dose usualmente aplicada nos sulcos de plantio, 25 Mg ha^{-1}, observou-se emissões intermediárias as doses aplicadas.

Ao se fazer o teste *Student Newman Keuls* (SNK) para comparar as médias de todos os tratamentos, foi observado diferença estatística de todos os tratamentos em relação ao controle. Para analisar a normalidade na distribuição dos dados, foi aplicado o teste Shapiro-Wilk (W), que considera dados normais um valor maior que 0,95, e, neste trabalho, foi observado uma distribuição não normal dos dados (tabela 5).

4.2.2 Fluxos de C-CH_4

Nos fluxos de C-CH_4 provenientes da aplicação da torta de filtro nos sulcos não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre as doses aplicadas.

Os valores médios de emissão acumulada de C-CH_4 foram de 14,21; 13,75; 19,47; 17,62 mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}, respectivamente para os tratamentos controle, dose 15; dose 25; e dose 35 (Figura 17).

A emissão diária do gás (mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}) após a aplicação da torta nos sulcos pode ser visualizada na figura 16; observou-se uma baixa emissão diária, e nas últimas coletas, provavelmente pelos baixos valores C-CH_4 até então obtidos, não atingiu o limite de detecção do aparelho, não permitindo a leitura das amostras.

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra e o teste SNK para comparação das médias, para esses dados foi observada uma distribuição não normal e não houve diferença estatística entre as médias (Tabela 5).

4.2.3 Fluxos de N-N_2O

Os fluxos de N-N_2O provenientes da aplicação da torta foram relativamente elevados, com valores médios de emissão acumulada de N-N_2O foram de 154,49; 229,05; 301,56; 276,12 mg N-N_2O m^{-2} h^{-1}, respectivamente para os tratamentos controle; dose 15; dose 25; e dose 35 (Figura 17).

Na Figura 16 é possível visualizar a emissão diária do gás (mg N-N_2O m^{-2} $h^{-1)}$ durante todo o experimento, com uma faixa de emissão de 0,10 a 0,30 mg N-N_2O m^{-2} h^{-1}, e alguns picos, podendo relacioná-los com dias chuvosos.

À vista disso, provavelmente uma parte de N presente na torta foi assimilada pelos microrganismos ou perdida por lixiviação, e uma quantidade considerável foi eliminada para atmosfera na forma de N-N_2O.

Neste caso, não foi observado diferença estatística quando aplicado o teste SNK, e a normalidade dos dados foi observado apenas no controle (Tabela 5).

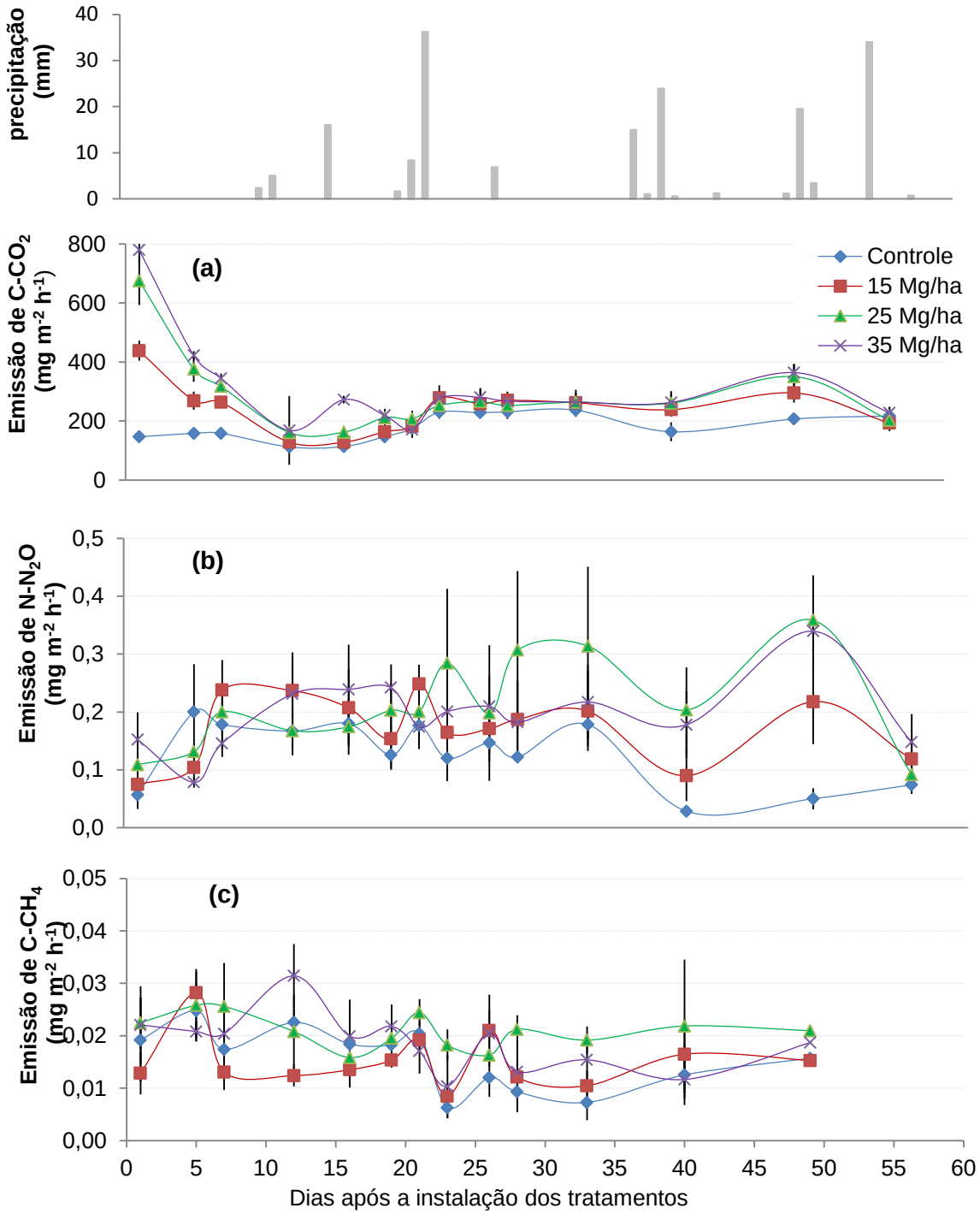

Figura 16 - Emissão diária dos GEE provenientes da aplicação de torta de filtro nos sulcos de plantio. (a) Fluxo médio de CO_2 (mg C-CO_2 m^{-2} h^{-1}); (b) de N_2O (mg N-N_2O m^{-2} h^{-1}); (c) de CH_4 (mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}). Média (n=20) ± erro padrão. Controle, 15, 25 e 35 Mg ha^{-1} de torta de filtro representam os tratamentos utilizados. A figura superior representa a precipitação (mm).

O fato de não apresentar diferença estatística e dados não normais, talvez possa ser entendido por uma diferença estreita entre as dosagens dos tratamentos, ou talvez o tempo de coleta não foi suficiente para se observar maiores emissões, refletindo em dados estatisticamente não diferenciados.

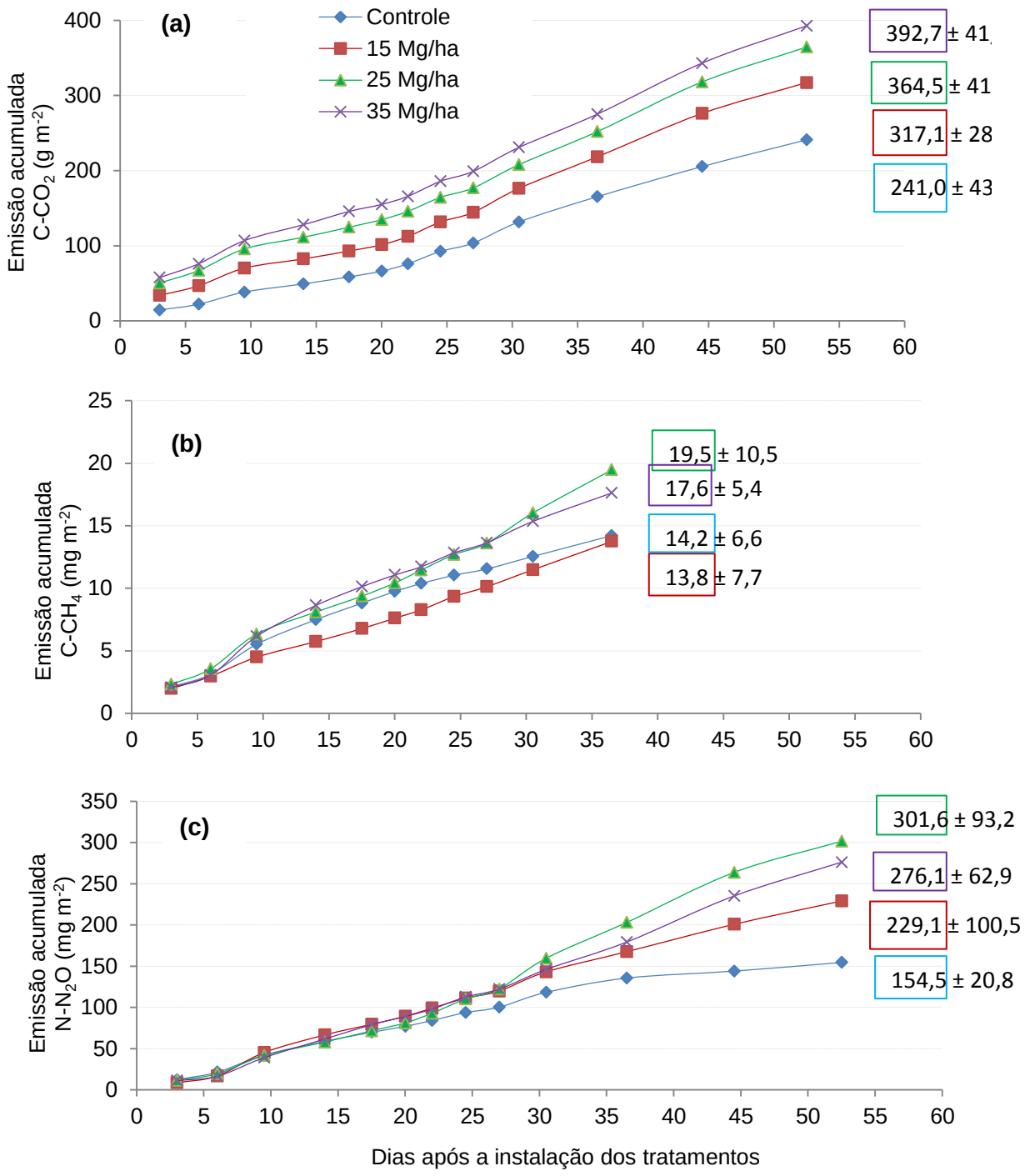

Figura 17 - Fluxos médios acumulados provenientes da torta de filtro. (a) C-CO_2 (g C-CO_2 m^{-2} h^{-1}); (b) C-CH_4 (mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}); (c) N-N_2O (mg N-N_2O m^{-2} h^{-1}). Média (n=20) ± erro padrão. Controle, 15; 25; e 35 representam os tratamentos utilizados.

Tabela 5 - Valores da estatística clássica aplicada aos fluxos dos GEE obtidos em experimento com aplicação de torta de filtro nos sulcos de plantio na Usina Costa Pinto em Piracicaba, SP. Controle, 15, 25 e 35Mg ha^{-1} de torta de filtro representam os tratamentos utilizados.

Trat.	Media [1†]	Med. [2]	Mín. [3]	Máx. [4]	D.P. [5]	C.V. (%)[6]	Ass. [7]	Curt. [8]	Teste W [9]
					$C\text{-}CO_2$ (mg m^{-2} h^{-1})				
Controle	180,33 b	172,78	95,23	319,05	57,93	32,12	0,61	-0,33	0,93 Não
15	240,67 a	249,12	66,36	525,24	89,73	37,28	0,69	1,22	0,94 Não
25	282,77 a	232,91	103,84	818,74	148,61	52,55	1,89	4,14	0,77 Não
35	308,68 a	289,57	119,91	926,58	172,47	55,87	1,86	3,58	0,81 Não
					$C\text{-}CH_4$ (μg m^{-2} h^{-1})				
Controle	0,02[ns]	0,01	0,00	0,05	0,01	68,97	0,87	0,60	0,61 Não
15	0,02	0,01	0,00	0,04	0,01	61,61	1,28	1,46	0,64 Não
25	0,02	0,02	0,00	0,07	0,01	57,38	1,95	5,68	0,77 Não
35	0,02[*]	0,02	0,00	0,05	0,01	62,47	0,80	-0,01	0,78 Não
					$N\text{-}N_2O$ (μg m^{-2} h^{-1})				
Controle	0,13 [ns]	0,12	0,00	0,52	0,09	66,29	1,57	5,27	0,96 Sim
15	0,17	0,13	0,00	0,47	0,13	72,93	0,68	-0,57	0,93 Não
25	0,21	0,14	0,01	0,66	0,18	84,88	1,46	1,07	0,80 Não
35	0,20	0,15	0,03	0,51	0,12	63,13	0,71	-0,50	0,78 Não

[1] Média (n = 70); [2] Med. = mediana; [3] Mín. = mínimo; [4] Máx. = máximo; [5] D.P. = desvio padrão; [6] C.V.(%). = coeficiente de variação; [7] Ass. = assimetria; [8] Curt. = curtose; [9] teste W = Teste Shapiro-Wilks ($\alpha = 0,05$); [†] = médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste SNK ($p > 0.05$); * = diferença estatística observada no teste F ($p > 0,10$) em relação ao tratamento Controle; ns = não significativo.

4.2.3.1 Fator de emissão de N_2O devido à aplicação da torta de filtro nos sulcos

O fator de emissão permite avaliar a quantidade de $N\text{-}N_2O$ emitida em função da dose de N aplicada no solo na forma de torta. O IPCC propõe que 1% do N adicionado ao solo é emitido na forma de $N\text{-}N_2O$.

No presente estudo, para calcular o fator de emissão do N aplicado na forma de torta inicialmente foi feita a integração das emissões de $N\text{-}N_2O$ em cada um dos tratamentos. Em seguida, a quantidade de $N\text{-}N_2O$ emitida no controle foi subtraída da quantidade de $N\text{-}N_2O$ emitida pela dose de torta de filtro. Considerando a dose de

torta aplicada no solo (2,10 quilogramas equivalente a 25 Mg ha^{-1}) e o conteúdo de nitrogênio presente na torta (1,7 %).

Assim, foi obtido fator de emissão de 0,39%, em kg $N\text{-}N_2O$ emitido por kg de N aplicado. Para a menor dose de torta aplicada (15 Mg ha^{-1}) o fator de emissão foi de 0,35%; e para a maior dose (35 Mg ha^{-1}) foi de 0,24%. Sendo assim, o fator médio de emissão obtido foi de 0,33%. Este fator de emissão foi significativamente menor àquele proposto pelo IPCC (1%) e não foram observados na literatura outros estudos avaliando os fatores de emissão de $N\text{-}N_2O$ devido aplicação de torta de filtro no solo.

Portanto, se torna fundamental a realização de outros estudos, sobretudo avaliando a aplicação de diferentes doses de torta de filtro, em diferentes condições de clima, solo e manejo da cultura da cana-de-açúcar.

4.2.4 Conversão dos fluxos de $N\text{-}N_2O$ e $C\text{-}CH_4$ em CO_2 equivalente

Na Tabela 6 estão apresentados os fluxos de $N\text{-}N_2O$ e $C\text{-}CH_4$ convertidos em CO_2 equivalente. Após a conversão, observou-se que as emissões diárias de $N\text{-}N_2O$ foram de 17.593,62; 20.598,53; 33.029,77; 28.546,23; 27.756,86 kg CO_2 eq., respectivamente para os tratamentos controle, dose 15; dose 25; e dose 35; representando 98,9; 98,9; 99,3; 99,4% das emissões totais provenientes da aplicação da torta de filtro nos sulcos de plantio. As baixas emissões de CH_4 quando convertidas em CO_2 eq., representaram apenas 1,1; 1,1; 0,7; 0,6% das emissões totais.

Tabela 6 - Conversão dos fluxos acumulados de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente e Carbono equivalente.

Emissões	Tratamentos	Fluxo de gases			
		C-CO_2	N-N_20	C-CH_4	TOTAL
Emissão acumulada (g m^{-2})	Controle	241,0	154,49	14,21	-
	15	317,1	229,05	13,75	-
	25	364,4	301,56	19,47	-
	35	392,7	276,12	17,62	-
Emissão média em CO_2 eq.(kg CO_2 eq ha^-)	Controle	-	722,8	4,7	727,5
	15	-	1.071,6	4,6	1.076,2
	25	-	1.410,9	6,5	1.417,4
	35	-	1.291,9	5,9	1.297,8
Emissão média em C eq.(Mg ha^-)	Controle	656,7	197,0	1,3	854,9
	15	864,0	292,0	1,2	1.157,3
	25	993,0	384,4	1,8	1.379,2
	35	1.070,1	352,0	1,6	1.423,7

Os valores positivos representam emissão de N_2O para a atmosfera. Os fluxos de N-N_2O provenientes da torta de filtro quando aplicada nos sulcos de plantio demonstram que neste ambiente ocorre formação de N_2O. Portanto, pode-se dizer que talvez a quantidade de N presente na torta tenha sido suficiente para ser assimilada pelos microrganismos e o restante foi eliminado para atmosfera na forma de N_2O.

Quando analisados diariamente, apesar de baixos valores, representam emissão de CH_4, indicando que a torta quando aplicada, não favorece as condições para emissão de CH_4 para a atmosfera. Porém, quando convertidas em CO_2 equivalente, observa-se a importância do PAG desse GEE.

Possivelmente a matéria orgânica da torta de filtro, quando aplicada nos sulcos, não foi suficiente para promover a decomposição e mineralização, de forma a liberar os nutrientes essenciais para o bom desenvolvimento da planta, já que a velocidade desse processo de mineralização está relacionada à recalcitrância do substrato e à resistência ao ataque microbiano (CAMARGO et al., 1997).

Portanto, como não houve diferença estatística entre as doses utilizadas, recomenda-se repetir o experimento utilizando dosagens com maiores diferenças.

4.3 Comparação dos fluxos de GEE proveniente da torta de filtro

O balanço total dos fluxos de GEE oriundos da torta de filtro indicou que a maior parte das emissões em mg C-CO_2 m^{-2} h^{-1}, mg C-CH_4 m^{-2} h^{-1} e mg N-N_2O m^{-2} h^{-1} ocorre na torta aplicada nos sulcos de plantio, provavelmente pelo maior tempo que permanece incubada no solo, fornecendo condições necessárias para a emissão.

Comparando a dose usualmente aplicada nos sulcos, 25 Mg ha^{-1}, com as pilhas de torta, observa-se uma emissão de C-CO_2 em gramas cerca de 4 vezes maior advindo da aplicação com a dose (364,4) em relação as pilhas (96,6); emissão de N-N_2O em mg cerca de 750 vezes maior da dose (301,6) em relação as pilhas (0,4), e uma emissão de C-CH_4 em mg maior da dose (19,4) em relação a pilha (17,3).

4.4 Balanço do Carbono emitido em Carbono equivalente

O balanço dos fluxos em porcentagem de carbono emitido (Tabela 7) torna-se interessante na tentativa de se comparar com a decomposição da torta de filtro no solo nos “litter bags” e analisar se há semelhança entre essas porcentagens do carbono emitido.

Tabela 7 - Conversão dos fluxos de C-CO_2, N-N_2O e C-CH_4 em Carbono equivalente.

Tratamentos	**Fluxo de gases**		
	CO_2	N_2O e CH_4	TOTAL
	Carbono eq. (%)		
15	5,62	2,57	8,19
25	5,21	2,91	8,12
35	4,64	1,74	6,38

Pode-se observar que a menor porcentagem de carbono equivalente emitido advém da maior dose, provavelmente pela maior área de contato referente à maior dose.

4.5 Decomposição da torta de filtro no solo

Na Tabela 8, estão apresentados os percentuais médios de decomposição da torta de filtro com diferentes períodos de permanência nos sulcos de plantio (2, 4 e 6 meses). Após 6 meses de experimento, com início em novembro, as estimativas do tempo necessário para a redução de 50% do peso do material em decomposição foram de 0,42; 0,61; 0,31; 0,68 anos; e as estimativas do tempo necessário para a redução de 95% foram de 1,82; 2,65; 1,36; 2,95 anos, respectivamente, para os tratamentos dose 15; dose 25; e dose 35.

Tabela 8 - Percentual médio de decomposição do material em cada coleta (com 2, 4 e 6 meses); K= razão instantânea de decomposição; n=20. E os tempos necessários para decomposição de 50% e 95% do material em anos. Para os tratamentos dose 15; dose 25; e dose 35.

Trat.	**Razão instantânea de decomposição (K)**			**Tempo para decompor 50% do material (anos)**			**Tempo para decompor 95% do material (anos)**		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6 **(meses)**
15	2,21	1,72	1,89	0,40	0,42	0,42	1,75	1,81	1,82
25	1,25	1,22	1,16	0,56	0,61	0,61	2,44	2,64	2,65
35	4,07	2,88	2,41	0,18	0,26	0,31	0,80	1,11	1,36

Os valores obtidos com a razão instantânea de decomposição foram comparados com o peso seco inicial, justificando assim uma razão instantânea de decomposição maior com 2 meses, diminuindo até o sexto mês.

Na Figura 18 observa-se o decaimento do peso seco da torta de filtro dos “litter bags” após 6 meses de experimento; um comportamento esperado diante de ações como a variabilidade climática, ataque de decompositores, entre outros.

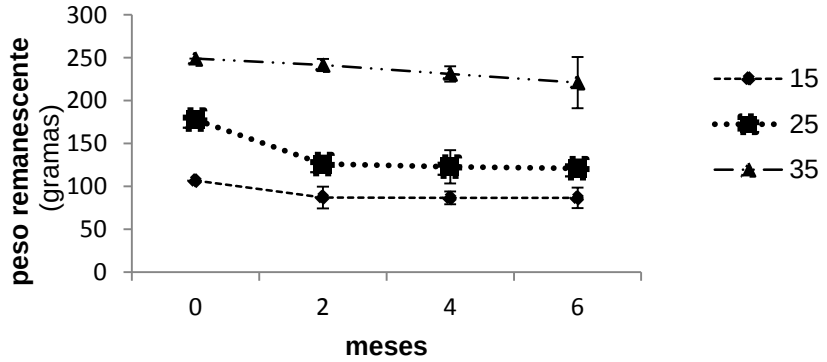

Figura 18 - Peso remanescente dos “litter bags” em decomposição após 6 meses de experimento. Média (n=5) ± desvio padrão. Doses 15, 25, e 35 Mg ha^{-1} de torta de filtro representam os tratamentos utilizados.

A decomposição é regulada pela interação de três grupos variáveis: as condições físico-químicas do ambiente (temperatura, umidade, sazonalidade e fatores pedológicos), a qualidade/composição do substrato (teores de lignina, celulose, compostos fenólicos, elementos minerais), e a comunidade decompositora (macro e microrganismos) (MASON, 1980; SEASTEDT, 1984).

No entanto, a importância destes fatores difere em escalas de tempo e espaço. Em âmbito global, condições climáticas têm sido os fatores que mais explicam variações nas taxas de decomposição, pelo fato de que condições de baixas temperaturas e estiagem agem diretamente sobre o metabolismo dos organismos decompositores, geralmente diminuindo suas atividades (LAVELLE et al., 1993).

Observando a Figura 19 nota-se inicialmente maior velocidade de decomposição dos constituintes orgânicos, diminuindo entre os meses até possivelmente uma estabilização.

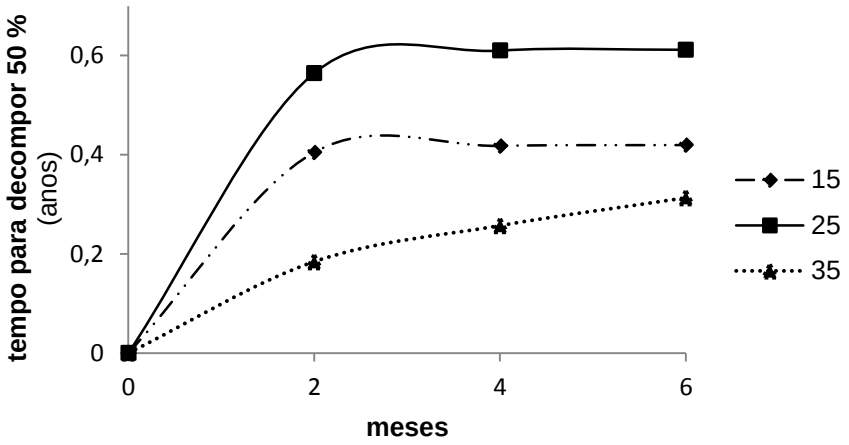

Figura 19 - Percentual médio de 50% de decomposição da torta de filtro dos “litter bags” em cada período de coleta com 6 meses de experimento. Média (n=5). Doses 15, 25 e 35 Mg ha^{-1} de torta de filtro representam os tratamentos utilizados.

4.5.1 Massa de carbono emitido (CO_2 e CH_4) e a perda de massa da torta de filtro

No que se refere a dose usualmente aplicada nos sulcos de plantio (25 Mg ha^{-1}), calculou-se a perda de massa da torta considerando 67% de umidade e 29% de carbono (Tabela 1). Uma vez que foram aplicados 200 g de carbono por câmara,

e emitidos 115 g C na forma de CO_2 e CH_4, e o tratamento controle (sem torta) emitiu 76 g C na forma de CO_2 e CH_4, conclui-se que foram emitidos 39 g de carbono provenientes da torta aplicada. Portanto, aproximadamente, 20% do carbono aplicado na forma de torta foram emitidos na forma de CO_2 e CH_4 em 56 dias.

No experimento de decomposição para a mesma dose de torta aplicada no sulco de plantio (25 Mg ha^{-1}), mostrou que em dois meses a perda de massa foi de aproximadamente 30%.

Essa diferença de perda de massa entre os experimentos pode ser atribuída a perda de outros elementos na forma gasosa (N, O, H) e lixiviação.

4.5.2 Qualidade da torta de filtro

A diminuição da biodegradação pode estar relacionada ao consumo dos hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis no início e posterior consumo dos hidrocarbonetos mais recalcitrantes.

Na Tabela 9, estão apresentadas a composição bromatológica, hemicelulose, celulose, lignina e proteína, da torta de filtro nos “litter bags” nos seis meses de experimento. No passar dos meses, o teor dos constituintes do resíduo orgânico foi diminuindo, podendo-se observar que, com 2 meses, diminuiu aproximadamente 50% da composição inicial.

Na Figura 20, com 4 meses de experimento, predominam-se em todos os tratamentos (dose 15; dose 25; dose 35) hemicelulose e lignina. A partir desse cenário pode-se inferir sobre a persistência da lignina devido a sua recalcitrância, relacionada ao seu alto peso molecular e estrutura química tridimensional, conferindo-lhe estabilidade e provavelmente a hemicelulose tenha se ligado a outras substâncias dificultando dessa forma sua decomposição.

Tabela 9 - Composição bromatológica (hemicelulose, celulose, lignina e proteína) em 100% de matéria seca do material em cada coleta, em quatro meses de experimento (inicial = 0, 2 e 4 meses). Para os tratamentos dose 15; dose 25; e dose 35.

Trat.	Hemicelulose			Celulose			Lignina			Proteína			
	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4	(meses)
	100% de matéria seca												
15	17	8,2	8,1	16	6,9	4,6	13	8,6	6,7	14	7,3	4,5	
25	17	9,9	9,7	16	6,6	5,5	13	7,5	6,6	14	9,4	5,1	
35	17	9,8	8,9	16	7,0	5,1	13	8,1	7,1	14	7,0	3,7	

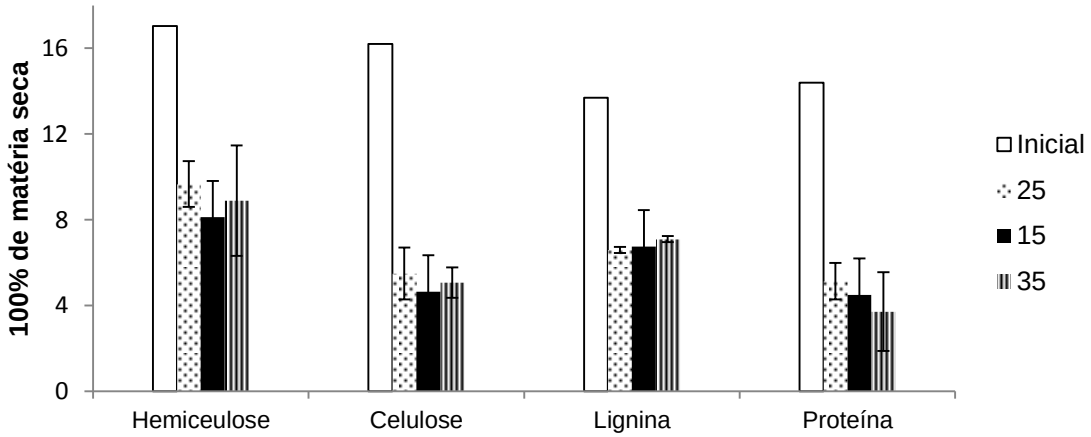

Figura 20 - Análise bromatológica (hemicelulose, celulose, lignina e proteína) inicial e após 4 meses de experimento da torta de filtro dos “litter bags”, expressos em 100% de matéria seca. Média (n=5) ± desvio padrão. Dose 15; 25; 35 representam os tratamentos utilizados (com 4 meses de experimento).

4.5.3 Caracterização química da torta de filtro

pH da torta de filtro

O pH do solo indica a quantidade de íon H^+ disponível na solução do solo. Quanto menor o valor do pH mais acidez, indicando quando necessário a correção da acidez e do aumento da saturação por bases (RAIJ et al., 1987). O pH obtido das amostras representa acidez da torta. O valor se mostra inferior aos encontrados na literatura, mas condizente com a maioria dos solos (pH entre 4,0 e 8,5) em climas mais úmidos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Liberação de carbono da torta de filtro

O carbono do solo se encontra principalmente na forma orgânica, em diversos compostos, e com diferentes graus de complexidade, constituindo a matéria orgânica do solo.

Com base na Tabela 10, os teores de carbono diminuíram de 29,4 a 5,4 até seis meses de decomposição para o tratamento 15; portanto, aproximadamente 81,6% do C deixaram à torta e foram incorporados nas camadas superficiais do solo e/ou dissipado para a atmosfera. A liberação desse elemento está correlacionada com a perda de massa seca. Para o tratamento 25 o teor de carbono diminuiu de 29,4 a 6,9, ou seja, 76,5% do carbono deixou o material e foi incorporado ao solo e/ou dissipado; e no tratamento 35 passou de 29,4 de C inicial, diminuiu para 6,4, 78,2% deixou a torta e foi incorporado e/ou dissipado para a atmosfera. À medida que a decomposição da matéria orgânica continua o C é oxidado para CO_2 e liberado na atmosfera.

Tabela 10 - Média de resultados (n=5) de análise química (pH e macronutrientes) dos “litter bags”, nos tempos inicial, 2, 4 e 6 meses após o início do experimento. Para os tratamentos dose 15; dose 25; e dose 35.

Trat.	**Tempos**	**pH**	**C**	**N**	**P_2O_5**	**K_2O**	**Ca**	**Mg**	**S**
		($CaCl_2$)				**(%)**			
	Inicial	4,6	29,4	1,7	0,30	0,08	0,80	0,09	0,04
15	2	6,3	15,2	1,2	0,71	0,11	0,98	0,10	0,06
	4	6,3	6,8	0,7	0,89	0,11	1,41	0,11	0,06
	6	6,4	5,4	0,6	0,91	0,12	1,53	0,11	0,06
25	2	6,4	17,6	1,4	0,72	0,12	1,00	0,11	0,07
	4	6,4	7,4	0,7	0,98	0,12	1,44	0,12	0,08
	6	6,4	6,9	0,62	1,02	0,12	1,55	0,12	0,08
35	2	6,4	13,8	1,0	0,74	0,12	1,03	0,11	0,07
	4	6,4	7,1	0,6	1,03	0,12	1,44	0,12	0,08
	6	6,4	6,4	0,54	1,12	0,12	1,55	0,12	0,08

Liberação de nitrogênio da torta de filtro

O nitrogênio provavelmente é um dos nutrientes mais limitantes para a produtividade e suas concentrações médias indicaram uma pequena diminuição

durante o tempo de decomposição. Os níveis de nitrogênio no solo mudam constantemente devido aos processos biológicos e químicos.

A diminuição relativa nos teores de N pode ser atribuído, além da perda mais rápida de C e de massa seca à i) volatilização/desnitrificação, ii) lixiviação, iii) erosão do solo, iv) extração pela cultura (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Quando se adiciona um resíduo orgânico ao solo a população microbiana é estimulada, absorvendo os nutrientes minerais de acordo com suas exigências e aumentando a respiração. Dependendo da relação C/N do material adicionado, pode ocorrer esgotamento do nitrogênio se for uma relação alta, ou liberação do nutriente se o resíduo tiver uma relação baixa (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Comumente, a maior parte de N no solo, de 24 a 37%, encontra-se na forma orgânica, como proteínas, peptídeos, quitina, quitobiose, peptideoglicano, ácido nucléicos, bases nitrogenadas e ureia. Apenas uma pequena parte deste N é mineralizável no solo; cerca de 2 a 5% é mineralizado a cada ano (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A mineralização do N é uma das maiores fontes desse elemento no solo. Inicia-se através da ação de enzimas proteolíticas, que quebram as proteínas, liberando peptídeos e aminoácidos, que são metabolizados no interior das células, produzindo NH_3 e demais compostos orgânicos intermediários. Em seguida o NH_3, em condições aeróbias converte-se a NO_3^- por meio da nitrificação como citado anteriormente, disponibilizando N para o solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na Tabela 11 estão apresentados os teores de N inorgânico da torta de filtro nos “litter bags” nos seis meses de experimento. No passar dos meses, o teor de $N\text{-}NH_4$ diminui 62, 47, 38% para os tratamentos dose 15; dose 25; e dose 35, a menor dose diminuiu menos que a maior dose. Para $N\text{-}NO_3$ houve aumento aproximadamente de 19, 20, 17 vezes em relação ao tempo inicial, para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

Esse comportamento pode ser explicado pelo processo de nitrificação já citado, no qual ocorre a oxidação aeróbia de amônio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-) por bactérias quimioautotróficas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Tabela 11 - Teor de N mineral (em µg g torta $^{-1}$) do material em cada coleta, nos seis meses de experimento. Para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

Tratamentos	**Inicial**		**2 meses**		**4 meses**		**6 meses**	
	$N\text{-}NH_4$	$N\text{-}NO_3$	$N\text{-}NH_4$	$N\text{-}NO_3$	$N\text{-}NH_4$	$N\text{-}NO_3$	$N\text{-}NH_4$	$N\text{-}NO_3$
	µg g torta $^{-1}$							
15	10,37	0,21	8,51	0,22	7,05	2,01	6,44	3,97
25	10,37	0,21	8,24	0,25	6,31	2,22	4,89	4,13
35	10,37	0,21	8,32	0,23	5,57	2,43	4,02	3,56

Pode-se visualizar pela Figura 21 o comportamento do teor do N mineral da torta de filtro dos “litter bags” em decomposição durante o experimento.

.

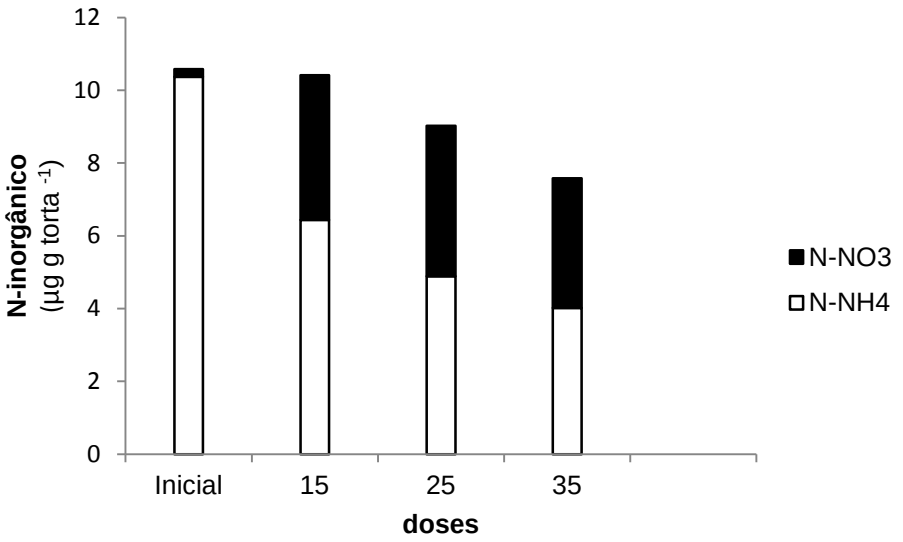

Figura 21 - Teor de N mineral (µg g torta $^{-1}$) dos “litter bags” em decomposição no tempo inicial e depois com 6 meses de experimento. Média (n=5). Dose 15; 25; 35 representam os tratamentos utilizados.

O conhecimento da dinâmica do N é importante para entender e buscar o suprimento do fertilizante nitrogenado na quantidade e de acordo com a necessidade quando requerido, a suprir a demanda da cultura.

Liberação de macronutrientes da torta de filtro

Foi notado um decréscimo na relação C/N e alterações não significativas nos teores de K, Mg e S ao longo do tempo de decomposição. A maior imobilização

observada nos macronutrientes pode relacionar-se com a menor disponibilidade desses elementos no solo (Tabela 10).

No presente trabalho, a torta de filtro foi caracterizada inicialmente com uma relação C/N de 17,6, diminuindo até o sexto mês de experimento. Esta relação é considerada baixa (substrato rico, de rápida decomposição), e serve de orientação e contribui aos efeitos da fertilidade do solo.

O potássio (K) é um dos macronutrientes mais essenciais para o desenvolvimento das plantas, participando em diversos processos enzimáticos, porém, os teores encontrados são considerados baixos para a fertilidade do solo (RAIJ et al., 1987).

A correção do solo pelo uso de calcário dolomítico é uma das principais fontes de Magnésio (Mg) no solo (SIQUEIRA NETO, 2006). O Mg está presente na molécula de clorofila presente nas plantas, explicando assim a sua deficiência nas amostras de torta de filtro.

O enxofre (S) no solo é originário principalmente da MOS e por meio de fertilizantes sulfatados, sua deficiência pode ser explicada pela não aplicação de fertilizantes na área.

O fato destes elementos, citados a cima, não terem sofrido alterações significativas, possa estar relacionado ao baixo teor dos nutrientes nas amostras de torta.

Com base nos teores de P apresentados na tabela 10, é possível notar um aumento, chegando a triplicar o seu teor após quatro meses de experimento nas doses. Como para N, esse aumento está envolvido na atividade dos microrganismos, sendo que as bactérias do solo têm uma alta demanda por fósforo.

O acúmulo de fósforo pode ser atribuído à deposição de resíduos culturais (BAYER; BERTOL, 1999). Sendo a disponibilidade deste elemento altamente influenciada pelo pH e quantidade de matéria orgânica no solo (RAIJ et al., 1987). Apesar do aumento do fósforo no decorrer do tempo de experimento, os encontrados neste estudo foram inferiores aos dados encontrados na literatura (SILVA, 2005; SIQUEIRA NETO, 2006).

Para o Ca, houve um pequeno aumento no seu teor (Tabela 10). O seu aumento pode estar relacionado com a presença desse elemento nas estruturas vegetativas, sendo abundantes nas raízes, folhas e ramos, que são de lenta decomposição (MALAVOLTA, 2006).

Liberação de micronutrientes da torta de filtro

Nos resultados das análises de Cu, B, Mn, Zn, Fe e Na houve um aumento dos teores ao longo da decomposição. As concentrações de Cu, B, Na e Fe triplicaram; a de Mn aumentou de duas a três vezes; e a de Zn quadruplicou (Tabela 12). O aumento nos teores, provavelmente esta relacionada à degradação da massa seca, principalmente do C.

Dificilmente é observado deficiências de ferro nos solos; geralmente está presente nos solos em concentrações maiores do que qualquer outro nutriente. As plantas necessitam desse elemento em pequenas quantidades, atuando como catalisador na síntese da clorofila (BOOM, 2002).

O excesso de ferro é encontrado em solos de pH muito baixo ou com má drenagem, cenário condizente com esta pesquisa (pH 4,6 a 6,4). A toxicidade do ferro pode interferir na adsorção dos demais nutrientes, como o manganês, zinco, cobre, fósforo, cobalto e cálcio. Concentração abaixo de 60 ppm de matéria seca podem indicar uma deficiência na planta (BOOM, 2002). Outra hipótese que pode justificar o excesso de ferro seria a mistura com outros resíduos, como por exemplo, a cinza, que durante sua produção nas caldeiras, são queimados diversos produtos, dentre eles pneus.

O manganês é essencial na fotossíntese, e algumas atividades enzimáticas (BOOM, 2002). No solo os teores de Mn variam entre 20 a 3.000 mg/kg, com média de 60 mg/kg, o resultado obtido está dentro dessa faixa, mas com uma média superior ao encontrado por Lindsay (1979).

A ocorrência natural do B varia de 7 a 80 mg/kg, ou seja, neste trabalho, a torta está com déficit desse elemento, podendo prejudicar a divisão celular, o metabolismo de carboidratos e da água, a translocação de açúcares, e a síntese proteica da planta (BOOM, 2002).

A quantidade de Zn encontrada no presente estudo foi cerca de 70 vezes maior ao encontrado por Camargo et al. (2009). O zinco é um ativador enzimático, sendo essencial para a planta, pois controla a produção de importantes reguladores de crescimento. A sua função básica está relacionada ao metabolismo de carboidratos, proteínas, fosfatos e também à formação de auxinas, RNA e ribossomos (THORNE, 1957; DECHEN et al., 1991).

O cobre é essencial em muitos processos vegetais, como a fotossíntese, metabolismo proteico e de carboidratos. Foi encontrado um teor de cobre 4 vezes menor do que o encontrado no trabalho de Camargo et al. (2009). Talvez essa deficiência esteja relacionada ao alto teor de matéria orgânica, além do excesso de ferro e zinco encontrado, que pode ser prejudicial à assimilação de cobre (BOOM, 2002).

No caso do Na, o valor encontrado, foi aproximadamente metade do obtido por Giostri et al. (2009). O sódio pode substituir o potássio para algumas funções na planta, porém, níveis elevados podem ser considerados tóxicos para a planta (BOOM, 2002).

Tabela 12 - Média de resultados (n=5) de análise química (micronutrientes e sódio) do “litter bags”, sendo desenterrados dos sulcos de plantio nos tempos 2, 4 e 6 meses após o início do experimento. Para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

Trat.	**Tempos**	**Cu**	**Mn**	**Zn**	**Fe**	**B**	**Na**
				(mg/kg)			
	Inicial	11	195	21	6384	1	57
15	2	29	408	65	17186	3	192
	4	31	432	81	17881	3	195
	6	33	455	93	18072	3	197
25	2	33	417	69	17971	3	204
	4	36	503	84	20655	3	206
	6	38	562	96	22436	3	206
35	2	34	424	75	18112	3	205
	4	37	506	84	21215	3	208
	6	39	566	87	22954	3	208

Diante do exposto, foi notado um decréscimo apenas no teor de carbono e na relação C/N, em todos os outros nutrientes mesmo que em alguns casos não significativo foi observado aumento nos teores. De modo geral, o aumento nos teores provavelmente esta relacionada ao um início de degradação da massa seca, principalmente do carbono. Além do que a maior imobilização observada nos macronutrientes pode relacionar-se com a menor disponibilidade desses elementos no solo, e pelo fato do material contido em “litter bags”, sem revolvimento, favorecer a agregação e proteção da MOS contra a mineralização (Sá et al., 2001). Pode-se dizer também que os pequenos aumentos estejam relacionados aos fatores externos

como precipitações atmosféricas; atividade dos microrganismos; solos de pH muito baixo ou com má drenagem; entre outros.

4.5.4 Estrutura das comunidades microbianas total

4.5.4.1 Biomassa Microbiana

Foram determinados o carbono da biomassa microbiana (C-BM) e o nitrogênio da biomassa microbiana (N-BM). Os teores de C-BM teve incremento no início do estudo apresentando um máximo de biomassa microbiana aos dois meses com posterior decréscimo até o quarto mês de experimento. Da mesma forma, para os teores de N-BM houve aumento no início, com um máximo de biomassa aos 2 meses, seguido por decréscimo até o final do experimento (Tabela 13). O comportamento da biomassa microbiana foi semelhante ao de outros estudos (CONSTANTINI et al., 1998; TARAFDAR et al., 2001; ASSIS et al., 2003), isto é, um aumento da biomassa microbiana e consequentemente maior imobilização de nutrientes no início do estudo (até 2 meses).

Tabela 13 - Média de resultados (n=5) de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana dos “litter bags”, sendo desenterrados dos sulcos de plantio nos tempos inicial = 0, 2 e 4 meses após o início do experimento. Para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

Tratamentos	**C da Biomassa Microbiana**			**N da Biomassa Microbiana**			
	0	2	4	0	2	4	**(meses)**
	µg C g torta $^{-1}$			**µg N g torta $^{-1}$**			
15	563,30	693,79	544,34	65,23	93,17	36,59	
25	337,98	484,89	455,91	39,14	62,95	27,00	
35	241,41	257,45	221,84	27,96	29,78	19,88	

A variação da biomassa também pode ser explicada pelo período chuvoso, em que a umidade é considerada como um dos mais importantes fatores no ritmo da atividade biológica (LA ESCALA et al., 2000). O comportamento dessa variação da biomassa pode ser observado na Figura 22.

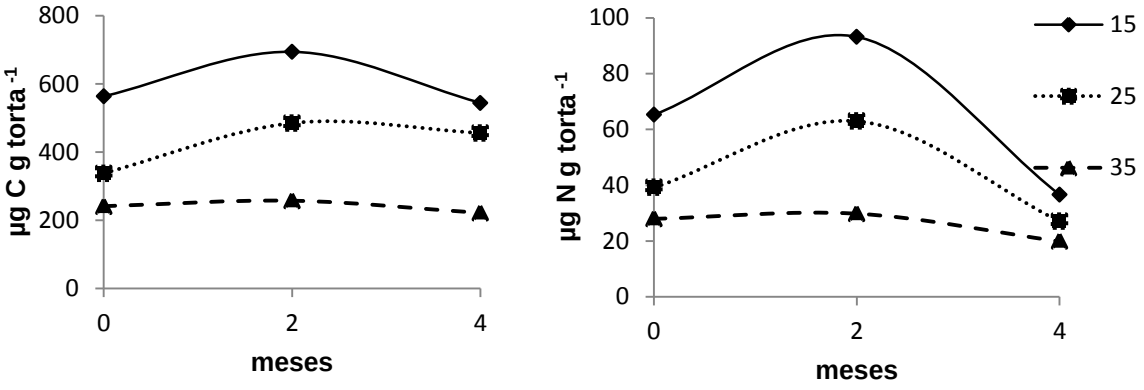

Figura 22 - Biomassa microbiana de carbono e nitrogênio (µg g torta $^{-1}$). Para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

A importância principal da determinação da biomassa microbiana se refere na competição pelos nutrientes, entre os microrganismos do solo e as raízes das plantas. Durante a decomposição de um material qualquer, os microrganismos utilizam os nutrientes do solo, imobilizando-os em sua biomassa, tornando-os indisponíveis para as plantas, mesmo que temporariamente (ASSIS et al., 2003).

Sendo assim, conhecer os processos microbianos é importante para o entendimento da ciclagem de nutrientes, dinâmica matéria orgânica, fluxo de energia do solo; a partir do qual, servirá para se adotar o adequado manejo do solo (SMITH; PAUL, 1990). Nesse sentido, a biomassa microbiana pode fornecer indicações sobre a qualidade e fertilidade do solo (DORAN et al., 1994).

4.5.4.2 Análise Enzimática

Foram determinadas as enzimas Fosfomonoesterase Ácida e Alcalina e β-Glicosidase expressas em µg p-nitrofenol/g torta.h (Tabela 14). Os teores das três enzimas analisadas apresentaram um máximo de atividade aos dois meses com posterior decréscimo até o quarto mês de experimento. O comportamento da variação da atividade enzimática pode ser observado na Figura 23.

Tabela 14 - Média da atividade das enzimas (fosfomonoesterase ácida, alcalina e β-Glicosidase), resultados (n=5) dos “litter bags”, sendo desenterrados dos sulcos de plantio nos tempos inicial = 0, 2, 4 meses após o início do experimento. Para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

Tratat.	**Fosfomonoesterase Ácida**			**Fosfomonoesterase Alcalina**			**β-Glicosidase**			
	0	2	4	0	2	4	0	2	4	**(meses)**
	µg p-nitrofenol/g torta.h									
15	147,6	338,4	334,9	302,0	569,9	314,3	264,8	573,9	346,96	
25	147,6	484,5	375,2	302,0	470,4	357,5	264,8	407,0	402,00	
35	147,6	275,7	274,6	302,0	440,3	314,0	264,8	542,6	379,35	

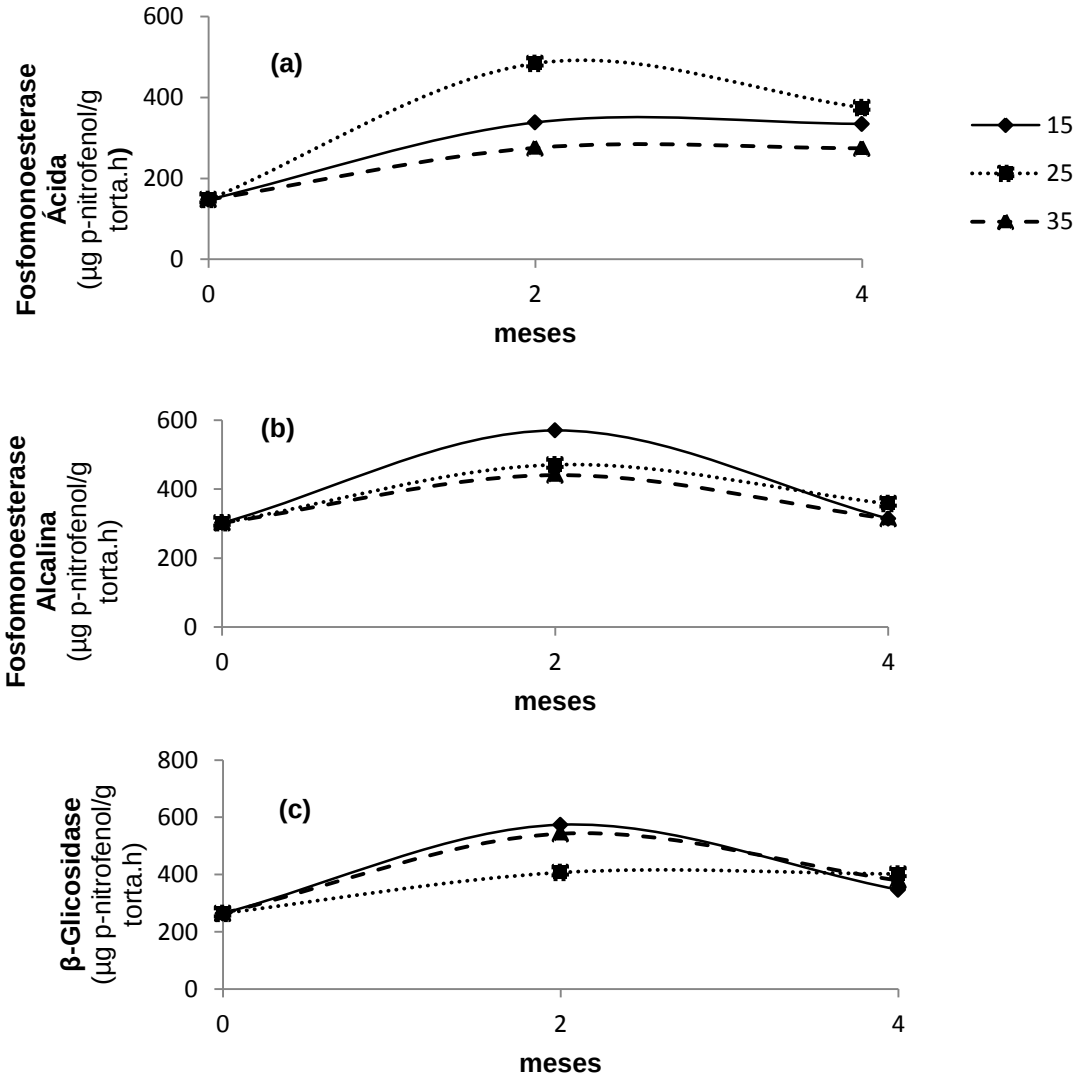

Figura 23 - Atividade enzimática das enzimas Fosfomonoesterase Ácida (a) e Alcalina (b) e β-Glicosidase (c) (µg p-nitrofenol/g torta.h.) Para os tratamentos dose 15; dose 25; dose 35.

A atividade enzimática encontrada com essa pesquisa foi ainda inferior aos relatos de outros estudos (CHAER; TÓTOLA, 2007; CONTE et al., 2002). A menor atividade das enzimas nos solos é uma indicação do déficit de nutrição das plantas e dos microrganismos do solo (RHEINHEIMER et al., 2008), igualmente correspondendo ao menor teor de nutrientes encontrados neste estudo.

Por meio do coeficiente de correlação de Pearson “r”, onde r = 1 significa total correlação; r = 0 não tem correlação; e r = -1 negativa correlação foi encontrada correlação significativa entre o C e o N da BMS e a atividade das fosfatases ácida e alcalina, e da β-glicosidase.

No segundo mês de experimento, foi encontrada correlação significativa entre o C da BMS e a atividade de fosfatase ácida para a dose 15 ($r = 1$; $p < 0,01$), para a dose 25 ($r = 1$; $p < 0,01$); a atividade de fosfatase alcalina para a dose 25 ($r = 0,9$; $p < 0,01$).

Ainda no segundo mês de experimento, foi encontrada correlação significativa entre o N da BMS e a atividade de fosfatase ácida para a dose 15 ($r = 1$; $p < 0,01$) e para 25 ($r = 0,9$; $p < 0,01$); e a atividade de fosfatase alcalina para a dose 25 ($r = 0,9$; $p < 0,01$).

No quarto mês de experimento, foi encontrada correlação significativa entre o CBM e a atividade de fosfatase ácida para a dose 15 ($r = 1$; $p < 0,01$), para a dose 25 ($r = 0,4$; $p < 0,01$), para 35 com ($r = 0,7$; $p < 0,01$); a atividade de fosfatase alcalina para a dose 15 ($r = 1$; $p < 0,01$).

Foi encontrada correlação significativa no quarto mês de experimento entre o NBM e a atividade de fosfatase alcalina para a dose 25 ($r = 1$; $p < 0,01$).

De acordo com Klose e Tabatabai (2002), esses resultados são coerentes pelo fato de que as enzimas originam-se principalmente da biomassa microbiana. Correlações entre essas variáveis têm sido reportadas em outros estudos (LANDGRAF; KLOSE, 2002; TAYLOR et al., 2002; TURNER et al., 2002; BÖHME et al., 2005) e relacionam o papel e a importância da biomassa microbiana na ciclagem dos nutrientes no solo.

Era esperado encontrar maior atividade da enzima fosfatase ácida, em relação à alcalina, diante do pH ácido encontrado na torta de filtro dos “litter bags” durante o experimento. Porém a maior atividade desta enzima foi encontrada apenas em alguns tratamentos, como para a dose 15, dose 25 com quatro meses de experimento; e para a dose 25 com 2 meses de experimento.

O aumento da atividade das fosfatases até os dois meses de experimento pode estar relacionado ao baixo teor do macronutriente fosfato no solo, assim, como o teor de fosfato vai aumento no decorrer do tempo, chegando a triplicar o seu valor, a atividade das fosfatases passa a diminuir perante este cenário.

A maior atividade da enzima β-glicosidade com dois meses de experimento relaciona-se a uma rápida decomposição da celulose, inicialmente degradando aproximadamente 60 % do material.

Determinar a atividade enzimática foi importante para correlacionar com a biomassa microbiana, complementando o estudo, e também para avaliar o quanto esta comunidade está ativa e participando da ciclagem de nutrientes, e da dinâmica da matéria orgânica presente nas amostras ambientais.

4.5.4.3 Polimorfismo de fragmento de restrição terminal – T-RFLP

A partir das planilhas organizadas, foram realizadas ordenações estatísticas (MDS - *Multidimensional Scaling)*, análises estatísticas (ANOSIM, SIMPER), e análise de riqueza. Os arquivos gerados foram convertidos em matrizes de distância, utilizando a análise de MDS, obtendo ordenações espaciais baseadas no índice de Hellinger, comumente utilizado para análises de T-RFLP.

A análise de MDS é uma técnica de ordenação, cujo objetivo é descrever a estrutura de uma matriz complexa, reduzindo sua dimensionalidade e ordenando os objetos num gráfico. Essa técnica procura garantir que as distâncias entre os objetos no espaço plotado seja proporcional às distâncias no espaço original, para que dessa forma, possa inferir que os pontos que foram plotados próximos apresentam maior similaridade entre si (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001).

Os perfis de T-RFLP foram comparados a partir da abundância relativa dos fragmentos terminais de restrição para os três Domínios de estudo. Agrupamentos são mostrados para os fragmentos com abundância relativa > 1 % (Figura 24).

Algumas amostras não produziram análises eficientes no final de todo processo. Fato este que pode ser explicado pela sensibilidade da técnica e qualidade da amostra usada. Algumas amostras não possibilitam boas extrações de DNA ou então possuem muitos inibidores que não são possíveis de serem retirados, mesmo adicionando alguns passos extras de purificação. Por isso, foram excluídas algumas das replicadas para os grupos *Archaea* e *Fungi*, devido a menor

diversidade destes quando comparado à comunidade de *Bacteria*, o que justifica uma maior exclusão de réplicas desses grupos no final da análise.

A distribuição de frequências das comunidades de *Bacteria* e *Fungi* apresentou foram maiores quando comparados com a comunidade de *Archaea*, sugerindo uma maior diversidade desses grupos, aos quais, supunham-se tais resultados pelo fato da diversidade bacteriana e fúngica ser superior a diversidade de *Archaea* num determinado ambiente (ALLER; KEMP, 2008).

A análise de MDS dos perfis de T-RFLP mostrou que os agrupamentos (Figura 24) apresentaram uma similaridade nas distribuições dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs) das três comunidades estudadas. Os agrupamentos definidos nos gráficos de ordenação demarcam a posição correspondente no ambiente estudado. Os resultados revelam também uma similaridade entre as réplicas das amostras, analisadas pelo teste SIMPER e ANOSIM discutidos a seguir.

Para as comunidades de *Archaea*, as amostras foram plotadas de forma ligeiramente mais dispersa, mas mantendo a ordenação similar à plotada para as comunidades de *Bacteria*. Sendo assim, pode-se dizer que a distribuição da estrutura das comunidades de *Archaea* seguiu o mesmo padrão de *Bacteria*.

Pode-se notar também, que para as comunidades de *Fungi*, as amostras foram plotadas concentradas pontualmente, diferindo da distribuição da estrutura das comunidades de *Archaea* e *Bacteria*.

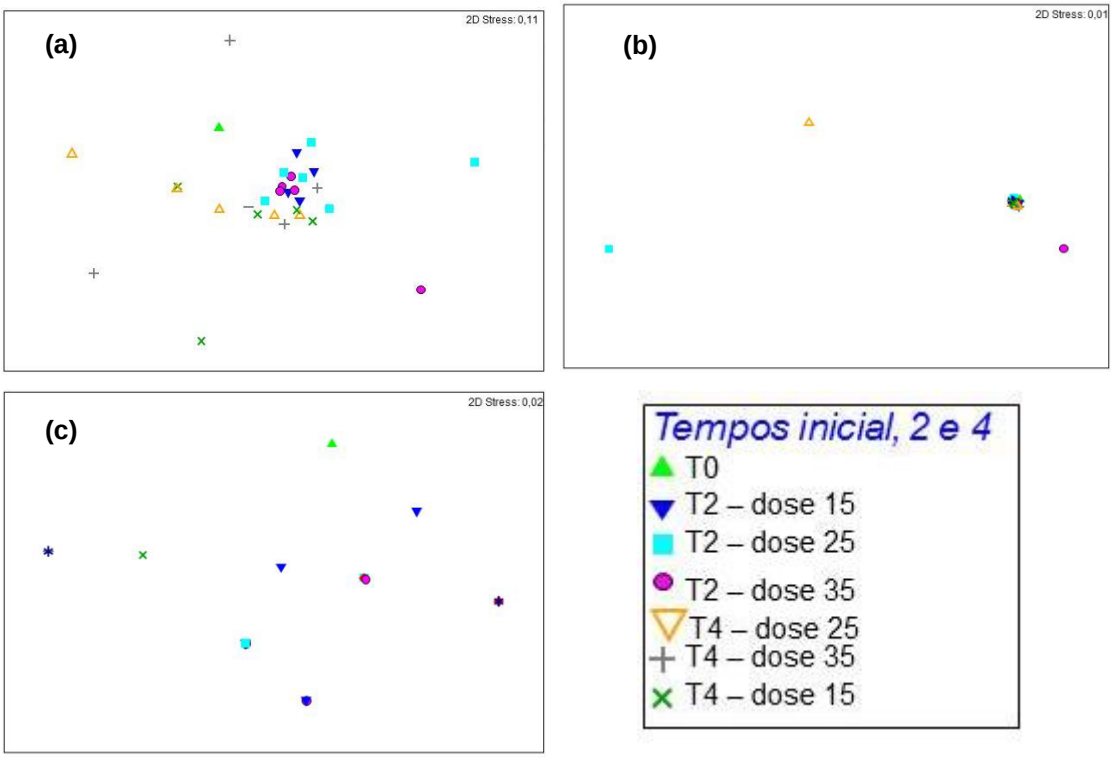

Figura 24 - *Multidimensional Scaling* (MDS) de ordenação baseada nos T-RFs discriminados, para as comunidades (a) *Bacteria*; (b) *Fungi*; (c) *Archaea*. Os agrupamentos estão representando os três tempos, inicial, com 2 e com 4 meses de experimento, para os tratamentos dose 15; dose 25; e dose 35.

Complementando a representação gráfica, foi feita uma Análise de Riqueza das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's), onde, para cada T-RF encontrado no perfil de uma comunidade, uma UTO foi considerada. A Figura 25 mostra os gráficos de riqueza de UTO's das comunidades de *Bacteria*, *Fungi* e *Archaea* no ambiente estudado.

A análise de riqueza seguiu o padrão observado na distribuição das frequências, mostrando que as comunidades de *Bacteria* e *Fungi* são mais ricas que *Archaea*.

As comunidades de *Bacteria* foram as que apresentaram maior riqueza, principalmente no segundo mês de experimento, com um pico de 17 UTO's observado para o tratamento 35; em seguida, *Fungi* apresentou uma maior riqueza no início do experimento, 6 UTO's; e por último, *Archaea* apresentou menor riqueza em relação as outras comunidades. Os resultados obtidos nessa pesquisa corroboram com o estudo de Aller e Kemp (2008), pelo fato de que, para a maioria

dos ambientes, a diversidade de membros do domínio *Archaea* tende a ser relativamente menor do que as comunidades de *Bacteria* e *Fungi*, talvez por serem em sua maioria extremófilas.

Foi observado um menor índice de riqueza quando comparado ao estudo de Mendes (2009), que avaliou a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal da Ilha do Cardoso (SP). O menor índice no presente trabalho pode ser atribuído pelo restrito local de estudo, não revelando diferenças significativas.

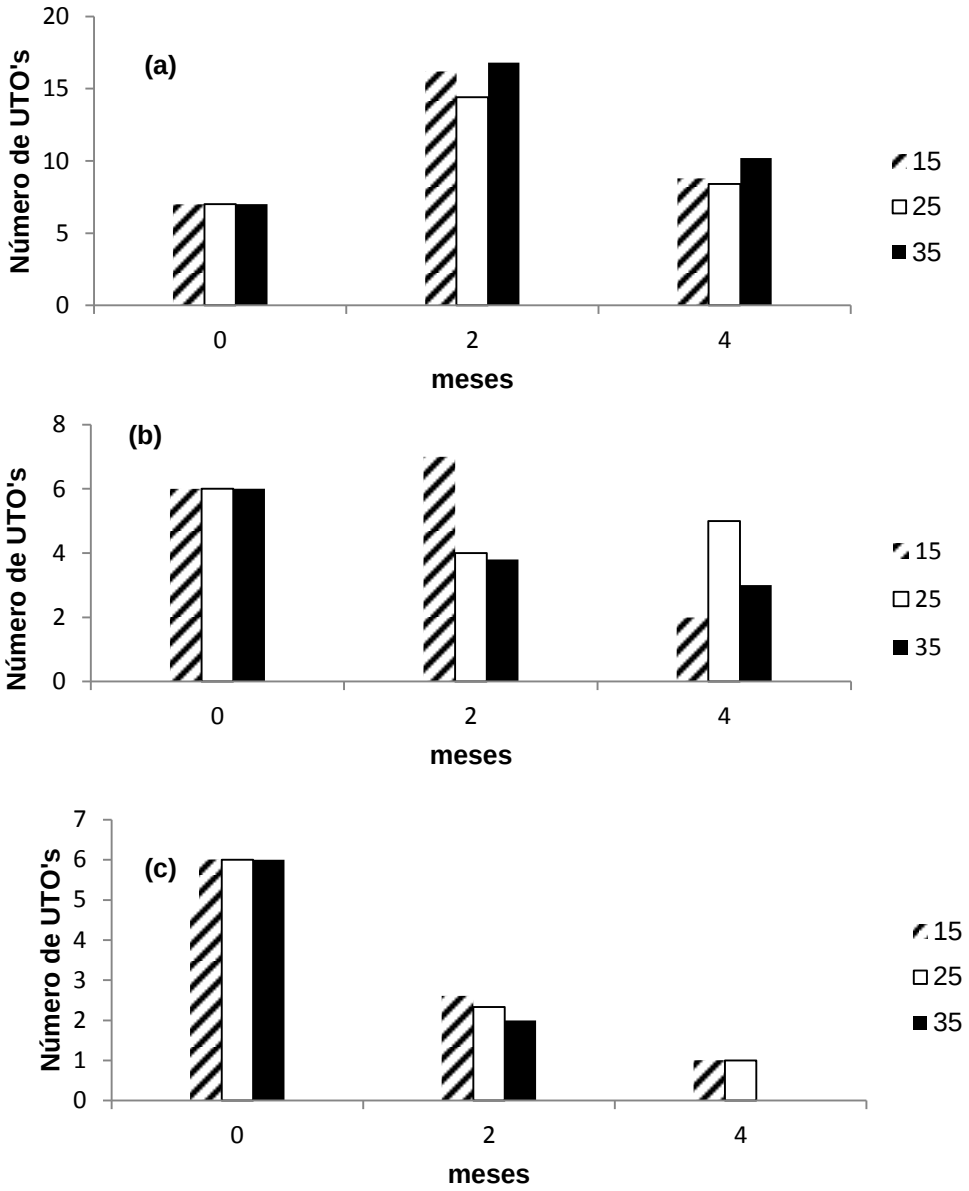

Figura 25 - Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) detectadas com a técnica de T-RFLP, para as comunidades (a) *Bacteria*; (b) *Fungi*; (c) *Archaea*.

Para testar se há diferença entre os tratamentos e na composição das comunidades, foi feita a análise de similaridade (ANOSIM), o qual avalia a diferença entre grupos de amostras de diferentes locais e tratamentos experimentais; e a porcentagem de similaridade (SIMPER), que avalia a diferença entre grupos expressando os resultados em valores percentuais de dissimilaridade (ambos os testes calculados com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis), utilizando o programa Primer 6 (CLARKE, 1993). Estes dados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Índices de similaridade ANOSIM e SIMPER, usando as técnicas de T-RFLP, para os Domínios Bacteria Archaea e Fungi nas tortas de filtros, considerando os tratamentos 15, 25 e 35 Mg ha^{-1} no segundo mês de experimento.

Tratamentos	***Bacteria***		***Fungi***		***Archaea***	
	ANOSIM[a]	SIMPER[b]	ANOSIM	SIMPER	ANOSIM	SIMPER
15 x 35	0,063	54,83%	0,194	51,86%	0,172	41,20%
15 x 25	0,095	64,59%	0,038	62,43%	0,241	46,79%
25 x 35	0,04	66,38%	0,159	54,58%	0,13	42,65%

[a]ANOSIM testa a diferença entre as amostras. Valores de “r” são expressos, todos com $p < 0,001$. Valores > 0,75 são estatisticamente diferentes; > 0,5 possuem sobreposição; e < 0,5 não apresentam diferença estatística.
[b]SIMPER, quanto maior a porcentagem maior a dissimilaridade entre as amostras.

Em nenhum teste estatístico ANOSIM comparando as doses aplicadas foi observado população estatisticamente diferente; ou seja, a composição das comunidades é similar. Pelo teste estatístico SIMPER, o grupo *Bacteria* apresentou maior dissimilaridade quando comparado os tratamentos 15 e 25; e 25 e 35 Mg ha^{-1} de torta de filtro.

De forma geral, as comunidades microbianas não diferiram entre os tratamentos, estes que apresentaram certo nível de semelhança entre si, já observados em escala multidimensional (MDS).

A análise de T-RFLP mostrou-se sensível a estrutura das comunidades de microrganismos de amostras ambientais, inferindo na comunidade de modo geral, e evidenciando sua apresentação no ambiente estudado. O fato de não apresentar diferença estatística entre os tratamentos, corroborando os dados de gases, talvez possa ser entendido por uma diferença estreita entre as dosagens dos tratamentos, refletindo em dados estatisticamente não diferenciados.

5 CONCLUSÕES

As conclusões estão baseadas nos resultados obtidos para a dose usualmente utilizada (25 Mg ha^{-1}).

O total de CO_2 emitido pela torta de filtro em relação à quantidade de carbono adicionado é de aproximadamente 20% nos primeiros dois meses após incorporação no solo.

A decomposição em massa da torta de filtro para o mesmo período avaliado no experimento com os “litter bags” foi de 30%.

Dentre os gases do efeito estufa emitidos pela torta de filtro incorporada ao solo a ser contabilizados nos cálculos da pegada de carbono dos produtos da cana-de-açúcar, o N_2O (~60 mg m^2) destacou-se por ser emitido em uma proporção doze vezes maior em massa do que o CH_4 (~5 mg m^2), em 56 dias. Quando expresso em CO_2 equivalente o N_2O representa 28,1 g m^2 e o CH_4 0,16 g m^2, ou seja, o N_2O contribui cerca de 175 vezes mais do que o CH_4.

A composição bromatológica da torta se manteve na mesma proporção ao longo do tempo em todas as doses aplicadas, ou seja, a lignina e hemicelulose aumentaram sua participação relativa, enquanto a proteína e celulose diminuíram.

Quanto aos aspectos microbiológicos, o maior valor encontrado de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana para a dose usualmente aplicada (25 Mg ha^{-1}), foi com dois meses de experimento, com respectivamente 484,89 µg C g solo seco $^{-1}$ e 62,95 µg N g solo seco $^{-1}$, e correlacionado positivamente pelo coeficiente de Pearson com a atividade enzimática no material.

Pela técnica de T-RFLP foi possível avaliar a estrutura dos Domínios de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* na comunidade microbiana da torta de filtro. Não houve modificação dessa estrutura ao longo do tempo analisado, embora tenha havido modificação da composição do substrato como demostrado pela análise bromatológica.

REFERÊNCIAS

AGRONEGÓCIOS. **Preço da cana-de-açúcar anima produtores nesta safra**. 2011. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/05/preco-da-canade-acucar-nesta-safra-anima-produtores-de-sao-paulo.html>. Acesso em: 25 jul. 2011.

ALLER, J.Y.; KEMP, P.F. Are *Archaea* inherently less diverse than *Bacteria* in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 74-87, 2008.

ASSIS, E.P.M.; CORDEIRO, M.A.S.; PAULINO, H.B.; CARNEIRO, M.A.C. Efeito da aplicação de nitrogênio na atividade microbiana e na decomposição da palhada de sorgo em solo de cerrado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. p. 107-112. 2003.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de cultura. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. p. 641–649. 1998.

BARROS, N.; GALLEGO, M.; FEIJÓO, S. **Sensitivity of calorimetric indicators of soil microbial activity**. Thermochimica Acta, Amsterdam. p. 18-22. 2007.

BAYER, C.; BERTOL, I. Características químicas de um Cambissolo húmico afetadas por sistemas de preparo, com ênfase à matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 687-694, 1999.

BIODIESELBR. **Notícias**. 2010. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/colunistas/meneghetti/producao-consolidada-etanol combustivelbrasil-tema-science.htm>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BOOM, R. **Solo saudável, pasto saudável, rebanho saudável** – A abordagem equilibrada. I Conferência virtual global sobre produção orgânica de bovinos de corte. p. 1-13. 2002.

BÖHME, L.; LANGER, U.; BÖHME, F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. p. 141-152. 2005.

BRASIL**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Balanço Nacional da cana-de-açúcar e agroenergia. Brasília: MAPA, Secretaria de Produção e Agroenergia, 2007. 139 p. Edição especial de lançamento.

BREMMER, J.M. **Sources of nitrous oxide in soils.** Nutrient Cycling in Agroecosystems, Dordrecht. p. 7-16. 1997

BUSATO, J.G. **Química do húmus e fertilidade do solo após adição de adubos orgânicos***.* 2008. 152 p. Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp058089.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2011.

CAMARGO, F.A.; GIANELLO, C.; VIDOR, C. Potencial de mineralização do nitrogênio em solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 1997. p. 575-579. Disponível em: <http://sbcs.solos.ufv.br/solos/revistas/v21n4a07.pdf>. Acesso em: 09 set. 2013.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de Analise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas, Instituto Agronômico, 2009. 77 p. Boletim técnico, 106, Edição revista e atualizada.

CARDOZO, C.O.N.; BENEDINI, M.S.; PENNA, M.J. Viabilidade técnica do uso do composto no plantio comercial de cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar 41/88**. São Paulo. p. 13-17. 1988.

CARVALHO, C.A. **Trabalho colaborativo***:* Mapa das usinas de cana-de-açúcar e destilarias. 2007. Disponível em: <http://www.peabirus.com.br/redes/form/post?topico_id=8520>. Acesso em: 20 jun. 2011.

CARVALHO, J.L.N.; AVANZI, J.C.; SILVA, M.L.N.; MELLO, C.R.; CERRI, C.E.P. Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. p. 277-289. 2010.

CARVALHO, S.T.; GUERRA, M.A. **Resíduos Sólidos. Compostagem**. 2001. Disponível em: <http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/10_Compostagem_Cenibra.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2012.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA*.* **Potencial de produção de bagaço e palha.** 2011. Disponível em: <http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=369&Itemid=1330> Acesso em: 11 ago. 2011.

CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; CERRI, C.E.P.; FELLER, C. **Carbon cycling and sequestration opportunities in South America***:* the case of Brazil. Soil Use and Management, Oxford. p. 248-254. 2004

CERRI, C.E.P.; SPAROVEKI, G.; BERNOUX, M.; EASTERLING, W.E.; MELILLO, J.M.; CERRI, C.C. Tropical agriculture and global warming: impacts and mitigation options. **Scientia Agricola**, Piracicaba. v. 64, n. 1, p. 83-99. 2007.

CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F.; GALDOS, M.V.; CERRI, C.E.P.; FEIGL, B.J.; BERNOUX, M. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. **Scientia Agricola**, Piracicaba. v. 66, n. 6, p. 831-843. 2009.

CHAER, G.M.; TOTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v. 31, p. 1381-1396. 2007.

CONSTANTINI, A.; SEGAT, A.; ALMEIDA, D.L.; DE-POLLI, H. Efecto de diferentes fertilizantes sobre el carbono de biomassa microbiana, respiración y rendimento bajo cultivo de lechuga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. p. 71-76. 1998.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D. S. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida pela aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 26, n. 4, p.925-930. 2002.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais resíduos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, Rio de Janeiro. v. 2, n. 2, p. 1-17. 1992.

CORREA, R.S.; FONSECA, Y.; CORREA, A.S. Produção de biossólido agrícola por meio da compostagem e vermicompostagem de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 2007. Campina Grande, v.11, n.4, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141543662007000400012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 jan. 2012.

DECHEN, A. R.; HAAG, H.P.; CARMELLO, Q.A. **Funções dos micronutrientes nas plantas**. *In:* FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. (Coord.) Micronutrientes na agricultura. Piracicaba: Instituto de Potassa e Fosfato. 1991. p. 6578.

DEMATTÊ, J.A.M.; SILVA, M.L.S.; ROCHA, G.C.; CARVALHO, L.A.; FORMAGGIO, A.R., FIRME, L.P. Variações espectrais em solos submetidos à aplicação de torta de filtro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** p. 317-326. 2005.

DENMAN, K.L.; BRASSEUR, G.; CHIDTHAISONG, A.; CIAIS, P.; COX, P.M.; DICKINSON, R.E.; HAUGLUSTAINE, D.; HEINZE, C.; HOLLAND, E.; JACOB, D.; LOHMANN, U.; RAMACHANDRAN, S.; SILVA DIAS, P.L. da; WOFSY, S.C.; ZHANG, X. **Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry**. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. (Ed.). Climate change 2007**:** the physical science basis contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge; New York: Cambridge University Press. 2007. p. 499-588.

DONZELLI, J.L.; PENATTI, C.P. **Manejo do solo classificado como Latossolo Roxo Acrico**. Centro de Tecnologia Copersucar. Relatório Técnico. Piracicaba. 1997. 8 p.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. **Defining and assessing soil quality**. In: DORAN, J.W.; CELEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F. & STEWART, B.A., eds. Defining soil quality for sustainable environment. Madison, Soil Science Society of America. p. 3-21. 1994.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Brasília, Produção de Informação, 2006. 306p.

EPSTEIN, E. **Land application of sewage sludge and biosolids.** 1.ed. London, New York, Washington: Lewis Publishers. 2003. 220 p.

FANG, C.; MONCRIEFF, J.B. The dependence of soil CO_2 efflux on temperature. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford. v. 33, p. 155-165, 2001.

FERRY, J.G. Enzymology of one-carbon reactions in methanogenic pathways. **FEMS Microbiological Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 12-38, 1999.

FIRME, L.P. **Cinética de degradação microbiológica de torta de filtro no solo na presença de cádmio e níquel.** 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FORSTER, P.; RAMASWAMY, V.; ARTAXO, P.; BERNTSEN, T.; BETTS, R.; FAHEY, D.W.; HAYWOOD, J.; LEAN, J.; LOWE, D.C.; MYHRE, G.; NGANGA, J.; PRINN, R.; RAGA, G.; SCHULZ, M.; VAN DORLAND, R. **Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing.** In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. (Ed.). Climate change 2007: the physical science basis contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge; New York: Cambridge University Press. 2007. p. 129-234.

FRAVET, P.R.F.; SOARES, R.A.B.; LANA, R.M.Q.; LANA, A.M.Q.; KORNDÖRFER, G.H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras. 2010 v. 34, n. 3. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542010000300013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 ago. 2013.

GIOSTRI, A.F.; BOND, L.F.M.; MOTTA, A.C.V.; SERRAT, B.M.; VEZZANI, F. M. Micronutrientes e sódio em solo e campo nativo adubados com resíduo líquido de indústria de enzimas. **Synergismus scyentifica**. UTFPR, Pato Branco, p. 1-3. 2009.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Secretaria de energia**. Disponível em: <http://www.energia.sp.gov.br/portal.php/historico> Acesso em: 13 mai. 2013.

GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R.; DORAN, J.W.; PANKHURST, C.E.; DWYER, L.M. **Biological attributes of soil quality**. In: GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R. (eds.) Soil quality for crop production and agricultural health. New York: Elsevier, 1997. p. 81-113.

GRÜNTZIG, V.; STRES, B.; AYALA DEL RIO, H. L.; TIEDJE, J.M. **Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis**. Ribosomal Database Project II protocols. 2002. Disponível em: <http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html> Acesso em: 08 set. 2013.

HOOPER, D.U.; VITOUSEK, P.M. The Effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. **Science**, Washington, v. 277, p. 1302-1305. 1997

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R.A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**. v. 42, p. 288-296. 2009

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2007**: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Genev. 2007, p. 104.

JENNY, H.; GESSEL, S.P.; BINGHAM, T. Comparative study of decomposition rates of organic matter in temperate and tropical regions. **Soil Science,** Baltimore, v. 68, p. 419-432. 1949.

KAPRI, A. TEWARI, L. Phosphate solubilization potencial and phosphatases activity of rhizospheric Trichoderma ssp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822010005000001&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em 09 set. 2013.

KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. Response of phosphomonoesterases in soils to chloroform fumigation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. v. 165, p. 429-434. 2002.

LA ESCALA JR, N.; MARQUES JR.; PEREIRA, J.T; CORA, J.E. Short-term temporal changes in the spatial variability model of CO_2 emissions from Brazilian bare soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1459-1462. 2000.

LANDGRAF, D.; KLOSE, S. Mobile and readily available C and N fractions and their relationship to microbial biomass and selected enzyme activities in a sandy soil under different management systems. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science** , v. 165, p.9-16. 2002.

LASSEY, K.; HARVEY, M. **Nitrous oxide: the serious side of laughing gas.** Water and Atmosphere, Wellington. v. 15, n. 2, p.10-11. 2007

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; WOLTERS, V.; ROGER, P.; INESON, P.; HEAL, O. W.; DHILLION, S. **Soil function in a changing world***:* the role of invertebrate ecosystem engineers. European Journal of Soil Biology.. p. 159-193. 1997

LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; MARTIN, A.; MARTIN, S.; SPAIN, A.; TOUTAIN, F.; BAROIS, I; SCHAFER, R. A hierarchical model for decomposition in terrestrial eosystems: application to soils of the humid tropics. **Biotropica**, p. 130-150. 1993.

LE MER, J.; ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig. v. 37, n. 1, p. 25-50. 2001.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, New York, v. 129, p. 271-280, 2001.

LINDSAY, W.L. **Chemical equilibria in soils**. Colorado State University, Fort Collins, USA. 1979. 449 p.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington. v. 63, p. 4516-4522. 1997.

LUPWAYI, N.Z.; CLAYTON, G.W.; O'DONOVAN, J.T.; HARKER, K.N.; TURKINGTON, T. K.; RICE, W.A. Soil microbiological properties during decomposition of crop residues under conventional and zero tillage. **Canada Journal Soil Science**, Ottawa, v. 84, p. 411–419, 2004.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas.** São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 500 p.

MAPA, **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso em: 01 jun. 2011.

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

MASON, C.F. **Decomposição**. Trad. CAMARGO, O. A. São Paulo: EPU: Editora da Universidade de São Paulo. 63 p. 1980.

MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso – SP**. 2009. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MEUNCHANG, S.; PANICHSAKPATANAA, S.; WEAVER, R.W. Co-composting of filter cake and bagasse: by-products from a sugar mill. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, p. 437-442, 2005.

MOLINA, R.M. **A torta de filtro e o bagaço no comportamento da biota, propriedades físicas e produtividade de um solo cultivado em cana-de-açúcar.**

1995, 96 p. Dissertação (PhD) – Itaguaí - RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Rio de Janeiro, 1995.

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

MOREIRA, R.M.; CABRAL, T.D.; SOUZA NETO, G.P.; SOUCHIE, E.L.; CASTRO, C.F.S. **Hidrólise enzimática de celulose por fungos isolados a partir de torta de filtro do processo de produção de cana-de-açúcar**. I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IFGoiano. p 1-3. 2012.

NARDIN, R.R. **Torta de filtro aplicada em argissolo e seus efeitos agronômicos em duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em duas épocas.** 2007. 39 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração e Tecnologia de Produção Agrícola) – Instituto Agronômico – IAC, Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/PosIAC/pdf/pb1205905.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2011.

NASSAR, A.M.; RUDOR, B.F.T.; ANTONIAZZI, L.B.; DE AGUIAR, D.A.; BACCHI, M.R.P.; ADAMI, M. **Prospects of the sugarcane expansion in Brazil: impacts on direct and indirect land use changes.** In: Zuurbier, P.; Vooren, J. (eds) Sugarcane Ethanol: Contributions to Climate Change Mitigation and the Environment. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008. p. 63–94.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 539-579.

NUNES JR., D.; MORELLI, J.L.; NELLI, E.J. **Comportamento de variedades de cana-de-açúcar na presença de torta de filtro e de mamona**. Parte II. Boletim Técnico Copersucar 41/88. São Paulo. p 3-12. 1988.

OLSON, J.S. **Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems.** Ecology, Durham. v. 44, n. 2. 1963.

OSLER, G.H.R.; SOMMERKORN, M. **Toward a complete soil C and N cycle: incorporating the soil fauna.** Ecology, p. 1611-1621. 2007.

PAULA, M.O.; TINÔCO, I.F.F.; RODRIGUES, C.S.; SILVA, E.; SOUZA, C.F. **Potencial da cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland**. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v13n3/v13n03a19.pdf> Acesso em: 11 ago. 2011.

PENATTI, C.P.; BONI, P.S. **Efeito da torta de filtro na cana planta e cana soca. Centro de Tecnologia Copersucar.** Relatório Técnico, Piracicaba. 1989. 7 p.

PICCOLO, M.C.; NEILL,C.; CERRI,C.C. Net nitrogen mineralization and net nitrification along a tropical forest-to-pasture chronosequence. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 162, p. 61-70, 1994.

PRESCOTT, C. **Do rates of litter decomposition tell us anything we really need to know?** Forest Ecology and Management, Amsterdam. v. 220, n. 1-3, p. 66-74. 2005.

RAIJ, B. VAN; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M. E.; LOPES, A.S.; BATAGLIA, A.C. **Análise química do solo para fins de fertilidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 170 p.

RHEINHEIMER, D.S.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural,** v. 38, n. 4, p. 576-586. 2008.

RIBEIRO, A.C.; GURGEL, M.N.A.; THIÉBAULT, J.T.L.; BITTENCOURT, V.C. Torta de filtro rotativo como fertilizante, em misturas com apatita-de-Araxá, superfosfato simples e vinhaça. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** p. 178-181. 1979.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**. New York: Wiley Interscience, 1981. 395 p.

SÁ, J.C.M. de; CERRI, C.C.; DICK, W.A.; LAL, R.; VENZKE FILHO, S.P.; PICCOLO, M.C.; FEIGL, B.J. Organic matter dynamics and carbon sequestration rates for a tillage chronosequense in a Brazilian oxisol. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 65, p. 1486-1499, 2001.

SANTANA, D.F.; BAHIA-FILHO, A. F. C. **Soil quality and agricultural sustainability in the Brazilian Cerrado**. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 16., Montpellier, France. Proceedings. Montpellier, 1998.

SANTOS, D.H.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S.; FABRIS, L.B. Produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 2010. Goiânia, v. 40, n. 4, p. 454-461.

SANTOS, F.C.; COELHO, A.M.; RESENDE, A.V. Embrapa. **Fertilidade de Solos**, 2009, Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milheto/CultivodoMilheto/adubacao.htm> Acesso em: 24 set. 2013.

SEASTEDT, T.R. The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. **Annual review of entomology**, p. 25-46. 1984.

SILVA, E.C. **Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) da uréia, do milheto e da crotalária pelo milho sob semeadura direta em solo de Cerrado**. 2005. 111f. Tese (Doutorado) - – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SIQUEIRA NETO, M. **Estoque de carbono e nitrogênio do solo com diferentes usos no Cerrado em Rio Verde (GO)**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SMITH, J.L.; PAUL, E.A. **The significance of soil microbial biomass estimations**. In BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G. Soil Biochemistry. v. 6. p. 357-396. 1990.

SOARES, P.C. Warming Power of CO_2 and H_2O: Correlations with Temperature Changes. In **International Journal of Geosciences**, 2010, Disponível em: <http://www.SciRP.org/journal/ijg>. Acesso em: 16 mai. 2013.

TABATABAI, M.A. **Soil Enzymes***.* In: WEAVER, R.W; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P. S. Methods of Soil Analysis: Microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, p. 775-883. 1994.

TANNER, E.V.J. The decomposition of leaf litter in Jamaican montane rain forests. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 69, p. 263-275. 1981.

TARAFDAR, J.C.; MEENA, S.C.; KTHJU,S. Influence of straw size on activity and biomass of soil microorganisms during decomposition. **European Journal of Soil Biology**, p. 157-160. 2001.
TAYLOR, J.P.; WILSON, B.; MILLS, M.S.; BURNS, R.G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 387-401. 2002.

THORNE, N. **Zinc deficiency and its control**. Advances in Agronomy*,* San Diego, v. 9, p. 3161. 1957.

TURCO, R.F.; KENNEDY, A.C.; JAWSON, M.D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A., **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p. 73-90.

TURNER, B.L.; HOPKINS, D.W.; HAYGARTH, P. M.; OSTLE, N. β-Glucosidase activity in pasture soils. **Applied Soil Ecology**. v. 20, p. 157-162. 2002.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA – UDOP. **Notícias**. 2009. Disponível em <http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=907>. Acesso em: 19 jun. 2011.

USINA COSTA PINTO. **A Companhia***.* 2010. Disponível em: <http://www.usinacostapinto.com.br/templates/ucp/index.php>. Acesso em: 11 ago. 2011.

VALE, D.W.; SOUSA, J.I.; PRADO, R.M. Introdução ao manejo da fertilidade do solo e nutrição de plantas. In VALE, D.W.; SOUSA, J.I.; PRADO, R.M. **Manejo da fertilidade do solo e nutrição de plantas.** Jaboticabal, 2010, p.11-15.

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

VEIGA, C.F.M.; VIEIRA, J.R., MORGADO, I. F. **Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro: relatório de pesquisa**. Rio de Janeiro: FAERJ: SEBRAE, 107 p. 2006.

YAN, S.; SINGH, A.N.; FU, S.; LIAO, C.; WANG, S.; LI, Y.; CUI, Y.; HUF, L. A soil fauna index for assessing soil quality. **Soil Biololy and Biochemistry**. 4:158-165, 2012.

WHIETHÖLTER, S. Nitrogênio no solo sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**. Passo Fundo, jul./ago. p. 38-42, 2000.

YEATES, G.W. **Nematodes as soil indicators:** functional and biodiversity aspects. Biology and Fertility of Soils. p. 199-210. 2003.