

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

**Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de
archaea presente no sedimento do canal de distribuição**

Bruna Gonçalves de Oliveira

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

**Piracicaba
2010**

Bruna Gonçalves de Oliveira
Licenciada em Ciências Biológicas

**Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de archaea
presente no sedimento do canal de distribuição**

Orientador:
Profa. Dra. BRIGITTE JOSEFINE FEIGL

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

Piracicaba
2010

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

Oliveira, Bruna Gonçalves de

Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de archaea presente no sedimento do canal de distribuição / Bruna Gonçalves de Oliveira. - - Piracicaba, 2010.

96 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Ecologia microbiana 3. Efeito estufa 4. Gases - Emissão
Microbiologia do solo 6. Uso do solo 7. Vinhaça I. Título

5

CDD 631.46
O48v

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

OFEREÇO.

...Ao meu namorado João Luís...

Pela enorme contribuição neste trabalho,
companheirismo, carinho e paciência, muita paciência!

Às pessoas mais importantes da minha vida, minha família...

...Meus pais Francisco e Angela...

Maiores exemplos de amor, honestidade, caráter e inteligência,
que sempre me apoiaram e me incentivaram,
se hoje eu estou aqui, esse mérito é de vocês!

...Minha tia Tude...

...Por me dar o privilégio de ter “duas mães” e,
fazer todas as minhas vontades...

...Meu irmão Denis...

Pelo companheirismo, por me ligar “todos os dias” e,
não me deixar esquecer nossos laços familiares

....Meu irmão Junior...

Que junto à minha cunhada Déia
me presentearam com a maior riqueza desse mundo:

THALES!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante e permanente em minha vida, por conceder tudo que necessito e me presentear com o dom mais belo: viver!

Ao Santo Expedito por tornar possível o que cheguei a acreditar ser impossível!

A minha linda família, meus pais Ângela e Francisco, minha tia Tude, meus irmãos Junior e Denis, minha cunhada Déia e meu sobrinho Thales por entenderem minha ausência e me apoiarem irrestritamente.

Ao programa de PPG em Microbiologia Agrícola em especial a secretária Giovana por todo auxílio e amizade e à ESALQ pela oportunidade;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

A FAPESP pelo auxílio financeiro através de Projeto Regular de Pesquisa;

A professora Dra. Brigitte Feigl pela orientação, amizade, ensinamentos transmitidos, confiança, agradável convívio e apoio em todas as fases desta pesquisa. Valeu Bri!

Ao professor Dr. Carlos Clemente Cerri, por compartilhar todas as suas grandes idéias, pelo apoio durante a execução desta pesquisa e amizade;

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Pellegrino Cerri, pelas sugestões e auxílio durante a execução do trabalho além da grande contribuição teórica através de suas aulas;

Aos técnicos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental: Dagmar, Sandra, Admilson e em especial Lilian e Ralf pelo auxílio na execução da parte prática do trabalho;

Ao grande Zezinho pelo auxílio na parte burocrática e amizade construída;

A Mara pelo auxílio na chegada, amizade, por ajudar na parte burocrática e nos socorrer quando preciso;

Aos colegas da Biogeoquímica Ambiental pela amizade e convivência;

A Usina Iracema por ceder as áreas de estudo e pela oportunidade de trabalho em conjunto, em especial ao Hevaldo, por levantar todos os dados necessários e não reclamar das milhares ligações semanais, sempre muito prestativo;

Ao Paulinho pelo auxílio nas coletas de solo e aos

Aos motoristas Claudião e Odake pelo auxílio nas coletas de campo;

A todos que me ajudaram nas coletas de gases e literalmente “enfiaram o pé na vinhaça”, Bia (estagiária), André, Maísa, Ralf, Greg, Bri e Ana. Muito obrigada por compartilharem aquele cheirinho agradável!

A professora Dra. Siu Mui Tsai, que prontamente permitiu a utilização do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) e ainda contribuiu com algumas dicas e sugestões;

Ao técnico do laboratório de Biologia Celular e Molecular José Elias pelo auxílio;

Ao casal Lilian e Ademir pela super ajuda, pelos intermináveis géis de DGGE, trabalhos aos sábados, adequação da metodologia, paciência, enfim, por todo auxílio e dedicação na parte de microbiologia molecular do meu projeto, se não fosse vocês, eu estaria perdida!

A minha pequena amiga Bianca Furlan, por todas as ponteiras e água autoclavada que me emprestou sem reclamar, obrigada amore!

Ao professor Dr. Fernando Dini Andreote por me socorrer nas análises moleculares e pelas sugestões. E ao Armando pelo “empréstimo” dos *primers mcrA*;

Aos pesquisadores Dr. Luiz Umberto Gomes e Dra. Keila Roncato por me apresentarem à vida acadêmica;

Aos amigos que o mestrado me proporcionou e que eu desejo que seja para sempre: Adriano, Polé, Alice, Elisa, Layanne, Rene, Fabi, Vivian, Gi Nunes, Gi Monteiro, Daniel, Felipe, Luiz Barbero, Duzão, Caio, Joze, Kelly, Rafael, as inseparáveis Naty e Kit, Marquinho, Ciniro, André, Maísa, Marília, Stoécio, Ademir ...

Aos amigos de sempre: Nara, Lu, Mylenne e Ana por se fazerem presentes em todos os momentos.

. A João Luís, por estar do meu lado em todos os momentos, pela enorme contribuição no presente trabalho, sempre disposto há dedicar seu tempo para correções, sugerir novas idéias, enfim, por me colocar pra cima todas as vezes que eu precisei e não me deixar desistir nunca. Você tornou essa dissertação uma realidade! Obrigada!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e participaram do meu crescimento pessoal e profissional!

MUITO OBRIGADA!

“Concentre-se em conhecer, não em acreditar”

Albert Einstein

O dia mais belo: **hoje**

A coisa mais fácil: **errar**

O maior obstáculo: **o medo**

O maior erro: **o abandono**

A raiz de todos os males: **o egoísmo**

A distração mais bela: **o trabalho**

A pior derrota: **o desânimo**

Os melhores professores: **as crianças**

A primeira necessidade: **comunicar-se**

O que traz felicidade: **ser útil aos demais**

O pior defeito: **o mau humor**

A pessoa mais perigosa: **a mentirosa**

O pior sentimento: **o rancor**

O presente mais belo: **o perdão**

O mais imprescindível: **o lar**

A rota mais rápida: **o caminho certo**

A sensação mais agradável: **a paz interior**

A maior proteção efetiva: **o sorriso**

O maior remédio: **o otimismo**

A maior satisfação: **o dever cumprido**

A força mais potente do mundo: **a fé**

As pessoas mais necessárias: **os pais**

A mais bela de todas as coisas: **O AMOR!!!**

Madre Tereza de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Evolução da Indústria Sucroenergética no Brasil: Do breve histórico à atualidade.....	19
2.2 Gases de efeito estufa na agricultura	21
2.2.1 Fluxos de CO ₂	22
2.2.2 Fluxos de N ₂ O	23
2.2.3 Fluxos de CH ₄	25
2.3 Vinhaça.....	27
2.3.1 Sistema de armazenamento e distribuição de vinhaça da Usina Iracema.....	29
2.4 População Metanogênica e seu estudo através de técnicas moleculares	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Localização e caracterização da área de estudo.....	33
3.2 Descrição das áreas de estudo	34
3.3 Estudo 1: Avaliação dos fluxos de GEE emitido pela vinhaça no canal de distribuição	35
3.3.1 Descrição dos canais condutores de vinhaça.....	35
3.3.2 Caracterização da vinhaça nos canais condutores	35
3.3.3 Amostragem de GEE proveniente da vinhaça no canal de distribuição.....	36
3.4 Estudo 2: Avaliação dos fluxos de GEE emitido pelo solo devido à aplicação de vinhaça.....	38
3.4.1 Descrição da área de estudo.....	38
3.4.2 Caracterização do solo nas áreas em estudo.....	39
3.4.3 Caracterização da vinhaça aplicada no solo	40
3.4.4 Amostragem de GEE proveniente do solo após a aplicação de vinhaça.....	41
3.5 Análises de GEE provenientes dos estudos.....	42
3.6 Conversão dos fluxos de N-N ₂ O e C-CH ₄ em CO ₂ equivalente	43
3.7 Estudo 3: Análises moleculares microbianas	43
3.7.1 Coleta das amostras	43
3.7.2 Extração do DNA, PCR e DGGE.....	44
3.8 Análise estatística dos dados	46

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Emissões de GEE provenientes da vinhaça no canal de distribuição	47
4.1.1 Caracterização química da vinhaça.....	47
4.1.2 Temperatura e pH da vinhaça	48
4.1.3 Fluxos de C-CO ₂	50
4.1.4 Fluxos de N-N ₂ O.....	51
4.1.5 Fluxos de C-CH ₄	51
4.1.6 Conversão dos fluxos de N-N ₂ O e C-CH ₄ em CO ₂ equivalente.....	54
4.2 Emissões de GEE provenientes do solo com aplicação de vinhaça.....	55
4.2.1 Densidade e Estoque de C do solo.....	55
4.2.2 Caracterização química da vinhaça aplicada no solo.....	56
4.2.3 Umidade e temperatura do solo	57
4.2.4 Fluxos de C-CO ₂	59
4.2.5 Fluxos de N-N ₂ O.....	62
4.2.6 Fluxos de C-CH ₄	65
4.2.7 Fluxos de N-N ₂ O e C-CH ₄ do solo convertidos em CO ₂ equivalente	68
4.2.8 Fator de emissão de N ₂ O devido à aplicação da vinhaça no solo	69
4.3 Balanço dos fluxos de GEE proveniente da vinhaça	70
4.4 Estrutura das comunidades de <i>archaea</i> total e de <i>mcrA</i>	71
5 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	93

RESUMO

Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de archaea presente no sedimento do canal de distribuição

A preocupação mundial com as possíveis mudanças climáticas, decorrentes do aumento da concentração de gases do efeito estufa (GEE), resultam na busca por fontes de energia renovável. Dentre estas fontes, a produção do etanol vem se destacando globalmente. O Brasil é o maior produtor mundial de etanol, baseado na cana-de-açúcar como matéria-prima. A produção deste biocombustível atua na redução das emissões de GEE, como substituinte de derivados de petróleo e fornecimento de energia, através da queima do bagaço. No entanto, é necessário quantificar o *off-set* do etanol em relação ao petróleo em todas as fases de produção. Importante resíduo da indústria sucroenergética é a vinhaça, gerada em elevadas quantidades e usualmente aplicada no solo em fertirrigação. Muitos estudos relatam os benefícios que a vinhaça proporciona ao solo, porém, pouco se sabe sobre os possíveis impactos que causa no ambiente, sobretudo no que se refere às emissões de GEE. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as emissões de GEE provenientes da vinhaça no canal de distribuição e após aplicação no solo e detectar as comunidades de *archaeas* presentes no sedimento do canal condutor, verificando a influência de fatores bióticos e abióticos nas emissões e comunidades microbianas. A pesquisa foi desenvolvida na Usina Iracema, localizada em Iracemápolis, SP. Amostragens de GEE foram realizadas em diferentes pontos do canal de distribuição e em áreas de cana queimada e crua. Amostras de sedimento foram coletadas no canal para detecção das comunidades de *archaeas* por DGGE. As emissões de C-CO₂ e C-CH₄ provenientes da vinhaça no canal de distribuição foram influenciadas pela composição físico-química deste resíduo. Apesar de apresentar emissões significativas, o C-CO₂ não foi computado no cálculo das emissões totais, pois é reassimilado pela fotossíntese. As emissões de N-N₂O foram muito baixas, demonstrando que a vinhaça não fornece condições favoráveis à formação deste GEE. Ao converter os fluxos de N-N₂O e C-CH₄ em CO₂ eq. observou-se que o C-CH₄ contribuiu com aproximadamente 99% das emissões totais oriundas da vinhaça presente no canal. A fertirrigação do solo potencializou as emissões de C-CO₂ e N-N₂O e não influenciou as emissões de C-CH₄. As emissões de N-N₂O provenientes da aplicação de nitrogênio na forma de vinhaça no solo resultaram em fatores de emissão de 0,68 e 0,44 % (kg N-N₂O/kg N), respectivamente para cana queimada e crua. Após conversão dos fluxos de N-N₂O e C-CH₄ em CO₂ eq. verificou-se que a aplicação da vinhaça no solo aumentou as emissões em 46,0 e 30,9 kg de CO₂ eq. ha⁻¹, respectivamente para cana queimada e crua. Considerando a aplicação de 200 m³ ha⁻¹, observou-se que a vinhaça emitiu 493,9 e 489,1 kg de CO₂ eq. ha⁻¹, respectivamente para cana queimada e crua. A contabilização das emissões totais de GEE oriundas da vinhaça indicou que 90% das emissões são resultantes do canal de distribuição. A técnica de DGGE demonstrou mudanças nas estruturas das comunidades de *archaea* total e *mcrA* de acordo com os pontos de amostragem, exibiu forte relação com as condições encontradas nesses pontos e com a produção de C-CH₄.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Vinhaça; Metano; *mcrA*; Óxido nitroso

ABSTRACT

Sugarcane vinasse: greenhouse gases fluxes and archaeal community in the distribution's channel sediment

The global growing concern about an eventual climate change due to the increasing atmospheric greenhouse gases (GHG) concentrations spur on the search for renewable energy sources. Among the possibilities, ethanol is getting global prominence. Brazil is the greatest producer of ethanol derived from sugar-cane. The production of this biofuel helps to reduce GHG emission replacing the use of petroleum and producing energy by bagasse burning. However, it is necessary to quantify its effective off-set analyzing all steps of production. The main residue of the sugar- ethanol industry is the vinasse, which is generated in high quantity and is usually applied to soil as fertirrigation. Several studies mention the benefits of vinasse application to soil cultivated with sugarcane, but few is known about possible impacts on environment, especially in what concerns GHG emissions. The objective of this work was to evaluate GHG emissions from the vinasse during its flux in distribution channels and after its application to soil by aspersion. Besides, the structure of *archaea* community of the sludge deposited at the channel's bottom was investigated, evaluating the influence of biotic and abiotic factors on GHG emission rates and microbial community. The study was developed at Usina Iracema, located in Iracemópolis (SP). GHG samples were taken at six different points along the vinasse distribution channel and after its application at sites where sugar cane is harvest preceded or not by straw burning. Samples from sedimented sludge were collected from the channel and archaeas communities were assessed by DGGE analyses. Emissions rates of CO₂-C and CH₄-C from vinasse were influenced by the physical-chemical composition of this residue. Although significant emission rates of CO₂-C have been measured, they were not included in total emission calculations, since this gas is reabsorbed by photosynthesis. N₂O-N emissions were very low, demonstrating that the vinasse does not promote favorable conditions to its building. The conversion of N₂O-N and CH₄-C fluxes into CO₂ eq demonstrated that methane represents about 99% of total emission of vinasse while into the distribution channel. The soil fertirrigation with vinasse increased CO₂-C and N₂O-N emissions, but did not influence C-CH₄ emission rate. Nitrous oxide originated by N content in vinasse applied to soil represented 0.68 and 0.44 % (kg N₂O-N.kg N⁻¹), respectively, from areas were harvest was or was not preceded by burning. N₂O-N and CH₄-C fluxes converted to CO₂ eq showed that vinasse application increased emissions by 46.0 e 30.9 kg of CO₂ eq. ha⁻¹ respectively, at areas were harvest was or was not preceded by burning. Considering that vinasse is usually applied in rates of 200 m³ ha⁻¹ the areas were harvest was or was not preceded by burning could emit a total of 493.9 and 489.1 kg CO₂ eq. ha⁻¹ respectively. In the final account, 90% of total GHG emission from vinasse was originated from the distribution channel. The DGGE technique demonstrated changes in total and functional community structure of *archaeal* according to sampling point. They were also strongly correlated to environmental conditions end C-CH₄ production.

Keywords: Sugarcane; Vinasse; Methane; mcrA; Nitrous oxide

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e a importância dessa cultura pode ser atribuída à múltiplas utilizações. Atualmente, o principal destino do cultivo da cana-de-açúcar é a produção de açúcar e etanol. Dentre as principais regiões produtoras, o estado de São Paulo leva destaque, pois exibe as maiores produtividades agrícola e industrial e os menores custos de produção e de logística, está mais próximo do mercado consumidor, dos centros de pesquisa e da indústria de máquinas e equipamentos do setor sucroenergético (BRASIL, 2007).

O etanol tem sido produzido e implementado em larga escala como biocombustível substituto aos combustíveis fósseis pelo Brasil e essa política já é considerada referência mundial.

Vários são os estudos que demonstram a escassez de energias fósseis nos anos futuros e ainda destacam a necessidade de substituições destas fontes energéticas por energias alternativas. A crescente preocupação com o ambiente e, em particular, com as mudanças climáticas globais coloca em dúvida a própria sustentabilidade do atual padrão de consumo energético, uma vez que os relatórios do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) têm demonstrado que 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.

Neste sentido, o uso de fontes de energia renovável e com baixo teor de carbono é uma das estratégias para a mitigação da emissão de GEE e o combate ao aquecimento global. O etanol da cana-de-açúcar, que apresenta indicação de balanço energético e de emissões de GEE significativamente favorável, é uma alternativa disponível comercialmente e com grande potencial de rápida expansão em muitos países (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2010).

Até pouco tempo atrás quantificar as emissões de GEE durante o processo de produção do etanol não era uma premissa ecológica, porque não havia consciência ou conhecimento sobre a magnitude e as conseqüências do aquecimento global. A ausência de trabalhos científicos que tratam deste assunto comprova tal fato. Hoje em dia, no entanto, quando o etanol vem sendo amplamente utilizado como alternativa de substituição ao combustível fóssil, tornou-se necessário avaliar todas as emissões de GEE de sua cadeia produtiva.

De posse dessas emissões será possível propor alterações nos processos e reduzir a emissão de GEE, tornando o etanol um produto ambiental, econômico e socialmente atrativo dentro do agronegócio internacional. O produto final deve refletir o “*carbon footprint*” da

produção do etanol em termos de emissão de GEE, expresso em “CO₂ equivalente”. O biocombustível será tanto mais atrativo no “*offset*” de um combustível fóssil, quanto menor a emissão de GEE associados à sua produção.

Para atingir esse objetivo é necessário monitorar todas as fases da produção do etanol, verificando a emissão de GEE proveniente da reforma dos canaviais, do plantio, dos tratamentos culturais, da colheita, e da produção e disposição dos resíduos, tal como vinhaça, bagaço e torta de filtro.

A vinhaça é um dos principais resíduos da indústria sucroenergética. Durante o processo produtivo, são gerados em média 13 litros de vinhaça para cada litro de etanol. Devido ao grande volume produzido e às características físico-químicas favoráveis, a vinhaça pode ser uma importante fonte de GEE para atmosfera. As emissões oriundas da vinhaça podem ser originadas no processo de armazenamento e transporte e ainda após a aplicação no solo.

A vinhaça apresenta consideráveis quantidades de carbono (C) e nitrogênio (N) em sua composição e dessa forma pode resultar em emissões significativas de CO₂, N₂O e CH₄, desde que existam condições favoráveis para formações destes GEE. Entretanto, não existem estudos demonstrando valores de emissões de GEE provenientes da vinhaça, tanto no canal de distribuição, quanto depois de aplicada ao solo. Outra lacuna da pesquisa está associada às comunidades microbianas responsáveis pela produção destes GEE oriundos da vinhaça. Diante do exposto, esta pesquisa se baseou na seguinte hipótese:

- A vinhaça é uma importante fonte de GEE, sobretudo CH₄, devido às condições de anaerobiose presentes no canal de distribuição;

O principal objetivo, em função das hipóteses mencionadas é: Avaliar as taxas de emissão dos principais GEE emitidos pela vinhaça presente no canal de distribuição e após sua aplicação no solo. Para alcançar o objetivo principal, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Quantificar as emissões dos principais GEE provenientes da vinhaça presente no canal de distribuição e expressá-los em termos de CO₂ eq.;
- Quantificar as emissões dos principais GEE provenientes da aplicação de vinhaça no solo, comparando sistema de colheita manual e sistema de colheita mecanizada e expressá-los em termos de CO₂ eq.;
- Calcular o balanço geral das emissões de GEE oriundos da vinhaça, desde o canal de distribuição até a aplicação no solo;

- Detectar os perfis das comunidades de *archaeas* totais e metanogênicas ao longo do canal de distribuição de vinhaça;
- Avaliar se as características físico-químicas observadas influenciam as emissões de GEE e alteram as estruturas das comunidades de *archaeas* totais e metanogênicas presente no canal de distribuição de vinhaça;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Evolução da Indústria Sucroenergética no Brasil: Do breve histórico à atualidade

A exploração da lavoura da cana-de-açúcar é uma das mais antigas atividades produtivas do Brasil. Pode-se dizer que sua história foi construída juntamente com a história do país. No entanto, desde sua implantação até os dias de hoje, o registro de sua evolução nem sempre ocorreu de forma contínua (MOREIRA, 2010).

O início da agricultura canavieira no Brasil foi dado por volta de 1530 com a ocupação dos portugueses, que tinham como objetivo garantir soberania sobre a colônia e todo o aproveitamento econômico. Nesta época o açúcar despontava com alto valor no mercado internacional e sua produção adaptar-se-ia com facilidade às condições brasileiras, uma vez que esse tipo de cultivo apresentava desde aquela época, melhor rendimento em climas tropicais. Com tantas condições favoráveis, o açúcar tornou-se a principal atividade econômica nacional, e o Brasil ganhou rapidamente a posição de primeiro produtor mundial (PRADO JUNIOR, 1976).

Os ciclos iniciais da expansão da cana-de-açúcar no Brasil fracassaram devido a inúmeros aspectos, como a utilização de equipamentos obsoletos nos engenhos (o que impedia o aumento da produtividade), utilização de variedades de cana-de-açúcar com baixa qualidade e escassez de inovações no setor (ANDRADE, 1988; VIAN, 2006).

O cultivo da cana-de-açúcar foi impulsionado na década de 70, com a implantação do Pró-Álcool, o qual objetivou a substituição em larga escala dos derivados do petróleo (gasolina) pelo etanol. Este programa propiciou melhoramento e expansão da oferta de matéria prima, com ênfase especial no aumento da produção agrícola, na modernização e ampliação das usinas já existentes e ainda na instalação de novas unidades (BIODIESELBR, 2010). A partir de então, o açúcar deixou de ser o principal produto derivado da cana-de-açúcar, dando lugar ao etanol, o qual anteriormente assumia papel secundário.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. A produção na safra de 2008/2009 girou em torno de 570 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em uma área plantada de 8,5 milhões de hectares (UNICA, 2009). Ainda nesta safra foram produzidos aproximadamente 27 milhões de litros de etanol e 30 milhões de toneladas de açúcar. O setor sucroenergético vive hoje um novo período de expansão, com mercado livre e competitivo.

Segundo dados oficiais do governo, a previsão da safra de cana-de-açúcar para o ano de 2010 é de 651,51 milhões de toneladas, exibindo um aumento de 8% em relação a safra anterior. O estado de São Paulo continua detendo a maior parte de área plantada com cana-de-açúcar do país, com aproximadamente 4,4 milhões ha, seguidos pelos estados de Minas Gerais (706 mil ha), Paraná (614 mil ha), Goiás (599 mil ha) e Alagoas (439 mil ha) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

No Brasil, a cana-de-açúcar se apresenta como a principal matéria-prima para a obtenção de açúcar e etanol produzidos a baixos custos, uma vez que a energia consumida no processo é produzida a partir dos seus próprios resíduos (bagaço, palha, etc.). A queima do bagaço da cana-de-açúcar gera energia elétrica por um sistema denominado co-geração, o qual representa uma fonte energética relativamente “limpa”, quando comparada com outras fontes energéticas. As usinas estão utilizando essa fonte para atender às demandas internas de energia durante a safra, e ainda fornecem o excedente para as concessionárias locais.

Atualmente, existe crescente demanda para os produtos derivados da cana-de-açúcar. A proporção de cana-de-açúcar utilizada para a produção de açúcar e etanol está associada, sobretudo, às demandas do mercado internacional. A produção de etanol é fato marcante no Brasil, pois é o principal país no mundo a implantar este biocombustível em larga escala como alternativa à utilização de petróleo. O etanol é um biocombustível e tem como premissa básica a redução das emissões de gases do efeito estufa (GEE) em relação aos derivados de petróleo. Sua utilização é reconhecida mundialmente pelas vantagens ambientais, sociais e econômicas que proporciona, entretanto, não se sabe ao certo quão “limpa” ou sustentável é a produção de etanol no Brasil. Não existem estudos conclusivos avaliando o balanço total das emissões de GEE na produção deste biocombustível.

É muito importante desenvolver formas de manejo e métodos de produção do etanol de cana-de-açúcar que sejam baseados em um melhor desempenho ambiental (COSTA, 2010). Portanto, se faz grande a necessidade de aprofundamento nos estudos que avaliem as emissões de GEE no setor agrícola e todo processo produtivo da cadeia do etanol.

2.2 Gases de efeito estufa na agricultura

Gases de efeito estufa são aqueles gases que possuem capacidade de absorver radiação infravermelha, aquecer-se e transmitir calor para a atmosfera, mantendo o calor na superfície da Terra. Esse efeito, chamado de Efeito Estufa é tido como natural e necessário ao aquecimento da Terra, caso contrário a temperatura média da superfície da Terra seria menor que o ponto de congelamento da água ($\pm -18^{\circ}\text{C}$) (LE TREUT et al., 2007). Porém, a intensificação do efeito estufa através de ações humanas tem gerado como consequência o tão comentado e estudado “Efeito Estufa Antrópico”, tido como causador do aquecimento global do planeta.

O efeito estufa é causado, principalmente, pelas emissões de CO_2 , CH_4 , N_2O , clorofluorcarbonetos (CFCs) e vapor d’água. 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.

O CO_2 é o GEE que mais contribui para o efeito estufa, devido à grande quantidade que é emitida, em torno de 55% do total. Por sua vez, apesar da quantidade de CH_4 presente na atmosfera ser bem menor, o potencial de aquecimento global (PAG) desse GEE é 25 vezes maior que o do CO_2 . Embora as concentrações de N_2O e de CFCs na atmosfera sejam menores ainda, o PAG desses gases é muito superior, sendo respectivamente, em torno de 298 e de 6.200 a 7.100 vezes maior do que o CO_2 (INTERNATIONAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2007).

No Brasil, a proporção entre as contribuições dos GEE provenientes da queima de combustíveis fósseis, agricultura e mudanças do uso da terra apresentam padrões diferentes daqueles observados globalmente. No país, a contribuição da queima de combustíveis fósseis é menos importante, enquanto a mudança de uso da terra (desmatamento) e a agricultura são responsáveis por mais de dois terços das emissões totais (MCT, 2004; CERRI et al., 2009). Quando as emissões de GEE provenientes do processo de desmatamento e agricultura passam a ser contabilizadas, o Brasil passa da 17^a para 5^a posição na relação dos países que mais emitem GEE (CERRI et al., 2007).

Apesar de o setor agrícola ser uma importante fonte de GEE para atmosfera, este setor pode se comportar como dreno de GEE dependendo das práticas de manejo aplicadas. O desenvolvimento de sistemas de manejo do solo e a utilização de resíduos ou co-produtos, podem mitigar significativamente as emissões de GEE da agricultura, sobretudo do setor sucoenergético (CERRI et al., 2010). É possível reduzir a emissão desses GEE em praticamente todas as fases da

produção do etanol de cana-de-açúcar. Em alguns casos, as mudanças se restringem à simples adequações, enquanto que outras requerem interferências radicais, com alteração do processo produtivo. Porém, para tal redução é necessário o conhecimento do impacto das emissões de GEE provenientes de todo setor produtivo.

2.2.1 Fluxos de CO₂

O armazenamento de CO₂ ou C no globo terrestre é dividido principalmente em cinco compartimentos: o oceânico, o geológico, o pedológico (solo), o biótico (biomassa vegetal e animal) e o atmosférico. Todos estes compartimentos estão interconectados e o C circula entre eles (LAL, 2004). O maior reservatório é o geológico (a crosta terrestre), com cerca de 90.000.000 Pg de C. Apesar desta grande quantidade, a maior parte deste C geológico não participa da ciclagem, a não ser uma pequena fração, a qual constitui um reservatório de 5.000 Pg de C, compreendendo 4.000 Pg de C em carvão e 1.000 Pg de C em óleo e gás (LAL, 2004). Segundo este mesmo autor, no compartimento oceânico existe em torno de 38.000 Pg de C, principalmente na forma inorgânica. O compartimento de C do solo (2500 Pg C) é o maior nos ecossistemas terrestres (aproximadamente quatro vezes o compartimento de C da vegetação e 3,3 vezes o carbono da atmosfera) e é constituído por 1550 Pg C na forma de C orgânico e 950 Pg C na forma de C inorgânico (LAL, 2006). Já o compartimento atmosférico está entre os que apresentam a menor quantidade de C armazenada (760 Pg C) (LAL, 2004). Entretanto, isto não o torna menos importante, devido ao seu efeito no tocante às mudanças climáticas.

A concentração de CO₂ aumentou de 280 para 390 ppmv (partes por milhão em volume) no final da década passada e, atualmente aumenta a uma taxa estimada de 2,2 ppmv ano⁻¹ equivalente a um incremento de 3,3 Pg de C por ano (IPCC, 2007), sendo que alguns autores citam uma taxa de aumento de 3,5 Pg C ano⁻¹ (ALBRECHT; KANDJI, 2003). Segundo Forster et al., (2007), os primeiros 50 ppm foram atingidos em mais de 200 anos após o início da Revolução Industrial, enquanto os 50 ppm restantes foram acumulados em aproximadamente 30 anos. O incremento anual médio no período de 1960 a 2005 foi de 1,4 ppm ano⁻¹. Atualmente, o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera é atribuído a uma soma de fatores, tais como, ao uso de combustíveis fósseis, à indústria de produção de cimento, 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).

A emissão de CO₂ do solo para atmosfera ocorre principalmente por dois processos biológicos, a decomposição de resíduos orgânicos e a respiração de organismos e sistema radicular das plantas (CARVALHO et al., 2010). No solo, o CO₂ se movimenta por difusão, de uma região de maior para outra de menor concentração, e por fluxo de massa o CO₂ se move junto com o ar ao qual está misturado (BALL; SMITH, 1991). A concentração de CO₂ nos poros do solo é significativamente maior do que a atmosfera, na ordem de 10 a 100 vezes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Tal fato está associado à atividade respiratória no solo, sendo a respiração radicular responsável por 20% deste aumento na concentração de CO₂ e os 80% restantes oriundos da atividade biológica do solo (MELILLO et al., 2002). A diferença de potencial entre o solo e a atmosfera cria um fluxo ascendente de CO₂ (BALL; SMITH, 1991).

As variáveis climáticas influenciam diretamente o fluxo de CO₂ para a atmosfera, e seus principais condicionantes são a temperatura (solo e atmosfera) e a umidade do solo (DUIKER; LAL, 2000). A temperatura merece destaque especial no fluxo de CO₂, uma vez que, acréscimos podem elevar exponencialmente a taxa de respiração do solo (FANG; MONCRIEFF, 2001).

2.2.2 Fluxos de N₂O

O N₂O é um gás incolor e não tóxico, e foi comumente usado como anestésico e aditivo ao combustível. Esse GEE teve sua descoberta há pouco mais de 200 anos e têm recebido grande atenção por ser um dos três principais gases causadores do efeito estufa

O N₂O tem um tempo de residência na atmosfera de até 150 anos e apesar de contribuir com apenas 0,03% do total das emissões globais de GEE, exibe alta capacidade de retenção das radiações infravermelhas, sendo 298 vezes mais potente que o CO₂. Dessa forma, quando levado em consideração o impacto individual desse GEE, expresso em termos de CO₂ eq., sua contribuição passa de 0,03 para aproximadamente 10% das emissões globais (IPCC, 2007).

No período entre 1750 e 2000, a concentração de N₂O na atmosfera aumentou em torno de 16% (de 270 para 320 ppbv) e sua taxa de aumento é de 0,8 ppbv ano⁻¹ (IPCC, 2007).

As emissões de N₂O se dividem em naturais e antrópicas. Entre as fontes naturais mais citadas estão, os processos naturais que ocorrem nos solos e oceanos. Mais de dois terços das

emissões naturais de N_2O originam-se através de dois processos biológicos realizados por bactérias conhecidos como nitrificação e denitrificação. O 1/3 restante provém da degradação microbiana de materiais biológicos encontrados nos oceanos (LASSEY; HARVEY, 2007) e também através de processos 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^- (BREMNER, 1997).

Dentre as fontes antrópicas de N_2O está a aplicação de fertilizantes nitrogenados, a deposição de dejetos animais em solos agrícolas, a aplicação de fertilizantes orgânicos ricos em nitrogênio, a queima de biomassa e a queima de combustíveis fósseis (CERRI et al, 2009).

Aproximadamente 38% das emissões totais de N_2O estão relacionadas a atividades antrópicas, sendo as atividades agrícolas a principal fonte, responsável por aproximadamente 16% das emissões totais. No Brasil, entre os anos de 1993 e 1995, estimam-se em 123 Gg de N_2O as emissões diretas provenientes de solos agrícolas (EMBRAPA, 2006).

A formação e a emissão de N_2O por processos microbianos é resultado de complexas interações entre diversas variáveis, como temperatura, textura, estrutura e pH do solo, disponibilidade de N, disponibilidade de material orgânico degradável e conteúdo de água no solo (BØCKMAN; OLFS, 1998). Rotação de culturas, preparo do solo e período de aplicação de fertilizantes nitrogenados influenciam sobremaneira as emissões de N_2O (TAN et al., 2009). A aplicação de N no solo na forma de resíduos líquidos, tal qual a vinhaça, somadas às condições de anaerobiose resultantes desta aplicação podem resultar em emissões consideráveis de N_2O .

Como já citado anteriormente estas emissões de N_2O do solo são basicamente resultantes dos processos de nitrificação e denitrificação. A seguir será apresentada uma breve descrição destes processos de formação de N_2O nos solos.

- **Nitrificação:** Oxidação aeróbia de amônio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-). O processo é realizado por bactérias quimioautotróficas e ocorre em duas etapas: nitrificação, em que o NH_4^+ é oxidado a nitrito NO_2^- e nitratação, onde o NO_2^- é oxidado a NO_3^- (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A produção de N_2O por nitrificação é maximizada por condições de umidade no solo na faixa de 35-60% do espaço poroso preenchido por água (PPA) (COSTA; ZANATTA; BAYER, 2008).

- **Denitrificação:** é o processo de oxidação do NO_3^- até N_2 , mediado por bactérias anaeróbicas facultativas, as quais representam de 0,1 a 5% da população total de bactérias no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O produto intermediário obrigatório desse processo é o N_2O (de KLEIN; ECKARD, 2008) e os picos de emissão de N_2O do solo geralmente são atribuídos a denitrificação (WRAGE et al., 2001; LEE et al., 2006). A rota de denitrificação, na qual o N é sucessivamente oxidado, ou seja, utilizado como receptor de elétrons, é representada pela equação a seguir, onde os números entre parênteses representam o número de oxidação do nitrogênio nos diferentes compostos:



As taxas de nitrificação e denitrificação são afetadas por diversas características dos solos e fatores climáticos. Davidson e Swank (1986) mostraram que os principais fatores que influenciam as emissões de N_2O derivado de reações de nitrificação são temperatura e densidade do solo. Já a produção de N_2O oriundo de denitrificação parece ser influenciada principalmente por quantidade de poros preenchidos por água, pelo potencial redox do solo e pelo conteúdo de N presente no solo.

2.2.3 Fluxos de CH_4

O CH_4 é o principal hidrocarboneto presente na atmosfera. A concentração de CH_4 na atmosfera aumentou cerca de 150%, variando de 700 para 1745 ppbv (partes por bilhão em volume), no período entre 1750 e 2000, e vem aumentando a uma taxa de 7 ppbv ano⁻¹ (IPCC, 2007).

Apesar de seu curto tempo de residência na atmosfera (12 anos), sua capacidade de reter radiações infravermelhas torna o CH_4 25 vezes mais eficiente que o CO_2 (IPCC, 2007)

Em torno de 70-80% do CH_4 presente na atmosfera é originário de fontes biológicas e é produzido através da oxidação anaeróbia da matéria orgânica por micro-organismos. A formação desse GEE se dá através da completa mineralização da matéria orgânica em ambientes anaeróbios, onde as concentrações de sulfato (SO_4^-) e nitrato (NO_3^-) são baixas e ocorre através da fermentação metanogênica, a qual tem como produto final CH_4 e CO_2 , conforme mostrado na reação a seguir: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 3\text{CO}_2 + 3\text{CH}_4$ (LE MER; ROGER, 2001).

A degradação da matéria orgânica ocorre de forma seqüencial, em direção aos compostos simplificados, através do metabolismo de diversos micro-organismos. A decomposição começa por processos aeróbios e depois se dá 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 são reduzidos pelas *archaeas* metanogênicas a CH_4 (FERRY, 1999). A figura 1 apresenta esquema detalhado de digestão anaeróbia, o qual identifica as sucessivas etapas até a decomposição total da matéria orgânica e formação do CH_4 .

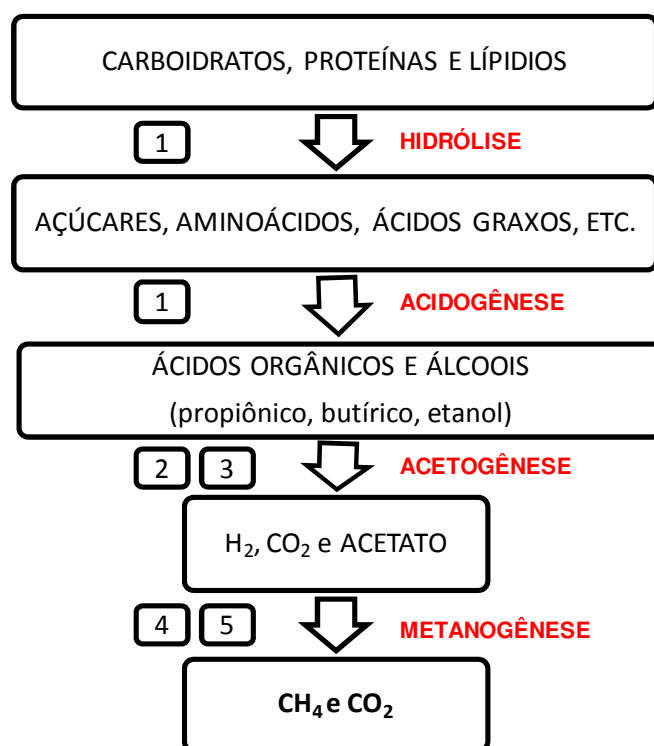


Figura 1 - Etapas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia: 1. Bactérias fermentativas hidrolíticas; 2. Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; 3. Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio; 4. *Archaeas* metanogênicas redutoras de CO_2 ; 5. *Archaeas* metanogênicas descarboxiladoras de acetato. Adaptado de CHERNICHARO (1997)

Na primeira etapa, uma vez que as bactérias não são capazes de assimilar a matéria orgânica particulada, compostos orgânicos mais complexos presentes no sistema são hidrolisados a unidades mais simples através da ação enzimática de bactérias hidrolíticas fermentativas. Em seguida ocorre a acidogênese, que é a fermentação dos compostos mais simples através das

mesmas bactérias, gerando como produtos ácidos orgânicos, alcoóis e CO₂ (NOVAES, 1986; CHERNICHARO, 1997).

Nas etapas 2 e 3 ocorre a acetogênese, onde as bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para as *archaeas* metanogênicas. Dessa forma, as bactérias acetogênicas fazem parte de um grupo metabólico intermediário que produz substrato para as metanogênicas. Os produtos gerados pelas bactérias acetogênicas são o hidrogênio (H⁺), o CO₂ e o acetato (CHERNICACHARO, 1997).

As duas últimas etapas (4 e 5), correspondem à produção do CH₄, ou seja, a metanogênese, a qual pode ocorrer por dois caminhos. O primeiro caminho é o processo oxidativo da metanogênese hidrogenotrófica (produção de CH₄ a partir do H⁺), na qual o CO₂ atua como acceptor de elétrons, sendo reduzido a CH₄. Este caminho é menos importante em termos de conversão global, mas pode ser realizado por praticamente todas as *archaeas* metanogênicas. A segunda etapa é a da metanogênese acetotrófica (produção de CH₄ a partir de acetato), em que o C orgânico, na forma de acetato (ácido acético) é convertido em CH₄ (von SPERLING, 1996).

A digestão anaeróbia requer interação dos micro-organismos fermentativos e metanogênicos. Da mesma forma, o sucesso do processo depende de um balanço do sistema ecológico. Atenção especial deve ser dada às *archaeas* metanogênicas, consideradas mais vulneráveis às mudanças das condições ambientais (CHERNICHARO, 1997).

As emissões de CH₄ resultam tanto de fontes naturais, como fermentação de ruminantes, dejetos animais, cultivos em terras alagadas, aterros (DENMAN et al., 2007; FORSTER et al., 2007), quanto de fontes industriais, como queima de combustíveis fósseis (IPCC, 2007) e manejo de dejetos ou subprodutos, resultantes principalmente do setor agrícola, tal como a vinhaça.

2.3 Vinhaça

A vinhaça é o principal resíduo da indústria sucroenergética. Durante o processo de produção do etanol, é gerada em elevada quantidade e sua produção varia em função dos diferentes processos, como fermentação do mosto e destilação do vinho. Mais precisamente, para se produzir um litro de etanol, é gerado em torno de 10 a 18 litros de vinhaça, dependendo das condições operacionais e das instalações utilizadas (KUMAR et al., 1998; WADT, 2008). A

vinhaça é um líquido com carga orgânica bastante elevada e rica em nutrientes, sobretudo o potássio (K).

Uma aparente solução para o descarte racional da vinhaça é o que atualmente chama-se de fertirrigação, ou seja, a utilização desse produto rico em matéria orgânica aplicada *in natura*, sem sofrer qualquer tipo de tratamento ou remediação em áreas de plantio de cana-de-açúcar (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992). Essa aplicação pode ser realizada de diferentes formas, como através de caminhões tanque, sulcos de infiltração, aspersão e utilização de pivôs centrais (UNICA, 2010). A fertirrigação de vinhaça nos canaviais foi intensificada a partir das proibições de despejo desse produto nos cursos d'água. Além disso, essa prática de aplicação *in natura* ganhou espaço uma vez que requer pouco investimento, baixo custo de manutenção, não envolve uso de tecnologia complexa e possibilita rápida eliminação de grandes quantidades desse material (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

A vinhaça pode ser formada a partir de três mostos diferentes, o que lhe confere níveis variáveis para cada elemento mineral. O mosto de melaço é o mais rico e apresenta em média níveis de NPK em torno de 0,57; 0,10; 3,95 kg/m³ de vinhaça, respectivamente. O mosto misto, que é produzido em usinas como destilarias, apresenta níveis em torno de 0,48 de N, 0,09 de P, 3,34 de K e o mosto de caldo, produzido em destilarias isoladas, apresenta os níveis de NPK em kg/m³ de vinhaça, de 0,28; 0,09; 1,29 respectivamente (BARROS et al., 2010).

A aplicação de vinhaça no solo promove a elevação do pH, aumento da capacidade de troca catiônica (CTC), aumento da retenção de água, melhor estruturação física do solo (SILVA et al., 2007) e aumento do conteúdo de N.

Sob o ponto de vista biológico, a vinhaça deve ser considerada, também, como agente do aumento da população e da atividade microbiana no solo. No momento em que a matéria orgânica contida na vinhaça é incorporada ao solo, esta é colonizada por fungos, os quais a transformam em húmus, neutralizando a acidez do meio, preparando, deste modo, o caminho para proliferação bacteriana, responsável pela mineralização e imobilização do N, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica (CAMBUIM, 1983; RESENDE et al., 2006).

A grande vantagem da utilização da vinhaça como fertilizante, é que a mesma pode substituir em grande parte os nutrientes fornecidos na adubação mineral e ainda fornecer água para cultura nos períodos de seca. Existem diversos estudos que evidenciam aumento de produtividade da cana-de-açúcar devido à sua aplicação no solo (CAMBUIM, 1983; RESENDE

et al., 2006). O uso agrícola da vinhaça e os seus benefícios são indiscutíveis, tanto do ponto de vista agrônomo, econômico, quanto social. (BARROS et al., 2010). Porém, ainda não se sabe ao certo quão ambientalmente benéfica é a vinhaça no solo e qual é a sua participação na emissão de GEE da produção do etanol.

Atualmente, a sustentabilidade ambiental no processo de produção do etanol vem sendo amplamente discutido. Nesse sentido, a aplicação de vinhaça tem sido contestada pelos seus efeitos no solo, nas águas subterrâneas (SILVA et al., 2007) e na atmosfera. Tanto a comunidade científica, como o setor produtivo demonstram especial interesse em estimar as emissões de GEE provenientes da vinhaça, as quais podem ser significativas considerando-se sua ação desde os sistemas de armazenamento e transporte em tanques e canais, até a aplicação na lavoura. Apesar de ainda não haver estudos conclusivos sobre tais emissões, existem fortes indícios que estas existam. Na maioria das vezes o sistema de armazenamento e distribuição da vinhaça é realizado “a céu aberto”, o qual devido ao processo de decomposição pode resultar em emissões significativas de GEE, principalmente na forma de CH₄.

2.3.1 Sistema de armazenamento e distribuição de vinhaça da Usina Iracema

Cada Usina exibe um sistema característico de produção, armazenamento e distribuição de vinhaça, pois como ressaltado anteriormente, a composição desta, varia de acordo com o tipo de vinho a ser destilado, origem e composição da cana-de-açúcar, método de fermentação e outros fatores adotados no processo de produção do etanol.

A Usina Iracema, pertencente ao grupo São Martinho e localizada no município de Iracemápolis (SP), mói em média 15 mil toneladas de cana-de-açúcar e produz 7.500 m³ de vinhaça por dia. A temperatura da vinhaça quando sai do processo produtivo da usina varia em torno de 90°C. Este calor, no entanto, é aproveitado na indústria para o cozimento do caldo, de maneira que quando a vinhaça efetivamente chega ao canal de distribuição a temperatura é de aproximadamente 40°C.

Quanto aos tipos de armazenamento e distribuição, a Usina Iracema dispõe de quatro tanques de acumulação revestidos e dois não revestidos, três tanques de segurança e um canal condutor mestre de aproximadamente 7.800 metros, onde 1.000 metros são revestidos. Oitenta

por cento da vinhaça gerada é aplicada instantaneamente na lavoura, mas também pode ocorrer do resíduo permanecer no canal de distribuição por até uma semana antes de ser aplicado.

Os principais sistemas de aplicação da vinhaça da Usina Iracema são aspersão, através de adutoras, sistema raesa, que envolve autopropelido, carretel, motobomba ou hidroholl e caminhões. A dosagem média de vinhaça aplicada através dos vários sistemas é de $200 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$.

2.4 População Metanogênica e seu estudo através de técnicas moleculares

Tem-se falado muito a respeito do poder que a vinhaça exerce sobre o desenvolvimento de micro-organismos atuantes nas reações químicas do solo. Porém os trabalhos científicos encontrados na literatura relatam somente aumento ou decréscimo de populações microbianas em função de diferentes doses de vinhaça aplicada (SANTOS et al., 2009) e não a participação destes micro-organismos na ciclagem de nutrientes e emissões ou drenos de GEE.

A decomposição da vinhaça e a conseqüente emissão de GEE para atmosfera estão relacionadas a alguns grupos de micro-organismos, em especial os procariotos, porém a maioria destes micro-organismos ainda não foi estudada. Como se sabe que os métodos tradicionais de cultivo não se aplicam para toda comunidade microbiana faz-se necessário o uso de técnicas moleculares para conhecimento desses micro-organismos, como é o caso do estudo de genes funcionais, sobretudo dos produtores de CH_4 .

Os micro-organismos produtores de CH_4 são procariotos pertencentes ao domínio *Archaea*, criado por Carl Woese com base em estudos filogenéticos. Essa nova classificação dos seres vivos substituiu os cinco reinos da taxonomia Lineana tradicional por três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990), sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas, e o terceiro domínio englobando todos os organismos eucariotos.

O domínio *Archaea* é caracterizado por micro-organismos procarióticos evolutivamente distintos dos micro-organismos alocados no domínio *Bacteria* em função de diversas características, como organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (CANHOS; VAZOLLER, 1999).

O domínio *Archaea* consiste de quatro divisões: **1. *Crenarchaeota***, que contempla as *archaeas* hipertermófilas redutoras de enxofre; **2. *Euryarchaeota***, que compreende as espécies metanogênicas, halofílicas extremas e algumas hipertermofílicas (WOESE; FOX, 1977); **3. *Korarchaeota***, que engloba micro-organismos hipertermofílicos isolados de fontes termais terrestres, porém ainda não cultivados em laboratório (HUBER et al., 2002); **4. *Nanoarchaeota***, que compreende os hipertermofílicos parasitas de *Ignicoccus* (WATERS et al., 2003).

As *archaeas* metanogênicas são os únicos micro-organismos que através de sistemas enzimáticos produzem CH₄ como produto de seu metabolismo. São encontradas em ambientes associados à decomposição de matéria orgânica e/ou atividades geoquímicas. Estão presentes em uma ampla variedade de hábitat anaeróbios, incluindo sedimentos marinhos e de água doce, pântanos, solos inundados, lençóis de água, charcos, hábitat geotérmicos, trato gastrointestinal de animais, biorreatores anaeróbios e canais de armazenamento e distribuição de alguns resíduos, como a vinhaça. A metanogênese microbiana pode ter algumas aplicações práticas, como tratamento anaeróbio de lodos de esgoto, produção de energia e biodegradação de compostos tóxicos (ZINDER, 1998).

Provavelmente, a característica mais evidente das metanogênicas está relacionada com sua especificidade de substratos para crescimento e produção de CH₄, ou seja, sua especialidade catabólica. As metanogênicas apresentam metabolismo quimiorganotrófico ou autotrófico. Sob o ponto de vista ecológico, o metabolismo metanogênico é dependente da presença de outros micro-organismos, cuja atividade no meio anaeróbio gera os precursores para a metanogênese (VAZOLLER, 1995). Em contrapartida, as metanogênicas removem metabólitos e também o H⁺, favorecendo a fermentação (ZINDER, 1998).

Várias pesquisas em ecologia microbiana de *archaeas* metanogênicas não resultam no isolamento dos micro-organismos devido às dificuldades de trabalho em anaerobiose estrita, e grande parte do conhecimento nessa área advém de trabalho empregando técnicas de biologia molecular (ARAUJO, 2010). Os métodos tradicionais dependentes de cultivo, apesar de importantes, se revelaram insuficientes e inadequados para descrever a vasta diversidade microbiana desses ambientes, pois apresentam limitações e podem ocasionar em perda de informações (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

A introdução de métodos independentes de cultivo, como os métodos moleculares melhoraram muito o potencial de descrição da diversidade microbiana (PACE, 1997; DE LONG,

2005). A base dos variados métodos moleculares está na utilização dos ácidos nucleicos, tanto DNA quanto RNA, extraído de amostras ambientais (solo, água, resíduo, sedimento, etc.), seguido de amplificação do gene de interesse por PCR e análises dos *amplicons* por diversas técnicas, como DGGE (*fingerprinting*), bibliotecas de clones, seqüenciamento, *microarray*, qPCR (*real time*), entre outras (HE et al., 2007; CARDENAS; TIEDJE, 2008).

Comunidades metanogênicas tem sido caracterizadas por empregar o gene *mcrA* (transcrito para síntese da Metil Coenzima A Redutase) como marcadores moleculares, que é responsável pela síntese de CH₄ pelos micro-organismos. Este gene se mostrou conservado entre micro-organismos metanogênicos, sendo utilizado para a caracterização do grupo (DHILLON et al., 2005). Diversos estudos com este gene têm mostrado diferenciadas comunidades através de análise de bibliotecas de clones ou perfil de DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante), que permite a separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho de acordo com o teor de G+C presentes em cada fragmento.

Associando a técnica de DGGE à de PCR (reação em cadeia da polimerase) é possível selecionar e amplificar fragmentos do DNA de organismos específicos como *archaeas* metanogênicas, de um *pool* de DNA contendo material genético de diferentes micro-organismos. Como de sedimento do canal de vinhaça, foco do presente estudo. O DNA amplificado é separado de acordo com as constituições de G+C dos diversos fragmentos construindo assim um perfil de bandas que representam o *fingerprinting* da comunidade microbiana específica de interesse. Mudanças na estrutura da comunidade são refletidas no perfil de bandas obtido através do DGGE (COSTA, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e caracterização da área de estudo

A área de estudo pertence à Usina Iracema e está localizada no município de Iracemápolis (22°34' S, 47°31' O), na região sudeste do estado de São Paulo, (Figura 2). A altitude média na Usina é de 608 m. A precipitação média anual é de 1419 mm (Figura 3). Segundo Köppen o clima regional é do tipo Cwa, subtropical úmido com estiagem no inverno (temperatura média do mês mais quente de verão acima de 22° C e temperatura média do mês mais frio inferior a 18° C).

O solo avaliado é classificado como Latossolo Vermelho Eutrófico. Próximo à área de estudo verificou-se a existência de associação Latossolos e Nitossolos Vermelhos Eutróficos, dependendo da posição na paisagem.



Figura 2 - Mapa do Brasil com destaque para o Estado de São Paulo e a localização da área de estudo

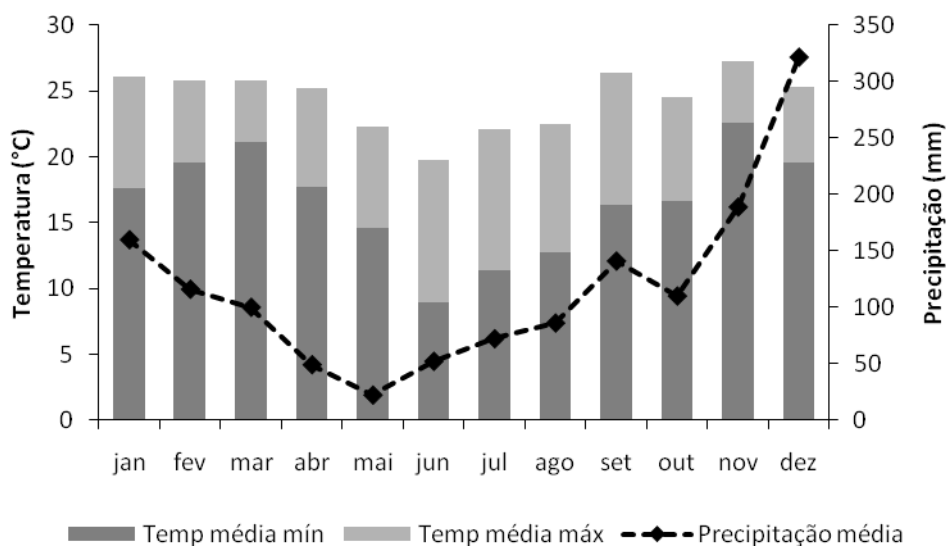


Figura 3 - Temperaturas máximas, temperaturas mínimas e precipitação mensal na Usina Iracema, em Iracemópolis (SP). Os dados referem-se ao ano de 2009

A Usina Iracema, fundada em 1937, pertence ao grupo São Martinho S/A desde 1938. Esta unidade foi escolhida como área de estudo por estar localizada em região representativa das condições de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, adotar diferentes práticas de manejo, ser pioneira na tecnologia da colheita mecanizada de cana crua, sem queima prévia da palha e ainda possuir sistema de armazenamento e distribuição de vinhaça, simples, prático e de fácil acesso.

3.2 Descrição das áreas de estudo

Para determinação dos fluxos de GEE provenientes da vinhaça foram estabelecidos estudos ao longo do canal de distribuição e após sua aplicação no solo em fertirrigação. Adicionalmente, foi realizado um estudo visando caracterizar a presença de *archaeas* metanogênicas no sedimento presente no fundo do canal condutor de vinhaça. A seguir serão descritas as características de cada área de estudo, tal como as metodologias de avaliação.

3.3 Estudo 1: Avaliação dos fluxos de GEE emitido pela vinhaça no canal de distribuição

3.3.1 Descrição dos canais condutores de vinhaça

O principal canal de distribuição e armazenamento de vinhaça da usina Iracema tem aproximadamente 8.000 metros de extensão, com alguns ramos secundários que servem somente como canais de segurança. Trata-se de um sulco feito com retroescavadeira, com largura média de 2,5 m e profundidade média de 1,0 m, onde é depositada a vinhaça depois de bombeada para fora da indústria. Os primeiros 1.000 metros são revestidos com cimento, enquanto que o restante se encontra em contato direto com o solo. A emissão de GEE foi realizada em seis pontos distribuídos ao longo do canal principal. A marcação destes pontos visou à obtenção de fluxos de GEE mais representativos de toda a extensão do canal, e ainda a avaliação das modificações destes fluxos em função das diferentes condições do canal. Para permitir repetidas amostragens de GEE no mesmo local, foram instaladas plataformas de madeira, conforme mostrado na Figura 4.



Figura 4 - Plataformas de madeira sobre o canal de distribuição de vinhaça para realização das amostragens de GEE

3.3.2 Caracterização da vinhaça nos canais condutores

A caracterização físico-química da vinhaça foi realizada na mesma época de coleta dos GEE. Amostras foram coletadas e encaminhadas para análise em empresa especializada. Foram realizadas análises de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio

(DBO), potencial redox, teor de N, teor de C, K e condutividade elétrica. Essas análises foram importantes para detectar quais fatores poderiam interferir nas emissões de GEE e também no perfil da comunidade de micro-organismos metanogênicos presentes no canal.

3.3.3 Amostragem de GEE proveniente da vinhaça no canal de distribuição

Conforme mencionado anteriormente, para determinação do fluxo dos GEE no sistema de armazenamento e distribuição da vinhaça foram estabelecidos seis pontos de coleta, com o objetivo de se obter melhor representatividade das emissões. O primeiro ponto encontra-se localizado dentro da Usina, onde a vinhaça é bombeada para os tanques e canais, ou seja, no momento que sai da indústria (Figura 5). Esse ponto ao contrário dos outros está localizado na parte revestida do canal. Os demais pontos estão localizados ao longo do principal canal condutor de vinhaça. A seguir na figura 6, encontra-se uma ilustração dos pontos de coleta de GEE no canal condutor de vinhaça.



Figura 5 - Ponto de coleta de GEE na parte revestida do canal condutor de vinhaça

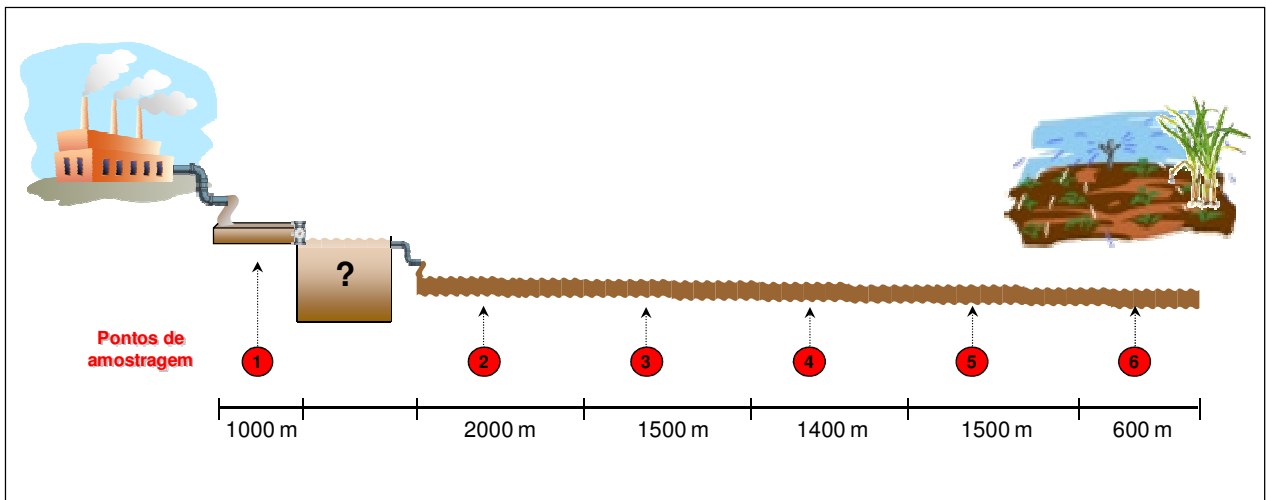


Figura 6 - Esquema ilustrando o canal de distribuição de vinhaça da Usina Iracema e a localização dos seis pontos de amostragem de GEE

As amostragens para determinação dos fluxos de GEE foram realizadas em junho e julho de 2010, representando o período intermediário da safra. Em cada ponto de amostragem, foram utilizadas três câmaras estáticas flutuantes para coleta dos GEE (Figura 7). Estas câmaras foram confeccionadas em alumínio e apresentam dimensões de 26 cm de altura e 29 cm de diâmetro, com um volume interior de 26 litros. Foi acoplado ao redor desta câmara um flutuador, o qual foi ajustado com o objetivo de manter um volume interno da câmara de 19 litros. Depois de instalada na superfície da vinhaça, as câmaras permaneceram em breve repouso para estabilização da pressão interior. 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, 5, 10 e 20 minutos. Simultaneamente, em cada dia de amostragem, foram feitas medições de temperatura do ar no interior da câmara, temperatura da vinhaça, pressão atmosférica, além de medições do pH e da condutividade elétrica da vinhaça. Para as medidas de temperatura, utilizaram-se termômetros simples de mercúrio. O pH e a condutividade foram determinados utilizando um condutímetro microprocessado MARCONI MA 521.



Figura 7 - Sistema de coleta de GEE no do canal de distribuição de vinhaça na Usina Iracema

3.4 Estudo 2: Avaliação dos fluxos de GEE emitido pelo solo devido à aplicação de vinhaça

3.4.1 Descrição da área de estudo

O experimento para avaliação dos fluxos de GEE oriundos da aplicação de vinhaça no solo foi realizado em julho de 2009. Este estudo foi instalado na gleba 1043 da Usina Iracema, cultivada com cana-de-açúcar da variedade RB 855156. A área avaliada possui solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico e apresenta dois tipos de manejo na colheita da cana-de-açúcar: colheita manual com a queima prévia da palhada e colheita mecanizada. Na área de estudo, a cana-de-açúcar foi plantada no ano de 2007 e estava no 2º ciclo de produção no momento da instalação do experimento. No plantio da cana-de-açúcar, em 2007, efetuou-se a reforma da área de acordo com o sistema de preparo adotado pela usina, o qual consistiu na eliminação mecânica da soqueira, seguida de subsolagem na linha de plantio de cultivo e subsolagem cruzada. A adubação de plantio aplicada na área foi de 390 kg ha⁻¹ de NPK (12-00-36), 20 Mg ha⁻¹ de torta de filtro e 200 m³ ha⁻¹ de vinhaça.

Para obtenção dos fluxos de GEE resultantes da aplicação da vinhaça no solo sob cultura da cana-de-açúcar foram avaliadas as seguintes variáveis: i) sistemas de colheita mecanizada e manual com queima prévia da palhada; ii) aplicação de água (testemunha) e de vinhaça no solo. A quantidade de vinhaça aplicada no solo foi de 200 m³ ha⁻¹, equivalente à média aplicada na Usina Iracema. Para avaliação das emissões de GEE oriundas do nitrogênio presente na vinhaça,

foi realizada irrigação com a mesma lâmina de água ($200 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$), a qual serviu como testemunha neste estudo. A seguir está apresentada a descrição dos tratamentos e das respectivas siglas a serem usadas:

- Cana queimada com aplicação de água (CQA)
- Cana queimada com aplicação de vinhaça (CQV)
- Cana crua com aplicação de água (CCA)
- Cana crua com aplicação de vinhaça (CCV)

A Figura 8 ilustra o esquema de instalação das câmaras para coleta dos GEE resultantes da aplicação de vinhaça no solo em solos com cana-de-açúcar com e sem queima prévia da palha.

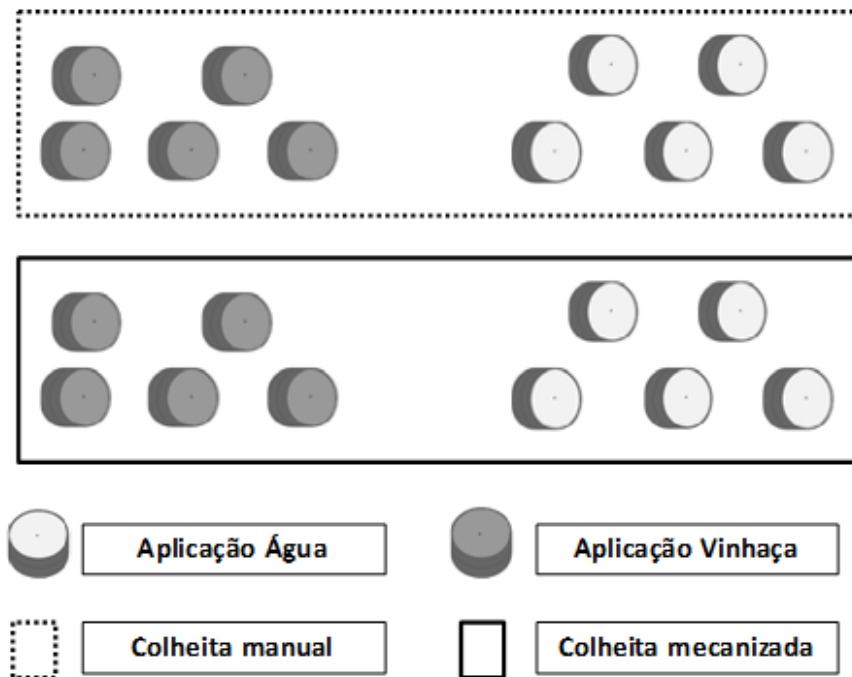


Figura 8 - Croqui do experimento com a distribuição dos tratamentos: CCA, CCV, CQA e CQV

3.4.2 Caracterização do solo nas áreas em estudo

A amostragem para a caracterização do solo nas áreas foi realizada em julho de 2009. As amostras de solo foram coletadas em cinco mini-trincheiras para cada tratamento. Em cada mini-trincheira foram coletadas amostras de solo nas camadas 0-10, 10-20 e 20-30 cm. Para determinação da densidade coletou-se amostras indeformadas de solo usando um cilindro de aço inox (5 x 5 cm).

As amostras de solo foram secas em estufa à 45° C, destorroadas, homogeneizadas e passadas em peneira de 2 mm para posterior análise. As amostras para determinação de C e N total foram moídas manualmente e passadas em peneira de 100 mesh (0,150 mm). O conteúdo de C e N total foi determinado em combustão a seco no equipamento Carbon Analyzer – LECO® CN-2000, conforme descrito por Nelson e Sommers., (1982). A densidade do solo foi determinada pelo método do cilindro volumétrico, utilizando cilindros de aço inox com volume interno de 98,03 cm³.

As análises químicas de pH, fósforo (P) e cátions trocáveis (Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺) foram realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo da ESALQ-USP. As análises dos teores de C e N total, densidade e textura do solo foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (CENA/USP). A seguir estão apresentados os resultados de teor de argila e da caracterização química do solo (Tabela 1).

Tabela 1 - Teor argila, valores de pH, P disponível, bases trocáveis (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺), acidez potencial (H+Al), CTC potencial (T) e saturação por bases (V %) nas respectivas camadas de solo. Valores representam a média de cinco repetições

Camada de solo cm	Teor de argila g kg ⁻¹	pH H ₂ O	P disp. mg dm ⁻³	Bases trocáveis			H+Al	T	V %
				K	Ca	Mg			
Cana queimada									
0-10	594	5,1	32	10	21	8	31	70	55
10-20	594	5,0	30	4	41	8	23	90	69
20-30	612	5,1	31	4	28	7	34	78	56
Cana crua									
0-10	507	4,7	21	11	18	8	47	55	44
10-20	506	4,4	15	7	18	17	52	69	38
20-30	519	4,8	7	8	17	12	42	56	43

3.4.3 Caracterização da vinhaça aplicada no solo

Para caracterização físico-química da vinhaça utilizada no experimento de emissão de GEE proveniente do solo foi utilizada caracterização de rotina realizada pela própria Usina. Foram consideradas as análises de DQO, DBO, teor de N, K e condutividade elétrica. A realização dessas análises são importantes para detectar quais fatores poderiam interferir nas emissões GEE após a aplicação da vinhaça no solo.

3.4.4 Amostragem de GEE proveniente do solo após a aplicação de vinhaça

A amostragem dos GEE do solo foi realizada no período de julho a agosto de 2009, iniciando no dia da aplicação de vinhaça no solo. As amostragens foram realizadas diariamente até o quinto dia após aplicação. A partir de então, a amostragem foi realizada a cada dois dias, sendo finalizada no 15º dia. Dessa forma, foram realizadas 10 amostragens nos dias: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 após a aplicação da vinhaça no solo.

Em cada uma das áreas avaliadas (CQA, CQV, CCA e CCV) foram instaladas cinco câmaras estáticas para coleta de amostras de GEE, conforme metodologia descrita por Steudler et al. (1991). As câmaras são constituídas de duas partes (base e tampa), totalizando volume interno médio de 4,60 litros. A base foi fixada ao solo para permitir repetidas amostragens de GEE no mesmo local. Durante a medida dos fluxos dos GEE foi colocada uma tampa hermeticamente fechada sobre a base, onde coletaram-se amostras em seringas de nylon tipo BD de 20 mL, em intervalos regulares de 0, 5, 10 e 20 minutos (tempos considerados após o fechamento da tampa) (Figura 9). As amostragens foram iniciadas sempre às 14h00, considerando este horário como representação da média diária. Durante o período de coleta foram avaliadas também a umidade do solo, a pressão atmosférica e a temperatura do solo nas profundidades 5 e 10 cm.



Figura 9 - Câmara e seringas utilizadas na amostragem de GEE do solo

3.5 Análises de GEE provenientes dos estudos

Após as coletas no campo, as amostras de GEE provenientes do canal condutor de vinhaça e do solo sob cultivo da cana-de-açúcar foram encaminhadas ao Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (CENA-USP) para análises. A determinação das concentrações de CO₂, N₂O e CH₄ foi realizada por cromatografia gasosa no equipamento Shimadzu GC-2014®. Os gases CO₂ e N₂O foram detectados por ECD (Electron Capture Detector), enquanto que o CH₄ foi 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):

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

Onde:

$(d[\text{GEE}]/dt)$ = alteração da concentração do GEE em função do tempo (mol gás mol⁻¹ s⁻¹);

(Vh) = volume da câmara utilizada na amostragem (m³);

(A) = área da câmara (m²);

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

(VM) = volume molar da câmara (m³ mol⁻¹).

As emissões médias diárias de CO₂, N₂O e CH₄ foram obtidas pelo valor médio das três câmaras em cada um dos pontos de coleta ao longo do canal de vinhaça.

Para a avaliação das emissões de GEE provenientes do solo, foi calculada a emissão total de cada GEE durante toda avaliação, utilizando a integração das curvas, obtendo-se então a quantidade de GEE emitida no período. A partir destas informações foram calculadas as emissões resultantes da aplicação de vinhaça no solo. Em seguida, foi calculado o fator de emissão para N₂O em função da aplicação de nitrogênio no solo na forma de vinhaça. Este cálculo levou em consideração a dose de vinhaça aplicada no solo (200 m³) e o conteúdo de nitrogênio presente na vinhaça (0,23 g L⁻¹).

3.6 Conversão dos fluxos de N-N₂O e C-CH₄ em CO₂ equivalente

Para a obtenção do balanço geral do GEE, foi realizada a conversão dos fluxos de N₂O e CH₄ em CO₂ equivalente (CO₂ eq). A conversão dos fluxos de N₂O e CH₄ para CO₂ eq é necessária, uma vez que cada GEE possui um PAG diferente. A estimativa do cálculo dos fluxos de N₂O e CH₄ em CO₂ eq, está apresentada nas equações (2) e (3).

$$\text{CO}_2 \text{ eq (N}_2\text{O)} = \text{N}_2\text{O} * (44/28) * 298 \quad (2)$$

$$\text{CO}_2 \text{ eq (CH}_4\text{)} = \text{CH}_4 * (16/12) * 25 \quad (3)$$

Onde:

N₂O = fluxo de N₂O na situação

CH₄ = fluxo de CH₄ na situação

(44/28) = relação entre o peso molecular do N₂O e do nitrogênio

(16/12) = relação entre o peso molecular do CH₄ e do carbono

298 = potencial de aquecimento global do N₂O em relação ao CO₂

25 = potencial de aquecimento global do CH₄ em relação ao CO₂.

3.7 Estudo 3: Análises moleculares microbianas

Visando a obtenção da correlação entre as comunidades metanogênicas e emissão de CH₄ da vinhaça, foi realizado estudo de caracterização da estrutura e do perfil dessas comunidades presentes no sedimento do canal de vinhaça.

3.7.1 Coleta das amostras

Amostras de sedimento foram coletadas em diferentes pontos do principal canal condutor de vinhaça da Usina Iracema. Foram selecionados quatro pontos de amostragem, escolhidos de forma que representasse o perfil da comunidade de *archaeas* totais e metanogênicas presente no sedimento do canal. Esses pontos fazem parte dos seis pontos onde se realizaram as amostragens de GEE.

Em cada ponto foi inserido tubos de PVC de aproximadamente 60 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro, fornecendo um perfil vertical do sedimento. Na amostragem foi considerada somente a camada 0-10 cm. Para cada amostra utilizou-se 250 mg do sedimento para extração de DNA e 100 g para caracterização físico-química do sedimento.

3.7.2 Extração do DNA, PCR e DGGE

A extração do DNA do sedimento do canal de vinhaça foi realizada com a utilização do *Kit de Extração Power Soil DNA* (MoBIO, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade aproximada de DNA foram conferidas em gel de agarose 1% e também em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Para estudo dos grupos de micro-organismos de interesse realizou-se amplificação das amostras de DNA extraídos do sedimento de vinhaça através de iniciadores (*primers*) específicos aos grupos de interesse (Tabela 2).

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

Primer	Especificidade	Seqüência (5'-3')	Grupo Alvo	Referência
ARCH 21f		5' - TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA - 3'		MOYER et al, (1998)
ARCH 958r		5' - YCC GGC GTT GA (I/C) TCC AAT T - 3'		MOYER et al, (1998)
ARCH 340f GC	rDNA 16 S	5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GAT CGG GGG GCC CTAV CGG GEY GCA SCA G - 3'	<i>Archaea</i> total	ØVREÅS et al. (1997)
ARCH 519r		5' TTA CCG CGG CKG CTG 3'		ØVREÅS et al. (1997)
MLf		5' TGGTGTMMGGATTCACAC ARTAYGCWACAGC 3'		LUTON. (2002)
MLrGC	Gene <i>mcrA</i>	5' TTCATTGCRTAGTTWGG RTAGTT 3'	<i>Archaeas</i> metanogênicas	LUTON. (2002), MUYZER et al. (1993)

O produto de PCR para *Archaeas* foi obtido através de uma pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C (21F e 958R) por 30 segundos, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Após verificação da amplificação realizou-se Nested das amostras com utilização dos *primers* (340F GC e 519R), as condições de amplificação foram as mesmas da primeira amplificação, somente a temperatura de anelamento foi mudada para 55,8°C.

O produto de PCR para *Archaeas* metanogênicas foi obtido através de uma pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos e 33 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 55°C (MIF e MlrGC) por 50 segundos, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após obtenção dos produtos de PCR realizou-se a purificação dos produtos de PCR de *Archaeas* metanogênicas, utilizando o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare de acordo com as instruções do fabricante). Tanto para os produtos de PCR de *archaeas* como para o DNA purificado de *mcrA* uma alíquota de 5 µl do DNA purificado foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de Low mass DNA Ladder (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 30 minutos e foto documentado.

Os fragmentos amplificados foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturalante (DGGE) (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993). Para *Archaea* total foi realizado gel de poliacrilamida (8%) e para *mcrA* foi realizado gel de poliacrilamida (6%). A corrida dos géis foi efetuada em aparelho *phorU2* (Ingeny, Leiden, The Netherlands,) e o gradiente de desnaturação para *archaea* total foi 45% (Low) e 70% (High) e para *mcrA* foi de 25% (Low) e 50% (High).

Para o preparo dos gradientes *Low* e *High* foram utilizadas dois tipos de soluções: solução A- (Acrilamida 8%) e solução B (Acrilamida 8%, Uréia 5,6M e Formamida deionizada 32%) e adicionado 75 µL de APS 20% e 12 µL TEMED.

Em seguida, as soluções foram misturadas em uma bomba misturadora, após 50 minutos, o *Stacking* foi confeccionado com: 7 mL de poliacrilamida da solução A, 45 µL de APS 20% e 10µL de TEMED. Após esse procedimento aguardou-se 60 minutos para a polimerização do gel. Aproximadamente, 6 µL dos produtos de PCR tanto para *archaea* total quanto para *mcrA*, juntamente com 2 µL de tampão de carregamento foram aplicados ao gel. Após aplicação das

amostras, o mesmo foi submetido a um campo elétrico de 90 V e o tempo de corrida foi de 16 horas.

Os géis foram corados com Nitrato de Prata 0,15%. A primeira etapa da coloração foi realizada com Solução Fixadora (Etanol 10% e Acido Acético 0,5%) por 15 minutos, seguidos da coloração em solução de Nitrato de Prata 0,15% agitado gentilmente por 15 minutos e revelados em solução Reveladora (400 µL de Formaldeído e 100 mL NaOH 1,5%) até a intensidade desejada. Para interromper o processo de revelação foi utilizado solução de Parada (Na_2CO_3 0,75%) por 10 minutos e o gel foto documentado em um Scanner HP G4050.

3.8 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada considerando delineamento inteiramente casualizado com cinco pseudo-repetições em cada um dos tratamentos para fluxos do solo e com três pseudo-repetições para fluxos da vinhaça. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Aplicou-se teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias entre os tratamentos. Estas análises foram realizadas com a utilização do programa ASSISTAT 7.5.

Para as análises dos perfis de DGGE e criação de uma matriz de presença/ausência dos dados, utilizou-se o programa BioNumerics 6. Análises de Cluster e PCA (*Multidimensional Scaling*) foram realizadas no mesmo programa, adotando como matriz de similaridade o coeficiente de Jaccard. A partir da matriz de presença e ausência, uma Análise de Similaridade (ANOSIM) foi gerada pelo programa PAST (HAMMER et al., 2001).

Uma análise de gradiente direto foi efetuada no programa Canoco 4.5, a qual buscou demonstrar a variabilidade na distribuição espacial das amostras e correlacioná-las, individualmente, com os atributos ambientais (LEPS; SMILAUER, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Emissões de GEE provenientes da vinhaça no canal de distribuição

4.1.1 Caracterização química da vinhaça

As análises químicas para caracterização da vinhaça presente no principal canal condutor da Usina Iracema foram realizadas durante o período de coleta de amostras de GEE. Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 3. E a maioria destas análises está baseada nos parâmetros citados no boletim da CETESB nº 195-2005-E, de 23/11/2005 intitulado de “Vinhaça – Critérios e Procedimentos para Aplicação em Solos Agrícolas”. Foram realizadas análises de potencial redox, DBO, DQO, C, N, K e condutividade elétrica.

Apesar do Potencial Redox não estar presente no boletim da CETESB essa análise foi realizada por indicar se havia condições necessárias para presença de micro-organismos anaeróbios, uma vez que o foco da pesquisa é a emissão de CH₄ proveniente da vinhaça. Todos os valores de Potencial Redox foram negativos e ainda pôde-se observar tendência de redução desses valores de acordo com o aumento da distância dos pontos da indústria (Tabela 3). O declínio de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos micro-organismos aeróbios) para condições redutoras (favoráveis aos processos de anaerobiose) (BORDEN; GOMES; BECKER, 1995).

Observou-se uma variação acentuada nos valores de DBO e DQO da vinhaça. De modo geral foi verificada tendência de redução da DBO e DQO de acordo com o aumento da distância entre o canal condutor de vinhaça e a Usina. Os valores de DBO e DQO observados estão dentro dos limites estabelecidos pela CETESB para efluentes da indústria do setor sucroenergético. A avaliação da DBO expressa o consumo de oxigênio (O₂) por micro-organismos e pode ser considerada indicador de quantidade de matéria orgânica (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB, 2010). A redução nos valores de DBO no decorrer do canal de vinhaça provavelmente está associada ao processo de decomposição do resíduo e tempo de permanência no canal.

A análise de DQO é muito útil quando utilizada em conjunto com a DBO para observar biodegradabilidade de resíduos, porém o poder de oxidação de um agente químico, utilizado na

DQO, é maior que o dos micro-organismos utilizado na DBO, por isso os valores de DQO são sempre maiores que os valores de DBO (CETESB, 2010).

Observou-se redução acentuada no conteúdo de C total nos primeiros pontos de coleta (P1, P2 e P3). A partir de então as variações foram reduzidas, tendendo à estabilidade. A queda acentuada nas quantidades de C na vinhaça provavelmente está associada à redução da carga orgânica resultante, principalmente, das reações de decomposição, as quais ocasionaram perdas gasosas de CO₂ e CH₄.

Diferente das demais variáveis analisadas, as quais obtiveram decréscimos nos valores conforme os pontos do canal se distanciavam da usina, a quantidade de N total demonstrou pequena variação ao longo do canal. Os valores de condutividade elétrica variaram de 15,6 a 7,7 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente para P1 e P6. Assim como DBO, DQO e C os valores diminuíram com o tempo de permanência do resíduo no canal. A grande quantidade de matéria orgânica não decomposta presente nos primeiros pontos do canal pode ter influenciado a condutividade elétrica. Mariano (2006) confirma que os maiores valores de condutividade estão totalmente relacionados à alta concentração de sais dissolvidos na vinhaça, principalmente o potássio (K).

Tabela 3 - Caracterização química da vinhaça da Usina Iracema. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de coleta

Pontos de Coleta	Potencial Redox	DBO	DQO	C	N	K	Condutividade Elétrica
	mV						
P1	-25,5	14970	31150	10170	265	3278	15,6
P2	-43,6	3571	11060	3468	394	1648	12,2
P3	-71,7	1478	6160	1529	272	1112	10,3
P4	-59,8	1267	6730	1993	340	979	8,5
P5	-45,8	3421	7270	1562	198	917	8,7
P6	-90,6	1484	6860	1417	402	838	7,7

4.1.2 Temperatura e pH da vinhaça

Juntamente às amostragens de GEE, foi quantificado a temperatura (°C) e o pH da vinhaça (Figura 10 a e b). Tais parâmetros são fundamentais para a decomposição da matéria orgânica e pequenas variações podem afetar a atividade microbiana necessária para realização deste processo.

Os dados de temperatura mostram que houve variações significativas desse parâmetro entre os seis pontos de amostragem. Observou-se maior temperatura em P1, (valor médio de 48°C). Tal fato está associado a este ponto de coleta estar posicionado no início do canal de distribuição, onde a vinhaça atinge temperaturas de até 60°C. Nos demais pontos de coletas observaram-se redução gradativa da temperatura com tendência à estabilidade a partir de P5.

O pH da vinhaça nos pontos de coleta variou entre 4,5 e 5,1. Embora estes valores possam ser considerados baixos para atividade microbiana em geral, não houve interferência deste parâmetro nas emissões de GEE.

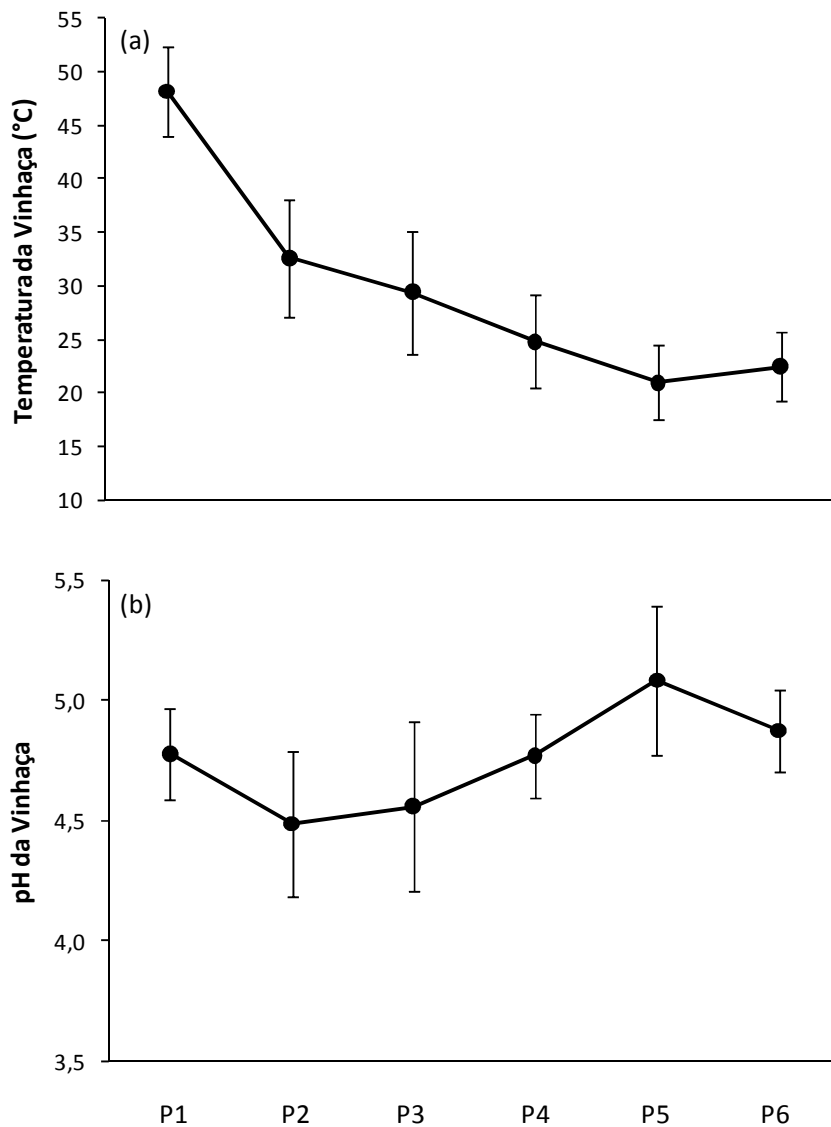


Figura 10 - Temperatura e pH da vinhaça em todos os pontos de amostragem. Os valores representam média de 15 repetições. Barras representam o desvio padrão da média. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de amostragem

4.1.3 Fluxos de C-CO₂

Considerando todo o período de avaliação (15 coletas de GEE), as emissões médias obtidas foram de 1642, 2396, 1988, 1883, 1717 e 834 mg C-CO₂ m⁻² h⁻¹ respectivamente para P1, P2, P3, P4, P5 e P6 (Figura 11 a). Foi verificada diferença significativa entre os pontos de coleta (P<0,05).

Com exceção de P1, o qual possui características diferenciadas em relação aos outros pontos, como fluxo de vinhaça mais rápido, revestimento do canal com cimento e ainda temperaturas mais elevadas por ser localizado dentro da Usina, observou-se redução gradativa da emissão de C-CO₂ em função da distância dos pontos da saída de vinhaça da indústria. A maior emissão foi evidenciada em P2, exibindo variação de 672 mg C-CO₂ m⁻² h⁻¹ (9º dia de coleta) a 3523 mg C-CO₂ m⁻² h⁻¹ (2º dia de coleta) (Anexo A). A menor emissão média de C-CO₂ foi observada em P6, ponto mais distante da indústria.

O declínio das emissões de C-CO₂ ao longo do canal condutor deve-se provavelmente, ao processo de decomposição da vinhaça, o qual ocasiona redução dos conteúdos de C (Tabela 3). O processo de decomposição é iniciado no momento em que as condições da vinhaça, sobretudo a temperatura, são favoráveis. Assim como verificado no presente estudo, outros autores ressaltam que substratos considerados prontamente assimiláveis ou decomponíveis, como é o caso da vinhaça, são rapidamente decompostos e se transformam rapidamente em CO₂ (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Estudos avaliando as emissões de CO₂ provenientes de dejetos líquidos de suínos, também verificaram uma fase inicial de rápida liberação de CO₂, seguida de outra mais lenta (AITA; 1996, SILVA, 2009).

Outro fator determinante da taxa de decomposição de resíduos orgânicos e conseqüente emissão de C-CO₂ é a presença de N na vinhaça. A presença de C e de energia nos materiais orgânicos em decomposição aumenta a população microbiana e conseqüentemente a atividade microbiológica. Tal fato implica no aumento da demanda de N pelos micro-organismos decompositores e aumenta rapidamente a taxa de liberação de CO₂ (SILVA, 2009). Dessa forma, nutrientes como os íons NH₄⁺ e NO₃⁻, são absorvidos pelos micro-organismos, ficando indisponíveis (imobilizados). A ciclagem do C e do N no solo, durante o processo de decomposição, estão diretamente relacionados, já que a assimilação de C deverá ser acompanhada da assimilação simultânea de N (MARY et al., 1996).

Não foi observada correlação significativa entre a emissão de C-CO₂ e os valores de pH em nenhum dos pontos de coleta. Já quando se avaliou as correlações entre emissão de C-CO₂ e temperatura foram observadas interações significativas em P3 e P4 (Tabela 4). A temperatura pode tanto acelerar como reduzir o processo de decomposição, influenciando diretamente os organismos decompositores (ESPÍNDOLA et al., 2006; TORRES et al., 2007) e conseqüentemente as emissões de CO₂ para atmosfera.

4.1.4 Fluxos de N-N₂O

Apesar de positivos, os fluxos de N-N₂O provenientes do canal de vinhaça foram muito baixos, tendendo a zero. Não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os pontos de coleta, e os valores médios de emissão de N-N₂O foram de 0,12; 0,50; 0,25; 0,51; 0,28 e 0,57 mg m⁻² h⁻¹, respectivamente para P1, P2, P3, P4, P5 e P6 (Figura 11 b). Esses resultados demonstram que neste ambiente não ocorre formação de N₂O em quantidades significativas. Não foi verificada diferença estatística significativa entre os tratamentos, tampouco correlação das emissões com valores de pH. Com exceção de P6, nos demais pontos não foram verificadas correlações significativas entre as emissões de N-N₂O com os valores de temperatura (Tabela 4).

Como já citado anteriormente a quantidade de N é essencial para decomposição de materiais orgânicos, provavelmente a quantidade de N presente na vinhaça foi assimilada pelos micro-organismos ou perdida por lixiviação, não ocasionando eliminação para atmosfera na forma de N-N₂O.

4.1.5 Fluxos de C-CH₄

Pôde-se verificar variação significativa (P<0,05) dos fluxos de C-CH₄ entre os pontos de coleta. As emissões médias de C-CH₄ foram de 386, 1263, 1085, 1163, 1431 e 427 mg m⁻² h⁻¹, respectivamente para P1, P2, P3, P4, P5 e P6 (Figura 11 c).

Menores valores de emissão observados em P1 são resultantes da alta temperatura da vinhaça neste ponto (média aproximada de 48°C), a qual exerce efeito determinante sobre a comunidade metanogênica. Estudos indicam que a temperatura ótima para realização da metanogênese é de 30 a 40°C, e que valores superiores ou inferiores a esses podem reduzir tanto

a atividade de *archaeas* metanogênicas como de outros micro-organismos envolvidos no processo (LE MER; ROGER, 2001). Apesar de a temperatura ser o fator de maior interferência na emissão de C-CH₄, vale salientar que P1 possui características diferenciadas em relação aos outros pontos. Vale ainda ressaltar, que por P1 ser o único ponto revestido com cimento, ocorre menor formação de nichos microbiológicos para produção de CH₄.

Nos pontos intermediários (entre P2 e P5), onde o canal apresentou características semelhantes, não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$). A maior emissão de CH₄ nesses pontos provavelmente está associada às condições favoráveis à anaerobiose resultante do fluxo contínuo de vinhaça e ao grande volume de material orgânico sedimentado no canal.

O último ponto de avaliação (P6), exibiu menor emissão de CH₄ em relação aos demais pontos do canal de distribuição (P2 a P5). Por ser considerado o ponto mais afastado da Usina, verificou-se na época de amostragem de GEE que não era todos os dias que a lâmina de vinhaça encobria o sedimento presente no canal. Dessa forma, entende-se que é a lâmina de vinhaça que proporciona o ambiente de anaerobiose necessário para ocorrência da metanogênese e que a ausência desta ocasiona menor produção de CH₄. Outro fato importante a ser salientado está relacionado à menor carga orgânica da vinhaça neste ponto, o que resulta em menor quantidade de C disponível para ser perdido na forma de CH₄.

Foram observadas correlações significativas entre o aumento da emissão de C-CH₄ e a temperatura da vinhaça nos pontos P1, P3 e P4 (Tabela 4). Entretanto, não foi verificada tendência lógica nessas correlações e não foi possível tirar conclusões sobre o assunto. O pH da vinhaça não influenciou significativamente as emissões de C-CH₄ e dessa forma não foram observadas correlações significativas entre parâmetros.

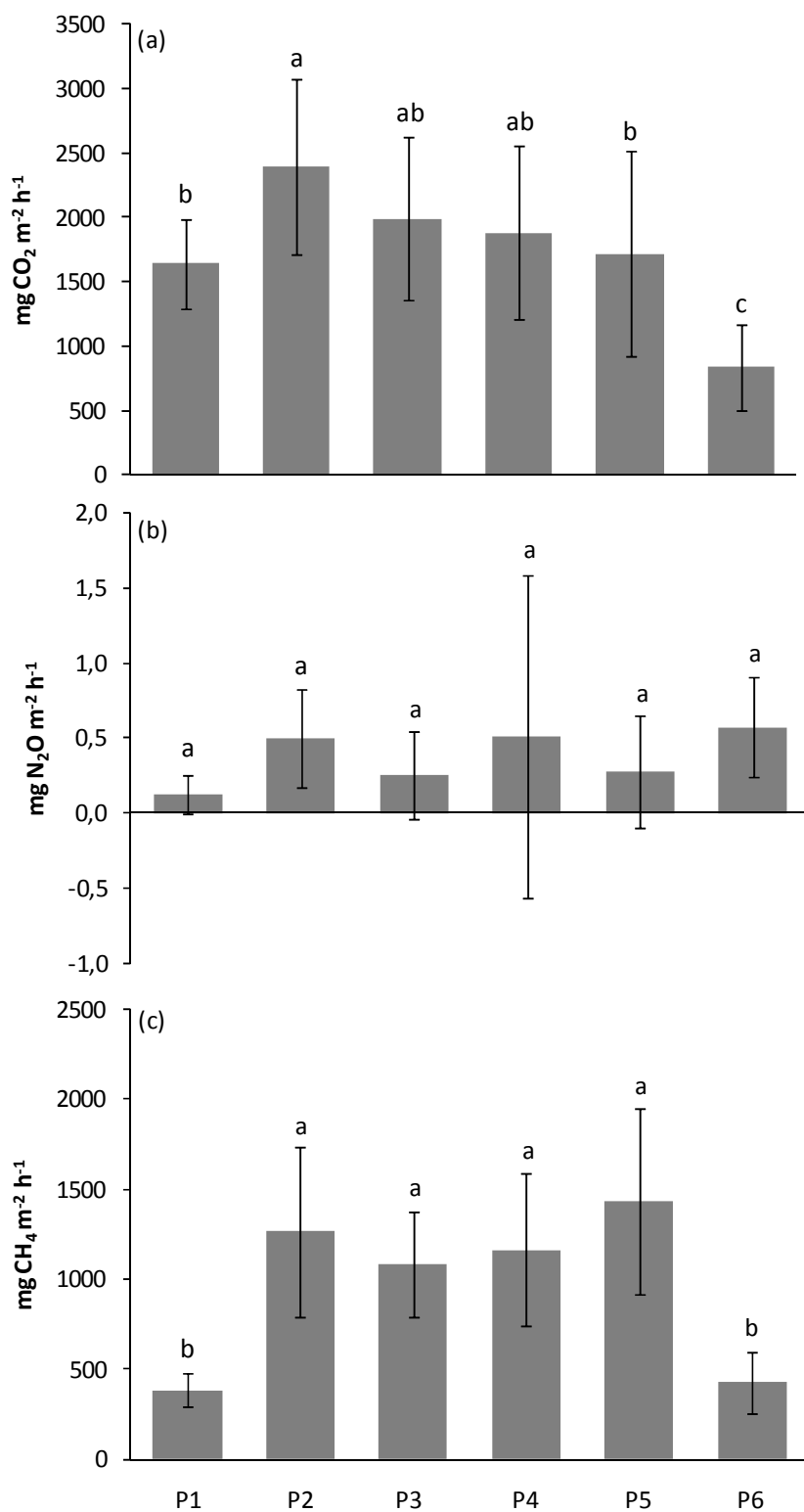


Figura 11 - Fluxos médios de C-CO₂ (a), N-N₂O (b) e C-CH₄ (c), provenientes da vinhaça da Usina Iracema. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão da média. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de amostragem

Tabela 4 - Coeficientes de correlação entre os fluxos de GEE (CO₂, N₂O e CH₄) e a temperatura e pH da vinhaça nos diferentes pontos avaliados. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de amostragem

GEE	Pontos de amostragem					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
	Temperatura					
C-CO ₂	-0,44 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,80**	0,64*	0,48 ^{ns}	0,45 ^{ns}
N-N ₂ O	-0,08 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,08 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,28 ^{ns}	-0,54*
C-CH ₄	0,65**	-0,02 ^{ns}	0,56*	0,59*	0,42 ^{ns}	0,24 ^{ns}
	pH					
C-CO ₂	0,21 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,10 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,12 ^{ns}
N-N ₂ O	0,43 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,09 ^{ns}
C-CH ₄	0,12 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,39 ^{ns}	-0,06 ^{ns}

4.1.6 Conversão dos fluxos de N-N₂O e C-CH₄ em CO₂ equivalente

Quando se deseja realizar o cálculo da emissão total de GEE em um determinado sistema é necessário realizar a conversão dos fluxos de N-N₂O e C-CH₄ para CO₂ equivalente para então somá-los ao fluxo de CO₂. No caso da indústria sucroenergética os fluxos de C-CO₂ provenientes da decomposição da vinhaça não precisam entrar neste cálculo, uma vez que este gás é cíclico no sistema e pode ser reassimilado através da fotossíntese da cultura da cana-de-açúcar (CERRI et al., 2004). Na Tabela 5 estão apresentados os fluxos de N-N₂O e C-CH₄ convertidos em CO₂ equivalente. Levando em consideração toda área útil do canal (comprimento x a largura) após a conversão, observou-se que a emissão diária de CH₄ foi de 16742 kg CO₂ eq, representando 99,84 % das emissões totais provenientes da vinhaça no canal de distribuição. As baixas emissões de N-N₂O, quando convertidas em CO₂ eq., representaram apenas 0,16 % das emissões totais.

Em seguida foi realizada a extrapolação das emissões por ano safra da Usina. Para realização desta extrapolação foram consideradas as seguintes informações: i) área útil do canal (comprimento X largura); ii) tempo médio que os canais ficam cobertos com vinhaça durante o ano/safra (244 dias – abril a novembro), iii) quantidade diária de cana-de-açúcar moída (15.000 t) e produção diária de vinhaça (7500 m³). A partir desses dados estimou-se que a vinhaça presente nos canais de distribuição emitirá aproximadamente 122 t de CO₂ eq durante a safra de 2010. Ponderando essa emissão total por m³ de vinhaça, conclui-se que o processo de transporte da vinhaça resulta em emissão média de 2,23 kg CO₂ eq m³ vinhaça transportada.

Tabela 5 - Conversão dos fluxos de N-N₂O e C-CH₄ em CO₂ eq. e extrapolação destes fluxos por safra e m³ de vinhaça transportada no canal de distribuição da Usina Itacema

N-N ₂ O	C-CH ₄	TOTAL
Emissão diária (kg dia ⁻¹)		
0,17	501,50	-
Emissão diária em CO ₂ equivalente (kg CO ₂ eq dia ⁻¹)		
26	16.717	16743
Emissão por safra (kg CO ₂ eq safra ⁻¹)		
43	122.366	122409
Emissão por m ⁻³ de vinhaça (kg m ⁻³)		
0,003	2,23	2,23

4.2 Emissões de GEE provenientes do solo com aplicação de vinhaça

4.2.1 Densidade e Estoque de C do solo

A densidade do solo e os estoques de C foram quantificados visando à caracterização das áreas no momento da implantação dos experimentos. A avaliação desses dois parâmetros se faz relevante pelo fato de estarem diretamente relacionados aos fluxos de GEE provenientes do solo.

A densidade é dependente da textura, do conteúdo de matéria orgânica e da estrutura do solo (BRAKENSIEK; RAWLS, 1983). A modificação da densidade afeta a estruturação do solo, o espaço poroso e conseqüentemente a difusão de GEE na matriz do solo (CARVALHO et al., 2010). Os valores de densidade não diferiram estatisticamente em nenhuma das áreas avaliadas. Ao considerar a densidade média para a camada 0-30 cm de solo, os valores foram de 1,34; 1,27; 1,27; 1,25 g cm⁻³, respectivamente para CQA, CQV, CCA e CCV (Tabela 6). Estes resultados evidenciam que não houve efeito significativo do sistema de colheita na compactação do solo.

Em estudo realizado em um Argissolo Amarelo cultivado com cana-de-açúcar, Pinheiro et al. (2007), observaram maior densidade em área com queima em relação à cana crua mecanizada. No mesmo sentido, Ceddia (1999) observou que o sistema de colheita mecanizada, sem queima prévia do canavial, favorece a formação dos agregados do solo, aumenta o conteúdo de C, resultando em diminuição da densidade e conseqüentemente da compactação de solo. Braida et al. (2006) concluíram que quanto maior a quantidade de palha adicionada ao solo, menor é a densidade. Por outro lado, outros estudos têm evidenciado aumento da densidade do solo em áreas sob colheita mecanizada (BRAUNACK; PEATEY, 1999; SOUZA et al., 2005).

Tabela 6 - Densidade do solo e estoque de C nas respectivas camadas do solo em áreas de cana queimada e cana crua. Valores representam média de cinco repetições. Médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

Camadas de Solo (cm)	Tratamentos			
	CQA	CQV	CCA	CCV
Densidade do solo (g cm^{-3})				
0-10	1,38 a	1,27 a	1,29 a	1,25 a
10-20	1,35 a	1,29 a	1,29 a	1,25 a
20-30	1,28 a	1,24 a	1,24 a	1,26 a
0-30	1,34 a	1,27 a	1,27 a	1,25 a
Estoque de C do solo (Mg ha^{-1})				
0-10	17,70 a	21,00 a	23,25 a	20,72 a
10-20	16,90 b	24,31 a	23,64 ab	18,64 ab
20-30	13,51 a	18,72 a	21,73 a	19,70 a
0-30	48,11 b	64,04 a	68,62 a	59,03 ab

Quanto aos estoques de C não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos na camada mais superficial do solo (0-10 cm) (Tabela 6). Na camada 10-20 cm de solo, houve algumas diferenças significativas. Quando se considerou estoque na camada 0-30 obtiveram-se diferenças significativas. Ao contrário do observado por diversos estudo da literatura (CANELLAS et al., 2003; RAZAFIMBELO et al., 2006; GALDOS; CERRI; CERRI, 2009), não foi observada tendência de maiores estoques de C na área de colheita mecanizada sem queima prévia da palha. O histórico de uso e manejo das áreas, juntamente com a variabilidade espacial do C do solo provavelmente estão relacionados com as variações dos estoques de C do solo nas áreas avaliadas. Outro ponto importante a ser mencionado está associado à reforma do canavial, o qual ocorreu dois anos antes do período de coleta e movimentou significativamente a camada superficial de solo.

4.2.2 Caracterização química da vinhaça aplicada no solo

As análises químicas para caracterização da vinhaça utilizada no experimento de avaliação dos fluxos de GEE provenientes do solo com aplicação de vinhaça foi realizada pela

própria Usina em julho de 2009. Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Essa caracterização é imprescindível para conhecimento de sua carga poluidora como também para verificar quais parâmetros pode interferir nas emissões de GEE.

Tabela 7 - Caracterização química da vinhaça da Usina Iracema aplicada no solo em fertirrigação

DBO	DQO	K	N	Condutividade Elétrica
-----mg L ⁻¹ -----				μS cm ⁻¹
4000	11958	1800	230	5,68

4.2.3 Umidade e temperatura do solo

Juntamente às amostragens de GEE provenientes do solo, foram realizadas quantificações da umidade (%) e da temperatura (°C) do solo (Figura 12 a e b). A importância de se avaliar estes fatores meteorológicos está associada à grande interferência desses parâmetros na atividade biológica do solo, nas condições de aerobiose e anaerobiose do solo e conseqüentemente na emissão de GEE para atmosfera.

De modo geral, não foram verificadas variações significativas na umidade do solo entre os tratamentos. Durante todo o período de avaliação, a umidade média foi de 22,1% para cana queimada (CQA e CQV) e 23,4% para cana crua (CCA e CCV). As maiores umidades foram verificadas após ocorrência de chuvas nos dias 3, 4 e 6, com precipitações diárias de 11, 20 e 4 mm, respectivamente.

As temperaturas do solo foram 0,6°C maiores na camada mais superficial (5 cm) para o sistema de colheita com queima prévia da palha. Na cana crua as temperaturas do solo foram praticamente iguais, com médias de 19,6 e 19,9° C para as camadas de 5 e 10 cm, respectivamente. Verificou-se que as menores temperaturas do solo foram registradas após a ocorrência de chuvas.

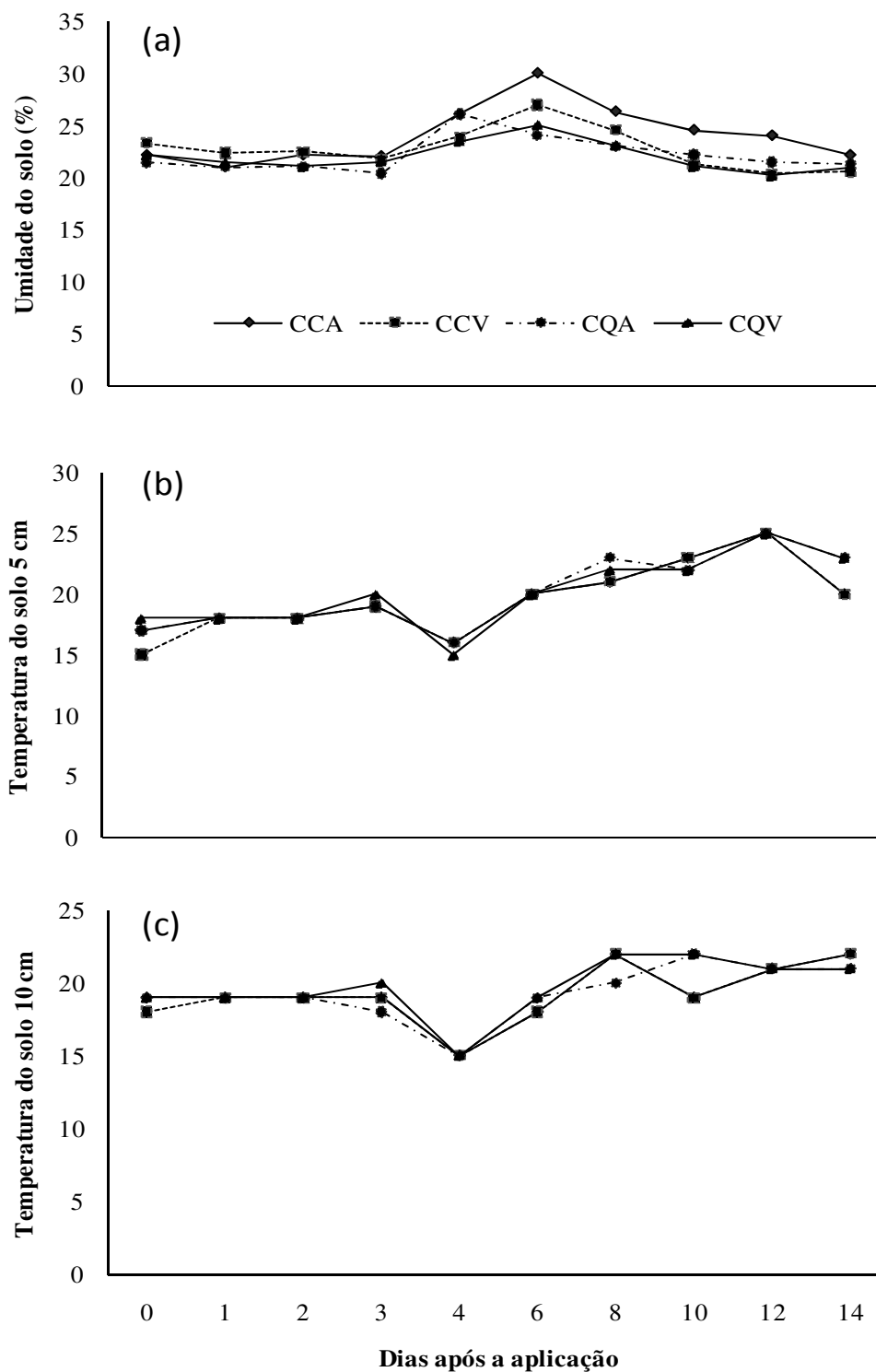


Figura 12 - Umidade (%) e temperatura do solo a 5 cm (b) e 10 cm (c) de profundidade em todos os tratamentos durante o período de amostragem. Os valores representam média de cinco repetições. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

4.2.4 Fluxos de C-CO₂

Considerando o período de amostragem (15 dias), os fluxos de C-CO₂ foram influenciados pela aplicação de vinhaça no solo nos dois sistemas de manejo (CQ e CC). Os fluxos de C-CO₂ observados neste estudo variaram de 46,6 a 368,5 e 31,0 a 683,6 mg m⁻² h⁻¹, respectivamente para CQA e CQV (Figura 13 a). Na área de cana crua os fluxos de C-CO₂ variaram de 39,2 a 144,0 e 136,7 a 470,0 mg m⁻² h⁻¹, respectivamente para CCA e CCV (Figura 13 b). O presente estudo observou emissões de C-CO₂ inferiores às obtidas em outras pesquisas para solos cultivados com cana-de-açúcar (LA SCALA JUNIOR et al., 2001; LA SCALA JUNIOR; BOLONHESE; PEREIRA, 2006)

Foi evidente o aumento do fluxo de C-CO₂ em até seis vezes da CQV em relação à CQA nos quatro primeiros dias de amostragem. A partir do quinto dia essa diferença começou a diminuir, até que no 14º dia não foram observadas mais diferenças entre os tratamentos. Tal fato indica que o tempo de acompanhamento deste estudo (15 dias), foi suficiente para avaliar os efeitos da vinhaça nas emissões de C-CO₂ do solo.

Considerando a emissão média durante todo o período avaliado, observou-se emissão de 98,7 e 336,3 mg C-CO₂ m⁻² h⁻¹, respectivamente para CQA e CQV. O principal fator que determinou aumento nos fluxos de C-CO₂, tanto para cana queimada quanto para cana crua, foi a aplicação de vinhaça no solo, uma vez que a umidade e temperatura do solo foram similares para as áreas sob o mesmo sistema de manejo. A emissão de C-CO₂ pelo solo é resultante de diferentes fatores como umidade, temperatura, quantidade e qualidade da MOS (OORTZ et al., 2007).

A aplicação de resíduos em solos agrícolas altera significativamente a ciclagem de C e N e conseqüentemente modificam a fertilidade do solo e os fluxos de GEE para a atmosfera. Embora tenha sido aceito por décadas que a qualidade dos resíduos culturais tinha pouca importância no manejo do C e N na agricultura (HALVIN et al., 1990), já foi demonstrado claramente que esta representa um papel relevante na transformação da matéria orgânica do solo, em ecossistemas intensivamente manejados (DRINKWATER et al., 1998).

Assim como na área sob cana queimada, os fluxos de C-CO₂ na área sob cana crua foram influenciados significativamente pela aplicação de vinhaça no solo. Além de sofrer decomposição liberando C-CO₂ para a atmosfera, neste sistema de colheita a vinhaça pode ainda influenciar diretamente a velocidade de decomposição da palha presente sobre o solo. Marques (2005)

avaliou a decomposição de resíduos culturais de milho em função da aplicação de dejetos líquidos e concluiu que apesar da emissão de C-CO₂ ser maior nos dejetos, a decomposição dos resíduos do milho aumentou em 21% com a aplicação dos dejetos.

Na área sob colheita mecanizada verificou-se que as emissões diárias de C-CO₂ foram maiores na área onde aplicou vinhaça até o 13º dia. Da mesma forma como evidenciado para cana queimada, observou-se que a emissão de C-CO₂ na área de colheita mecanizada no 14º dia se igualou em CCA e CCV. A emissão média em todo o período foi de 94,0 e 307,3 mg C-CO₂ m⁻² h⁻¹, respectivamente para CCA e CCV.

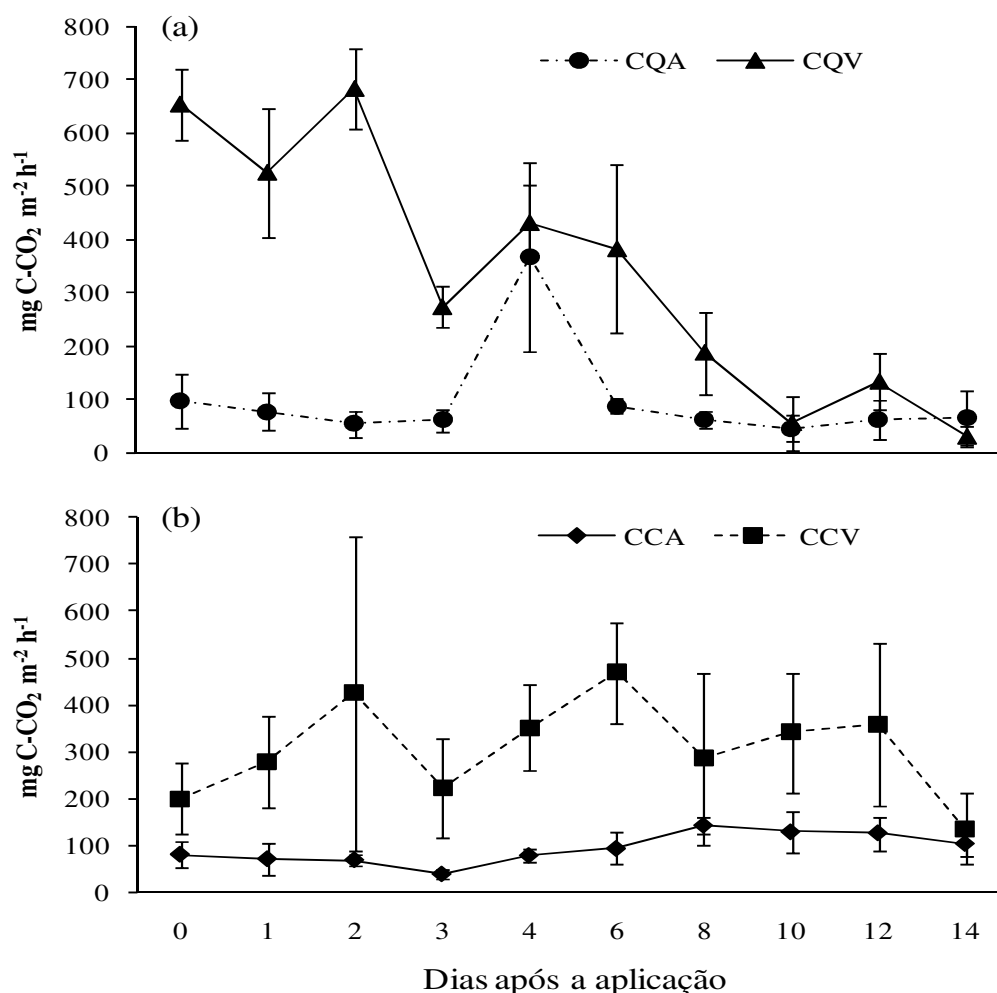


Figura 13 - Fluxos diários de C-CO₂ nos sistemas de colheita manual com queima (a) e colheita mecanizada (b). Valores representam média de cinco repetições. Barras representam o desvio padrão da média. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

Considerando o efeito da aplicação da vinhaça nas emissões acumuladas de C-CO₂ durante os 15 dias de avaliação, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os sistemas de colheita da cana-de-açúcar (Figura 14). A emissão acumulada de C-CO₂ foi de 33,2 e 96,3 g C-CO₂ m⁻², respectivamente em CQA e CQV. Na área sob colheita mecanizada, a emissão resultante da aplicação de vinhaça foi de 109,7 g C-CO₂ m⁻², enquanto que em CCA foi de 34,4 g C-CO₂ m⁻². As maiores emissões de C-CO₂ em ambos os sistemas de colheita foram verificadas quando aplicado vinhaça (Figura 14). Tal fato está associado à aplicação de matéria orgânica prontamente decomponível (vinhaça), a qual acelerou a atividade microbiana, ocasionando assim maior emissão de CO₂ do solo.

A aplicação de N no solo, seja via fertilizante nitrogenado ou aplicação de vinhaça, representa entrada de energia no sistema, a qual é usada pelos micro-organismos para a decomposição da MOS, aumentando as emissões de CO₂ (SIGNOR, 2010). Este processo é chamado de efeito *priming* e pode promover a decomposição até mesmo de compostos orgânicos recalcitrantes (FONTAINE et al., 2003). Entende-se por efeito *priming* a estimulação da mineralização da MOS, ou seja, mudanças intensas e de curta duração que ocorrem na reciclagem da MOS (KUZYAKOV; FRIEDEL; STAHR, 2000) a partir da introdução de fontes de C e N como resíduos orgânicos, os quais aumentam rapidamente a atividade microbiana, acelerando a mineralização e liberando os nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A aplicação de compostos com baixa relação C/N, como é o caso da vinhaça (relação C/N = 6,3; valor obtido no presente estudo), são mais facilmente decompostos pelos micro-organismos do solo, em relação àqueles com maior relação C/N, resultando em maiores fluxos de C-CO₂.

O sistema de colheita da cana-de-açúcar não influenciou significativamente as emissões acumuladas de C-CO₂ durante o período avaliado. A aplicação de água (testemunha) resultou em emissões médias muito semelhantes entre os dois métodos de colheita.

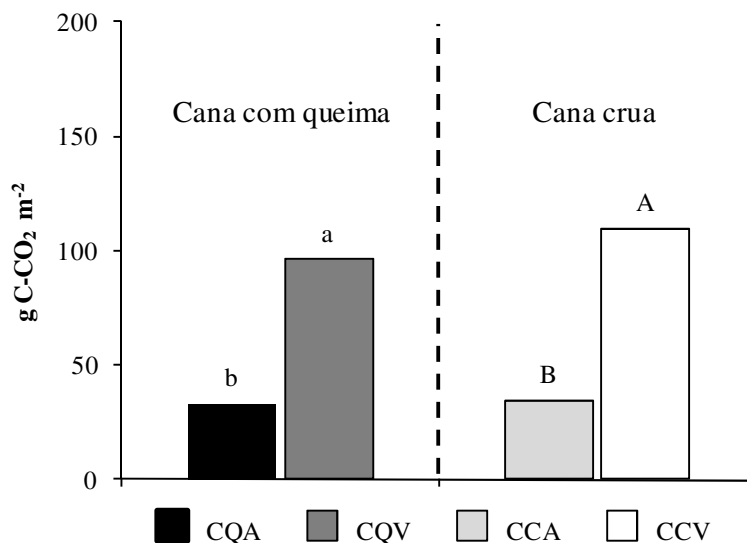


Figura 14 - Fluxos acumulados de C-CO₂ durante o período avaliado isolando o efeito da vinhaça. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey aos níveis de 5 % de probabilidade. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

4.2.5 Fluxos de N-N₂O

Com exceção do 1º dia de avaliação, os fluxos de N-N₂O observados nos demais dias foram positivos, evidenciando emissão desse GEE pelo solo. Na área sob colheita com queima prévia da palha, as emissões de N-N₂O variaram de -35,8 a 49,3 e de 11,8 a 327,0 μg⁻² h⁻¹, respectivamente para CQA e CQV (Figura 15 a). Na área sob cana crua, as emissões de N-N₂O variaram de -0,6 a 169,3 e 47,3 a 592,0 μg m⁻² h⁻¹, respectivamente para CCA e CCV (Figura 15 b).

Durante todo o período avaliado, a emissão média para CQA foi de 18,2 μg N-N₂O m⁻² h⁻¹, enquanto que para CQV foi de 130,0 μg N-N₂O m⁻² h⁻¹. A área sob cana crua exibiu fluxos médios de N-N₂O de 70,6 e 143,3 μg N-N₂O m⁻² h⁻¹, para CCA e CCV, respectivamente (Figura 15 b). Analisando tais resultados, é possível observar tendências de emissão mais acentuada de N-N₂O na área sob cana crua, o que comprova a influência da presença da palha nos fluxos desse GEE. Tal fato está associado ao aporte de N devido à manutenção da palha na superfície do solo e também como citado anteriormente para emissão de C-CO₂ à influência da vinhaça na velocidade da decomposição da palha.

Em ambos os sistemas de colheita, observou-se que a vinhaça potencializou as emissões de N_2O do solo até o 4º dia de avaliação. A partir do 5º dia não foram verificadas diferenças significativas, observando apenas algumas variações pontuais nos fluxos que provavelmente estão associadas a ocorrência de chuvas durante o período de avaliação.

A formação de N_2O no solo é favorecida quando aproximadamente 80% dos poros estão preenchidos por água (BOCKMAN; OLFS, 2008; DENMEAD et al., 2009). As maiores emissões de N_2O nos primeiros cinco dias de avaliação, estão associadas ao aporte de N e às condições de anaerobiose do solo, devido à aplicação de vinhaça. Em condições de anaerobiose, o processo de denitrificação ocasiona a conversão de NO_3^- em N_2O através da atividade de micro-organismos. (WEIER, 1999; DENMEAD et al., 2009). Em simulação de uma precipitação de 15 mm no norte da China, observou-se aumento na emissão de N_2O entre 0,28 e 0,30 kg N_2O ha⁻¹ ano⁻¹ (ZHANG; HAN, 2008).

A emissão de N_2O pelo solo pode ser resultante tanto do processo de nitrificação como de denitrificação, dependendo do grau de oxigenação do solo. Em condições de baixa saturação de água no solo prevalece a nitrificação. Já quando o solo se encontra saturado com água, sob baixa oxigenação, o processo responsável pela emissão de N_2O é a denitrificação (JANTALIA et al., 2006).

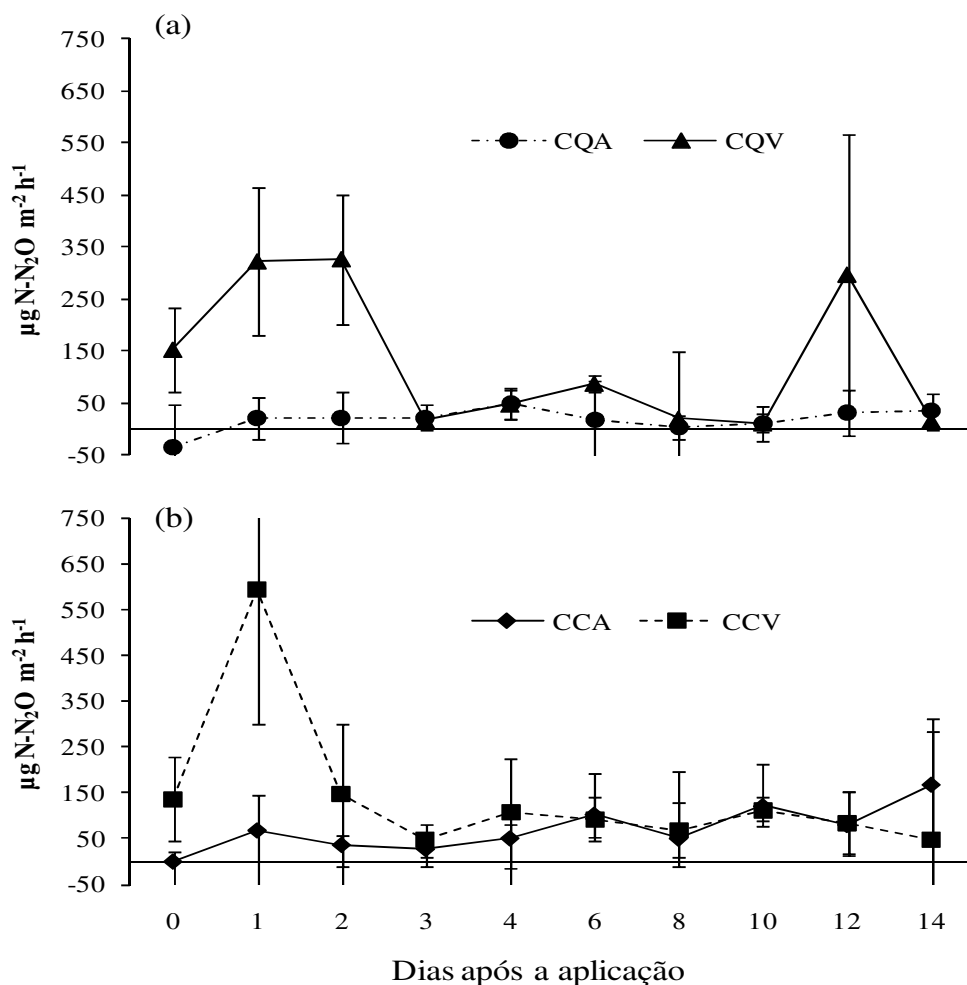


Figura 15 - Fluxos diários de N-N₂O nos sistemas de colheita manual com queima (a) e colheita mecanizada (b). Valores representam média de cinco repetições. Barras representam o desvio padrão da média. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

A aplicação de vinhaça influenciou significativamente as emissões acumuladas de N-N₂O durante os 15 dias de avaliação (Figura 16). A emissão total de N-N₂O no solo sob cana queimada com aplicação de vinhaça foi de 39,6 mg N-N₂O m⁻², e esta foi aproximadamente cinco vezes maior em relação à testemunha (8,1 mg N-N₂O m⁻²) (Figura 16 a). Da mesma forma, na cana crua a aplicação de vinhaça resultou em emissão de N-N₂O significativamente maior ($p < 0,05$).

As emissões acumuladas foram de 26,1 e 46,4 mg N-N₂O m⁻², respectivamente para CCA e CCV (Figura 16). De modo geral, na cana crua observou-se maior emissão de N₂O, o que

confirma a hipótese de que a adição de grandes quantidades de resíduos vegetais ao solo via palhada, resulta em mineralização de quantidades significativas de N, ocasionando perdas de N na forma de N_2O . A adição de resíduos vegetais na superfície do solo pode conservar a umidade e também adiciona grandes quantidades de C e N lábil em pequeno volume de solo, o que aumenta consideravelmente a atividade biológica na superfície do solo, consome o O_2 disponível e cria sítios de anaerobiose, os quais geram produção de N_2O via desnitrificação (BAGGS; CHEBIL; NDUFA, 2006).

Não houve diferenças significativas das emissões de $N-N_2O$ oriundas da aplicação de vinhaça entre os dois sistemas de colheita. Entretanto, quando se comparou as testemunhas, verificou-se maior emissão de N_2O na área sob cana crua (CCA).

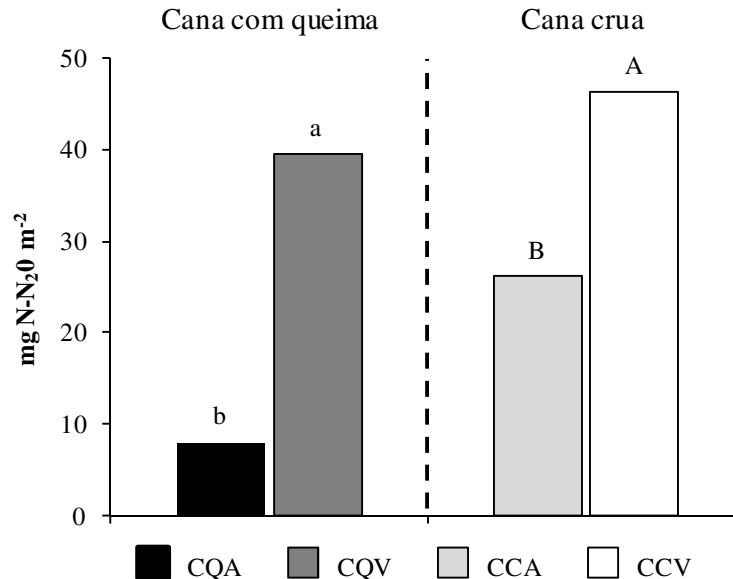


Figura 16 - Fluxos acumulados de N_2O durante o período avaliado isolando o efeito da vinhaça. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey aos níveis de 5% de probabilidade. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

4.2.6 Fluxos de C-CH₄

Conforme apresentado na figura 17, os fluxos de C-CH₄ foram negativos na maioria dos dias avaliados, evidenciando consumo desse GEE pelo solo. Na área sob cana queimada os fluxos de C-CH₄ foram negativos, exceto em CQA (no dia de aplicação de água e no 12º dia após aplicação) e em CQV (no dia de aplicação de vinhaça). Os fluxos de C-CH₄ variaram de -16,5 a

7,8 e de -40,3 a 134,1 $\mu\text{g}^{-2} \text{h}^{-1}$ para CQA e CQV. Em CCA, fluxos baixos, porém positivos foram observados somente no 2º e 4º dia após aplicação de água. Em CCV obteve-se maior emissão de C-CH₄ no dia de aplicação de vinhaça, esse valores variaram de -64,4 a 3,1 e -42,0 a 44,3 $\mu\text{g}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente para CCA e CCV.

Os fluxos médios de C-CH₄ foram de -3,4; -3,7; -12,8; -3,1; respectivamente para CQA, CQV, CCA e CCV (Figura 17 a e b). Como os valores negativos representam absorção de CH₄ pelo solo, entende-se que em todos os tratamentos o solo se comportou como dreno de CH₄ da atmosfera.

Esses resultados estão de acordo com estudos de Weier (1999) e Denmead (2009), que relatam que solos cultivados com cana-de-açúcar na Austrália, possuem a tendência de absorver CH₄ da atmosfera. Essa absorção pode ocorrer por dois mecanismos conhecidos como oxidação de alta afinidade e oxidação de baixa afinidade (BENDER; CONRAD, 1992, 1994; HANSON; HANSON, 1996). O primeiro mecanismo ocorre quando a concentração de CH₄ é próxima à existente na atmosfera e pode ser encontrada em solos com baixas concentrações de NH₄⁺ (TOPP; HANSON, 1991). Estima-se que essa forma seja responsável por 10% do consumo total de CH₄ pelo solo (TOPP; PATTEY, 1997). Já o segundo mecanismo, conhecido como oxidação de baixa afinidade ocorre quando as concentrações de CH₄ estão acima de 40 ppm. Esse mecanismo de consumo do CH₄ é mediado por bactérias conhecidas como metanotróficas (KING; ROSLEV; SKOVGAARD, 1990; JONES; NEDWELL; 1993) e ocorre quando o CH₄ é produzido em zona muito reduzida, difundindo-se para região mais aerada, onde é convertido em CO₂ pelas bactérias metanotróficas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maior absorção de CH₄ foi obtida no tratamento CCA, entretanto observa-se uma grande incerteza nos resultados, o que pode ser visualizado pelas barras de desvio padrão inseridas na Figura 17 a e b.

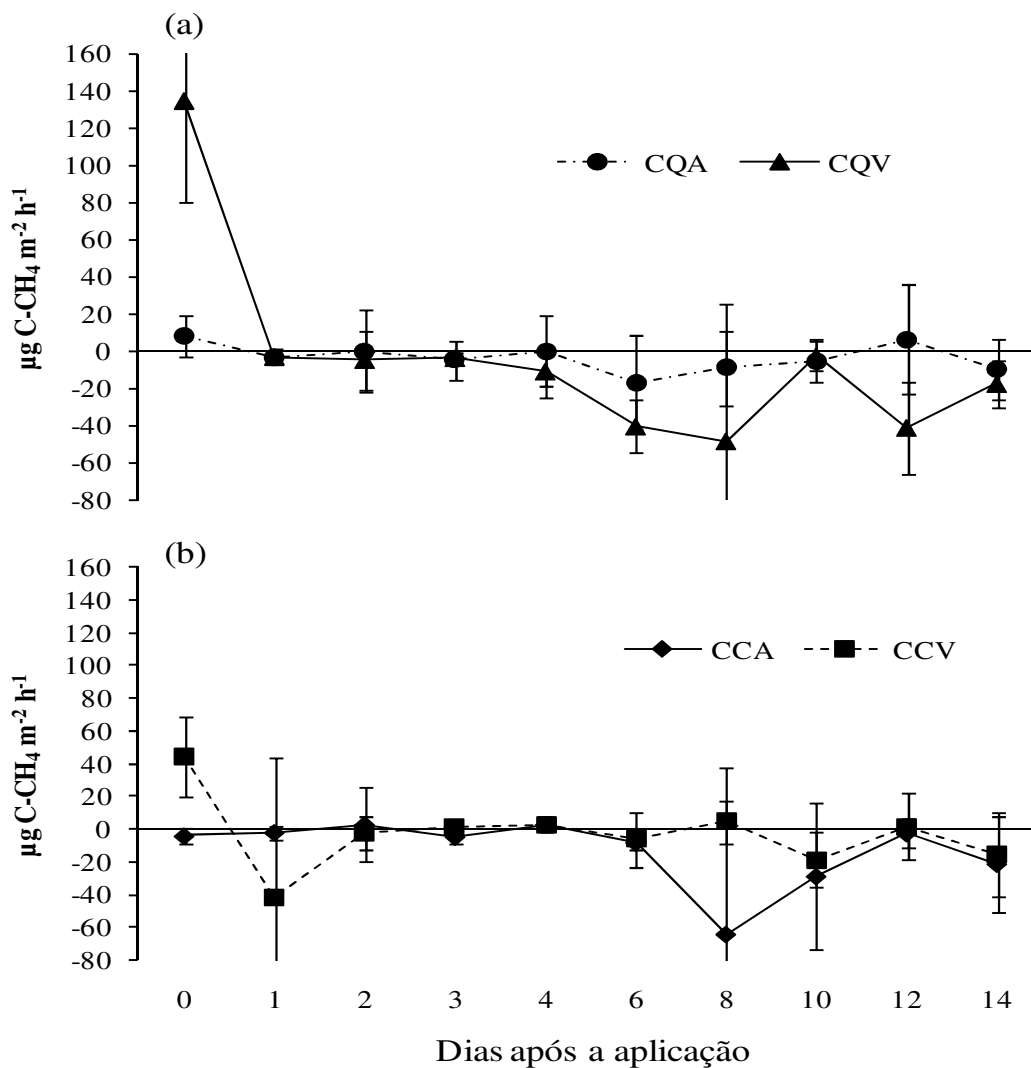


Figura 17 - Fluxos diários de C-CH₄ nos sistemas de colheita manual com queima (a) e colheita mecanizada (b). Valores representam média de cinco repetições. Barras representam o desvio padrão da média. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

As médias acumuladas dos fluxos de C-CH₄ durante todo o período avaliado foram de -1,6; -6,7; -5,4; -1,7 $\text{mg C-CH}_4 \text{ m}^{-2}$; respectivamente para CQA, CQV, CCA e CCV (Figura 18). Não houve variação significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Diferentemente das emissões de C-CO₂ e N-N₂O, observou-se que a aplicação da vinhaça e os diferentes sistemas de colheita da cana-de-açúcar não influenciaram significativamente os fluxos de C-CH₄ para a atmosfera.

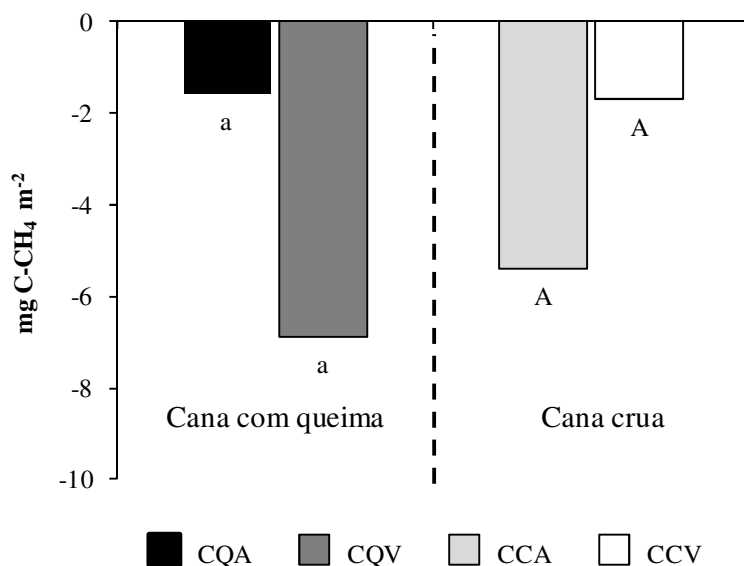


Figura 18 - Fluxos acumulados de CH₄ durante o período avaliado isolando o efeito da vinhaça. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CQA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

4.2.7 Fluxos de N-N₂O e C-CH₄ do solo convertidos em CO₂ equivalente

Conforme já mencionado no item 4.1.6 a conversão de N-N₂O e C-CH₄ em CO₂ eq. é necessária para realização do balanço das emissões totais de GEE, uma vez que estes apresentam diferentes potenciais de aquecimento global. Apesar de os fluxos de CO₂ representarem a maior parte das emissões totais provenientes do solo com aplicação de vinhaça, é importante salientar que grande parte desse GEE emitido é reabsorvido pela fotossíntese no próximo ciclo de cultivo da cana-de-açúcar, dessa forma não precisa ser considerado no balanço pois não contribui para o aumento das concentrações de GEE na atmosfera.

A aplicação de 200 m³ vinhaça aumentou as emissões de GEE em 47,0 e 30,9 kg de CO₂ eq ha⁻¹, respectivamente para as áreas sob cana com queima e cana crua (Tabela 8). Esta maior emissão de GEE na área sob cana queimada pode estar associada à maior imobilização de N na área sob cana crua resultando em menor disponibilidade de N para ocorrer a desnitrificação. Outro fato relevante está associado à emissão da testemunha (CCA) ter sido três vezes maior que a testemunha de cana queimada (CQA). Esta maior emissão em CCA pode ser explicada pelo fato de que no sistema de cana crua anualmente é aportada quantidade de palha sob o solo. A

manutenção desta palha da cana-de-açúcar sob o solo ocasiona o acúmulo de matéria orgânica, e conseqüentemente pode resultar em maiores emissões N₂O para atmosfera.

Tabela 8 - Fluxos de N-N₂O e C-CH₄ convertidos em CO₂ eq. para os quatro tratamentos. CCA (cana queimada com aplicação de água), CQV (cana queimada com aplicação de vinhaça), CCA (cana crua com aplicação de água) e CCV (cana crua com aplicação de vinhaça)

Tratamentos	Fluxos de GEE em CO ₂ equivalente (kg ha ⁻¹)		
	N-N ₂ O	C-CH ₄	TOTAL
	Cana com queima		
CQA	12,0	-0,3	11,7
CQV	59,0	-1,3	57,7
CQV-CQA*	47,0	-1,0	46,0
	Cana crua		
CCA	38,9	-1,0	37,9
CCV	69,1	-0,3	68,8
CCV-CCA*	30,2	0,7	30,9

*CQV-CQA representa a subtração das emissões provenientes da testemunha.

4.2.8 Fator de emissão de N₂O devido à aplicação da vinhaça no solo

Através do fator de emissão pôde-se avaliar a quantidade de N-N₂O emitida em função da dose de N aplicada no solo na forma de vinhaça. O IPCC propõe que 1% de todo N aplicado no solo, seja na forma mineral ou orgânica, é emitido diretamente na forma de N-N₂O. Entretanto, este fator proposto pelo IPCC é bastante abrangente e está sujeito a grandes variações devido às condições locais de cada estudo e aos tipos de resíduos ou fertilizantes nitrogenados aplicados.

No presente estudo, para calcular o fator de emissão do N aplicado na forma de vinhaça inicialmente foi feita a integração das emissões de N-N₂O em cada um dos tratamentos. Em seguida, a quantidade de N-N₂O emitida na testemunha foi subtraída da quantidade de N-N₂O emitida pela área que recebeu vinhaça. Considerou como quantidade de vinhaça a quantidade média aplicada pela usina (200 m³ ha⁻¹) e o teor de N contido na vinhaça (0,23 g L⁻¹).

Assim, foram obtidos fatores de emissões de 0,68 e 0,44%, em kg N-N₂O emitido por kg de N aplicado, respectivamente para áreas de cana queimada e cana crua. Estes fatores de emissão foram significativamente menores àquele proposto pelo IPCC e não foram observados na literatura outros estudos avaliando os fatores de emissão de N-N₂O devido aplicação de vinhaça no solo.

Entretanto, diversos estudos da literatura têm apontado que o fator de emissão proposto pelo IPCC é superestimado (DOBBIE; SMITH, 2003; ROCHETTE et al., 2004; JANTALIA, et al., 2008), principalmente quando se trata de solos de regiões de clima tropical. Em área de cana-de-açúcar próxima ao presente estudo, Signor (2010) avaliando a aplicação de fertilizante nitrogenado, obteve fatores de emissão similares aos obtidos neste estudo. A autora observou fatores de emissão de 0,24 e 0,84%, respectivamente para aplicação de 60 kg ha^{-1} de nitrato de amônio e uréia. Clayton et al. (1997) obtiveram fatores de emissão entre 0,2 e 2,2 % do N aplicado como fertilizante, considerando várias fontes minerais e uma fonte orgânica de N (lodo de esgoto).

Segundo Snyder et al. (2009), estudos têm indicado que este fator pode ser bastante variável dependendo do tipo de solo, do ambiente e do manejo de solo, das culturas e ainda da fonte de N aplicada. Dessa forma, torna-se difícil fazer comparações entre estudos, e a grande variação nos resultados evidencia a dificuldade em estabelecer índices de emissão a nível global (ZANATTA, 2009). Portanto, se torna fundamental a realização de outros estudos, sobretudo avaliando a aplicação de diferentes doses de vinhaça, em diferentes condições de clima, solo e manejo da cultura da cana-de-açúcar.

4.3 Balanço dos fluxos de GEE proveniente da vinhaça

O balanço total dos fluxos de GEE oriundos da vinhaça indicou que a maior parte (90%) das emissões ocorre no percurso do canal condutor (Figura 19).

Cada m^3 de vinhaça resultou em emissão de 2,23 kg de CO_2 eq. durante o transporte no canal e em emissões de 0,239 e 0,147 kg de CO_2 eq., respectivamente para aplicação no solo sob cana queimada e cana crua. Considerando a fertirrigação com vinhaça ($200 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$), observou-se que cada hectare de cana-de-açúcar resulta em emissão de 439,9 e 489,1 kg de CO_2 eq., respectivamente para cana crua e cana queimada

Por fim, para estimar a quantidade de GEE emitida pela vinhaça por litro de etanol produzido foi realizado um cálculo considerando como produtividade média de cana-de-açúcar 90 t ha^{-1} e rendimento de 80 litros de etanol por tonelada de cana moída (dados fornecidos pela Usina). Esta estimativa indicou emissões de 0,069 e 0,068 kg de CO_2 eq L^{-1} de etanol, respectivamente para cultivo em área de cana queimada e cana crua.

É importante ressaltar que esta pesquisa trata-se de uma análise pontual, refletindo as condições de solo, clima, qualidade e quantidade de vinhaça aplicada na Usina Iracema. Dessa forma, apesar dos resultados serem de extrema importância, uma vez que não existem outros resultados na literatura aos quais estes possam ser comparados, é necessária a realização de outros estudos avaliando estas emissões de GEE em condições diferentes.

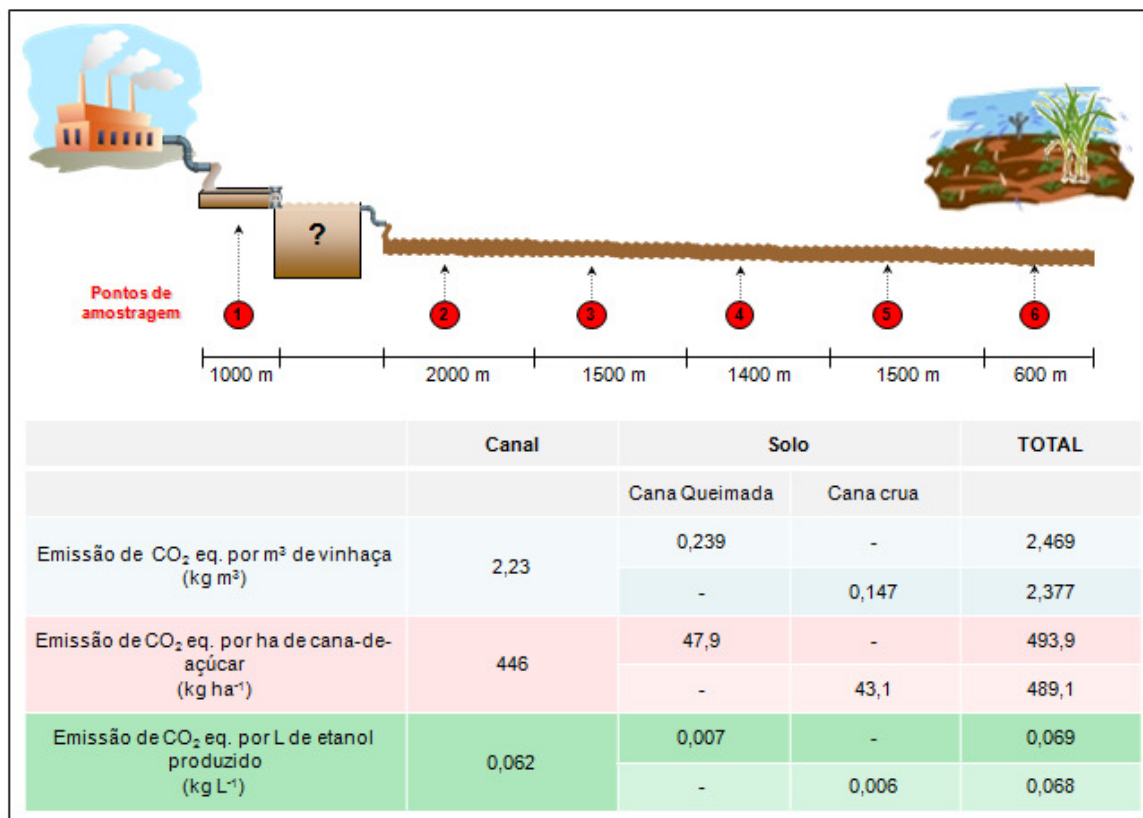


Figura 19 - Esquema ilustrando o canal de distribuição de vinhaça da Usina Iracema com a localização dos pontos de amostragem e balanço das emissões de GEE do canal e do solo convertidos em CO₂ equivalente

4.4 Estrutura das comunidades de *archaea* total e de *mcrA*

Sabe-se que a vinhaça apresenta carga orgânica bastante elevada e que ao sofrer decomposição emite considerável quantidade de CH₄ para atmosfera, porém existe grande deficiência em encontrar trabalhos que confirmem a presença e participação dos microorganismos nesse processo. Para tanto o presente estudo baseou-se nessa ausência de estudos científicos e procurou relacionar o uso de *primers* específicos para melhor conhecimento da

estrutura de algumas comunidades microbianas presente no canal de vinhaça e participantes do processo de produção do CH₄.

Para entender o funcionamento de um ecossistema é fundamental conhecer a diversidade, distribuição e estrutura microbiana (ØVREÅS et al., 1997). A aplicação de técnicas independentes de cultivo inseridas neste estudo permitiram detectar a presença de *archaea* total através de estudo do 16 S rDNA e metanogênicas através de estudo do gene *mcrA*, e conhecer o perfil da estrutura dessas comunidades em um curto período de tempo.

Como demonstrado na Figura 20, grande número de bandas foi gerado para *archaea* total através da técnica de DGGE com utilização de *primers* universais citados em Material e Métodos. Porém a quantidade de bandas para a análise do gene *mcrA*, onde foram usados *primers* funcionais, foi ainda maior (Figura 22).

A análise de agrupamento hierárquico foi feita com base na presença e ausência das bandas detectadas no gel de DGGE. Em conjunto com o agrupamento hierárquico realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) a fim de demonstrar a variabilidade na distribuição das amostras. Complementando a representação gráfica obtida pela PCA aplicou-se ao conjunto de dados gerados uma análise de similaridade (ANOSIM) com o objetivo de discriminar os tratamentos comprovando a separação e representatividade destes.

O agrupamento hierárquico mostrou de forma geral, que tanto para *archaea* total como para metanogênicas P2 foi o ponto que apresentou perfil mais diferente dos demais (Figuras 20 e 22), o que pode ser explicado através de sua proximidade com a usina, fazendo com que apresente condições mais elevadas de temperatura, carga orgânica e condutividade elétrica (Tabela 9).

Para *archaea* total as amostras se agruparam de acordo com as repetições (em três *clusters* distintos) e com isso demonstraram representatividade. O primeiro grupo uniu as amostras de P5 com as amostras de P3 e posteriormente com P4. O segundo grupo separou as amostras de P2 (Figura 20). Assim como para P2 a união dos grupos P3, P4 e P5 provavelmente está associada às condições ambientais existentes no canal de vinhaça, como muito material orgânico sedimentado, carga orgânica similar, condições extremas de anaerobiose e baixa variação de temperatura (Tabela 9).

Através da PCA foi possível verificar o agrupamento dos tratamentos em três regiões distintas, demonstrando que P3 e P4 se agruparam na mesma região (Figura 21). Verificou-se

também a existência de um padrão de estrutura de comunidades através da aproximação das repetições. Essa análise expressa claramente a relação das estruturas das comunidades com as características ambientais do canal de vinhaça.

Aproximadamente 32% de explicação da variação da estrutura das comunidades de *archaea* total presentes no canal de distribuição de vinhaça é discriminada no eixo horizontal enquanto que o eixo vertical separa P2 dos demais tratamentos, explicando mais 15,1% da variância (Figura 21).

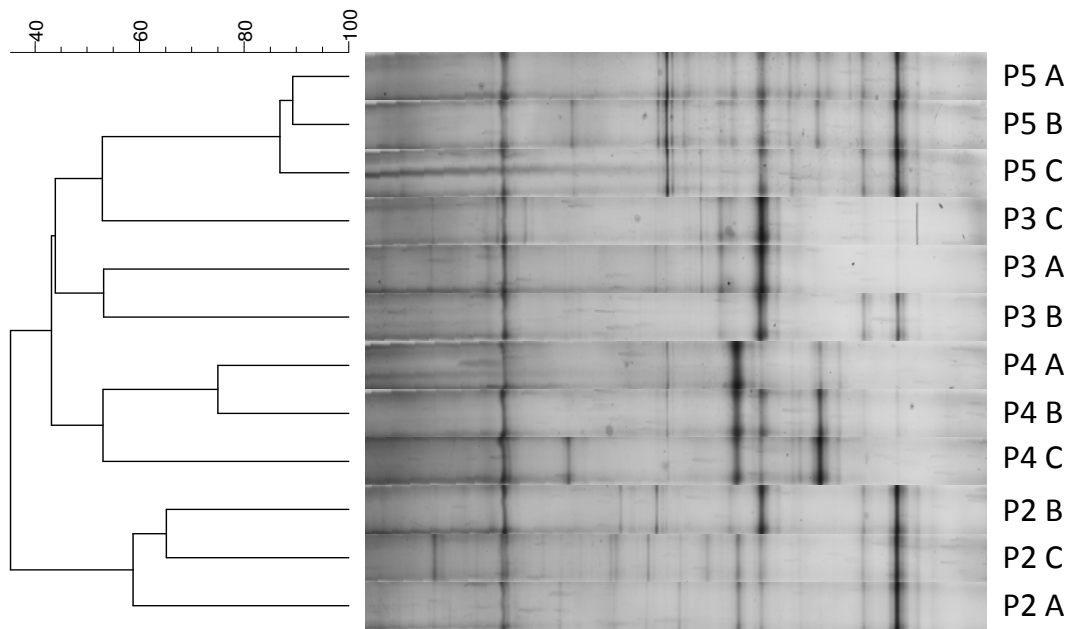


Figura 20 - Agrupamento hierárquico com base na separação por DGGE de genes universais para *archaea* total de amostras de sedimento do canal de vinhaça da Usina Iracema. Os tratamentos (P2, P3, P4 e P5) representam os diferentes pontos de amostragem dentro do canal e as letras representam as repetições

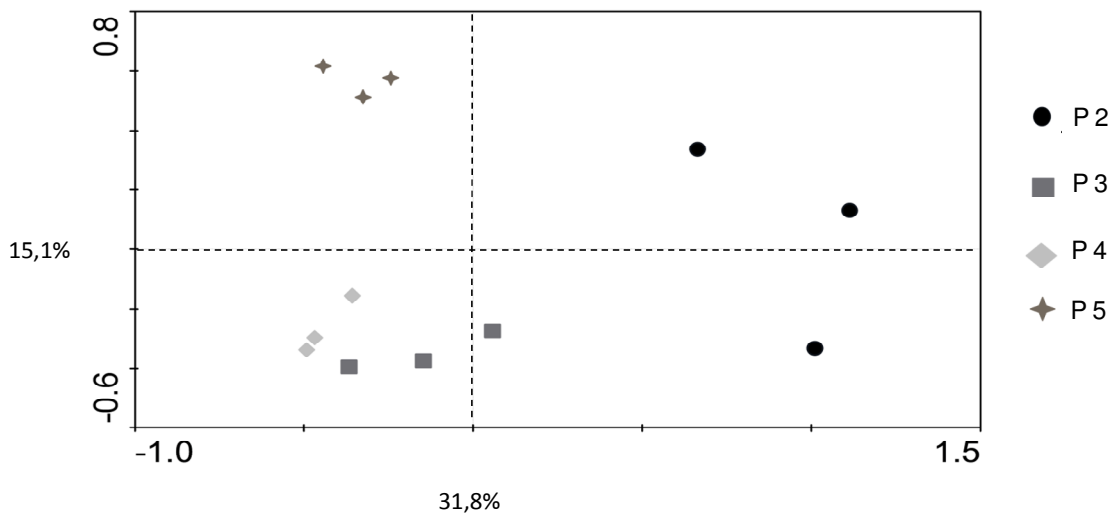


Figura 21 - Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprinting* de comunidades de *archaea* total presente no sedimento do canal de vinhaça da usina Iracema. P2, P3, P4 e P5 representam os pontos de amostragem

Tabela 9 - Caracterização físico-química do sedimento do canal de vinhaça da Usina Iracema. P2, P3, P4 e P5 representam os diferentes pontos de amostragem

Pontos de Coleta	Eh mV	C g/kl	Temperatura °C	pH --	C-CH ₄ g m ⁻² h ⁻¹	Σ μS cm ⁻¹
P2	-43,6	26,9	32,6	4,5	30,3	12,2
P3	-71,7	25,0	29,4	4,6	26,1	10,3
P4	-59,8	24,9	24,8	4,8	27,9	8,5
P5	-45,8	22,6	21,0	5,1	34,4	8,7

Ao levar em conta a análise de similaridade pode-se verificar que os valores de R obtidos expressaram o nível de separação das estruturas das comunidades microbianas em função dos locais de amostragem variando em uma escala de 0 a 1. Interpretam-se os valores de $R > 0,75$ como indicativos de grupos bem separados, $R > 0,5$ como grupos com sobreposição, claramente diferenciados e $R < 0,25$ como grupos pouco separados, de acordo com o manual do programa *Primer5* (CLARKE; GORLEY, 2001).

Assim, com base nos valores de R obtidos pela ANOSIM verificou-se que as estruturas de comunidades de *archaea* total do canal de distribuição de vinhaça da Usina Iracema reveladas nos perfis de DGGE apresentaram grupos diferenciados, porém com sobreposição ($R > 0,5$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Descrição da análise de similaridade (ANOSIM) para *archaeas* totais

Pontos de Amostragem	P2	P3-P4-P5
P2	0	0,65*
P3-P4-P5	-	-

Além do 16S rDNA, o gene *mcrA* também foi selecionado pois tem sido muito usado como marcador molecular para micro-organismos metanogênicos (KLEIN et al., 1988; HALES et al., 1996; LUTON et al., 2002), porque codifica para a metil-coenzima M redutase (MCR), complexo enzimático vital às *archaeas* metanogênicas (HALES et al., 1996).

Conforme mencionado anteriormente para *archaea* total o agrupamento hierárquico realizado para *mcrA* (*archaeas* metanogênicas) também separou P2 dos outros pontos. A explicação dessa separação também está relacionada às condições ambientais encontradas no canal de vinhaça, como maiores valores de temperatura, teor de C, condutividade elétrica, condições de anaerobiose, etc. (Tabela 9). Corroborando com o presente estudo, Taketani et al. (2010) avaliou a estrutura das comunidades de *mcrA* de sedimento de mangue no litoral de São Paulo por DGGE. Os autores concluíram que amostras obtidas nas camadas mais superficiais (0-30 cm) tendem a sofrer forte correlação com atributos físico-químicos do sedimento, como conteúdo de matéria orgânica, pH, quantidade de P e K, sendo que o efeito do conteúdo de matéria orgânica foi o mais significativo.

A distribuição de três grupos microbianos metanogênicos também pode ser confirmada através de representação gráfica (PCA), na qual permitiu distribuição dos perfis das comunidades de metanogênicos ao longo dos eixos de ordenação. Mais uma vez, como já verificado para *archaeas* totais os *mcrA* presentes em P3 e P4 se agruparam demonstrando similaridade ou ainda ambiente de transição entre eles (Figura 23).

Outra explicação coerente para esse agrupamento em três grupos distintos pode ser a capacidade desses micro-organismos em produzir CH₄, onde a emissão de P3 e P4 é muito próxima, enquanto que de forma geral P5 exibe maior emissão. Aproximadamente 27,2% de explicação da variação da estrutura das comunidades de *mcrA* presentes no canal de distribuição de vinhaça é discriminada no eixo horizontal enquanto que o eixo vertical explica 18,8% da variação (Figura 23).

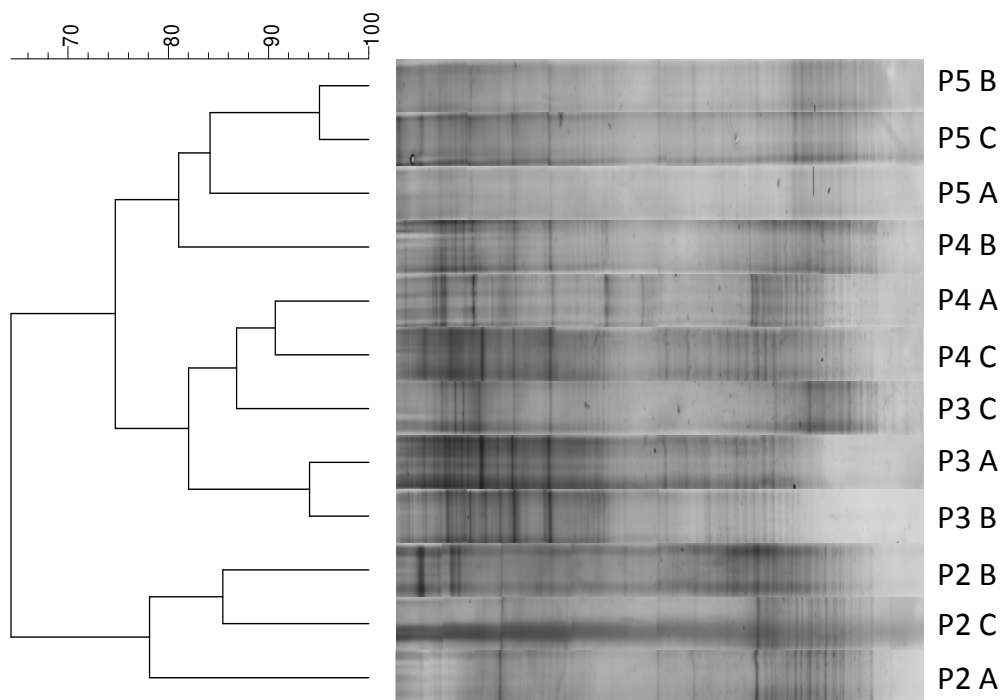


Figura 22 - Agrupamento hierárquico com base na separação por DGGE de genes universais para *archaeas* totais de amostras de sedimento do canal de vinhaça da usina Iracema. Os tratamentos (P2, P3, P4 e P5) representam os diferentes pontos de amostragem dentro do canal e as letras representam as repetições

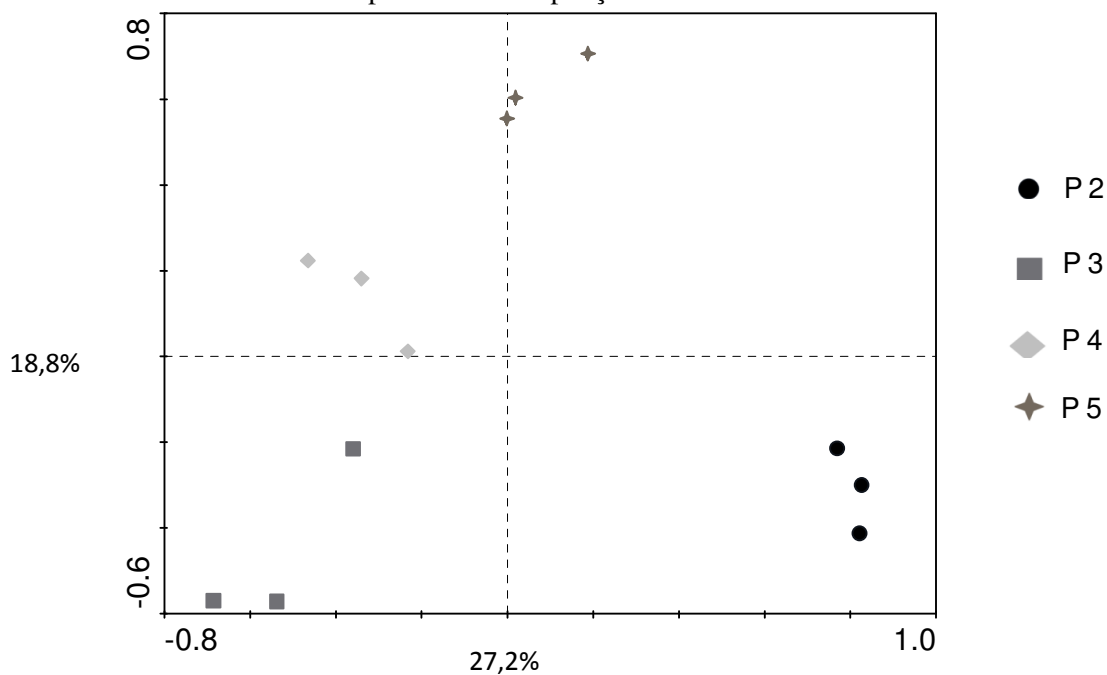


Figura 23 - Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprinting* de comunidades de *archaeas* metanogênicas presente no sedimento do canal de vinhaça da usina Iracema. P2, P3, P4 e P5 representam os pontos de amostragem

Com base nos valores de R expressos pela análise de similaridade (ANOSIM), as estruturas de comunidades de *archaeas* metanogênicas presentes no canal de vinhaça observadas nos perfis de DGGE apresentaram grupos significativamente separados nos espaços de ordenação como visualizado em P2 vs P3/P4. Entre P2 e P5, o valor de R foi igual a 1 porém seu valor de p foi superior a 5%, sendo considerado não significativo. Já para P3/P4 vs P5 o valor de R indicou a existência de grupos com sobreposição, mas claramente separados (Tabela 11).

Tabela 11 - Descrição da análise de similaridade (ANOSIM) para *archaeas* metanogênicas

Pontos de Amostragem	P2	P3-P4	P5
P2	0	0,99*	1
P3-P4	-	-	0,52*
P5	-	-	0

Uma vez que micro-organismos metanogênicos necessitam de condições específicas para produção de CH_4 verificou-se através do presente estudo que os principais fatores na diferenciação da estrutura das comunidades metanogênicas foram variação de temperatura e quantidade de material orgânico. Esses resultados indicam que a variação das estruturas das comunidades microbianas observadas ocorreu de acordo com as características físico-químicas do sedimento e suas mudanças ao longo do canal de vinhaça

A abordagem molecular PCR-DGGE mostrou ser uma ferramenta eficiente para caracterização e monitoramento de comunidades microbianas diversas, focando em *mcrA* verificou-se alta correlação da estrutura das comunidades microbianas com à emissão de $C-CH_4$.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo corroboram a hipótese de que a vinhaça é uma importante fonte de GEE no setor sucroenergético. Ao longo do canal de distribuição da vinhaça foi possível observar os seguintes fatos:

- O CH₄ é responsável por 99,84% da emissão que efetivamente contribui com a intensificação do efeito estufa, enquanto que o N₂O tem participação insignificante;
- No caso estudado na Usina Iracema, calculou-se que a vinhaça produzida na safra 2010 emitirá um total de 122 t de CO₂ equivalente;

A aplicação da vinhaça ao solo na dose de 200 m³ ha⁻¹ resultou nos seguintes padrões de emissão de GEE:

- Aumento das emissões de CO₂ e N₂O nos primeiros dias após a aplicação nos dois sistemas de colheita;
- Aumento das emissões de GEE em 46,0 e 30,9 kg CO₂ eq. ha⁻¹, respectivamente para as áreas de cana com queima e cana crua;
- O fator de emissão para aplicação de vinhaça foi inferior ao proposto pelo IPCC (1%) para fertilizantes nitrogenados. Foram obtidos fatores de emissão de 0,68 e 0,44%, respectivamente para áreas de cana queimada e cana crua. Lembrando que novos estudos devem ser replicados em outros locais, pois a composição da vinhaça, as doses aplicadas, as condições de solo e clima podem influenciar significativamente os fatores de emissão gerados;

O balanço total dos fluxos de GEE, somando as emissões oriundas do canal de distribuição e aquelas derivadas da aplicação de vinhaça no solo indicaram que a maior parte das emissões (90%) ocorreu no percurso do canal condutor. Para cada litro de etanol produzido a vinhaça emitiu 0,069 e 0,068 kg de CO₂ eq., respectivamente para cultivo em área de cana queimada e cana crua.

Por meio das análises de DGGE foi possível fazer uma primeira aproximação da estrutura da comunidade de *archaea* total e metanogênicas presentes no sedimento depositado no fundo dos canais de distribuição da vinhaça na Usina Iracema. E assim verificou-se que:

- Ocorreram mudanças nas estruturas das comunidades de *archaea* total e *mcrA* de acordo com os pontos de amostragem;

- Pôde-se comprovar que as variáveis químicas da vinhaça e ambientais influenciam as estruturas das comunidades e conseqüentemente a emissão de CH₄.
- Porém através deste estudo não podemos detectar a produção de C-CH₄ em si, para tais resultados seria necessário estudos mais aprofundados com utilização de outras técnicas como atividade enzimática, qPCR (*real time*), etc.

REFERÊNCIAS

- AITA, C. **Couplage des cycles du carbone et de l'azote dans les sols cultivés: étude, au champ, des processus de décomposition après apport de matière organique fraîche.** 1996. 209 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Université Paris VI, Sciences de la Terre, Paris, 1996.
- ALBRECHT, A.; KANDJI, S.T. Carbon sequestration in tropical agroforestry systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 99, p. 15-27, 2003.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, New York, v. 59, p. 143-169, 1995
- ANDRADE, M.C. de. **Área do sistema canavieiro.** Recife: SUDENE, 1988. 686 p. (Série Estudos Regionais, 18).
- ARAÚJO, A.C.V. **Diversidade de arqueias em sedimentos de rios da Amazônia e caracterização de espécies metanogênicas cultivadas.** 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BAGGS, E.M.; CHEBII, J.; NDUFA, J.K. A short-term investigation of trace gas emissions following tillage and no-tillage of agroforestry residues in western Kenya. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 69-76, 2006.
- BALL, B.C.; SMITH, K.A. Gas movement. In: SMITH, K.A.; MULLINS, C.E. (Ed.). **Soil analysis: physical methods**, New York: Marcel Dekker, 1991. p. 511-549.
- BARROS, R.P. de.; VIÉGAS, P.R.A.; SILVA, T.L. da; SOUZA, R.M. de; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R.A.; BARRETTO, M.C.V.; MELO, A.S. de. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.
- BENDER, M.; CONRAD, R. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 101, p. 261-270, 1992.
- _____. Methane oxidation activity in various soils and fresh-water sediments-occurrence, characteristics, vertical profiles, and distribution on grain-size fraction, **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, Washington, v. 99, p. 16531-16540, 1994.
- BIODIESELBR. **Notícias.** Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/meneghetti/producao-consolidada-etanol-combustivel-brasil-tema-science.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2010.
- BØCKMAN, O.C.; OLFS, H.W. Fertilizers, agronomy, and N₂O. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 52, n. 2/3, p. 165-170, 1998.

BORDEN, R.C.; GOMEZ, C.A.; BECKER, M.T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, Dublin, v. 33, n. 2, p. 180-189, 1995.

BRAIDA, J.A.; REICHERT, J.M.; VEIGA, M.; REINERT, D.J. Resíduos vegetais na superfície e carbono orgânico do solo e suas relações com a densidade máxima obtida no ensaio Proctor. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 605-614, 2006.

BRAKENSIEK, D.L.; RAWLS, W.J. Agricultural management effects on soil water processes Part II: Green and Ampt parameters for crusting soils. **Proceedings of the American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Michigan, v. 26, p.1753-1757, 1983.

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

_____. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa**. Brasília: Secretaria de Políticas e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento. 2004. 161 p.

BRAUNACK, M.V.; PEATEY, T.C. Changes in soil physical properties after one pass of sugarcane haulout unit. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 39, n. 6, p. 733-742, 1999.

BREMMER, J.M. Sources of nitrous oxide in soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 49, n. 1/3, p. 7-16, 1997.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

CAMBUIM, F.A. **A ação da vinhaça sobre a retenção de umidade, pH, acidez total, acumulação e lixiviação de nutrientes, em solo arenoso**. 1983. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1983.

CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. 2. ed. São Paulo: Metrópole, 2008. 654 p.

CANELLAS, L.P.; VELLOSO, A.C.X.; MARCIANO, C.R.; RAMALHO, J.F.G.P.; RUMJANEK, V.M.; REZENDE, C.E.; SANTOS, G.A. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciências do solo**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 935-944, 2003.

CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. **Biodiversidade do Estado de São Paulo: microrganismos & vírus**. São Paulo: FAPESP, 1999. 23 p.

CARDENAS, E.; TIEDJE, J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, p. 544-549, 2008.

CARVALHO, J.L.N.; AVANZI, J.C.; SILVA, M.L.N.; MELLO, C.R.; CERRI, C.E.P. Potencial de seqüestro de carbono em diferentes biomas do Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 277-289, 2010.

CEDDIA, M.B.; ANJOS, L.H.C. dos; LIMA, E.; RAVELLI NETO, A.; SILVA, L.A. da. Sistemas de colheita da cana-de-açúcar e alterações nas propriedades físicas de um solo podzólico amarelo no estado do espírito santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1467-1473, 1999.

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, v. 20, n. 2, p. 248-254, 2004.

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.

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.

CHERNICHARO, C.A.L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios. **Margens**, Belo Horizonte, v. 5, p. 246, 1997.

CHIANESE, D.S.; ROTZ, C.A.; RICHARD, T.L. Simulation of nitrous oxide emissions from dairy farms to assess greenhouse gas reduction strategies. **Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Saint Joseph, v. 52, p. 1325-1335, 2009.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **Primer 5:0** user manual/tutorial. Plymouth: PRIMER-E, 2001.

CLEGG, C.D. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. **Applied Soil Ecology**, Berlin, v. 31, p. 73-82, 2006.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 10 set. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABATECIMENTO. **Levantamentos de safra**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 15 jan. 2010.

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

COSTA, C.T.R.C. da. **Comunidade bacteriana, atributos do solo e fluxo de gases em solo sob Cerrado e cana-de-açúcar**. 2010. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

COSTA, F.S.; ZANATTA, J.A.; BAYER, C. Emissões de gases de efeito estufa em agroecossistemas e potencial de mitigação. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.;

DAVIDSON, E.A.; SWANK, W.T. Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from two forested ecosystems via nitrification and denitrification. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 52, n. 6, p. 1287-1292, 1986.

DAVIDSON, E.A.; SWANK, W.T. Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from two forested ecosystems via nitrification and denitrification. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 52, n. 6, p. 1287-1292, 1986.

De KLEIN, C.A.M.; ECKARD, R.J. Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 48, p. 14-20, 2008.

DE LONG, E.F. Microbial community genomics in the ocean. **Nature Reviews: Microbiology**, London, v. 3, p. 459-469, 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; WOFYSY, 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.

DENMEAD, O.T.; MACDONALD, B.C.T.; BRYANT, G.; NAYLOR, T.; WILSON, S.; GRIFFITH, D.W.T.; WANG, W.J.; SALTER, B.; WHITE, I.; MOODY, P.W. Emissions of methane and nitrous oxide from Australian sugarcane soils. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 150, n. 6, p. 748-756, 2009.

DHILLON, A.; LEVER, M.; LLOYD, K.G.; ALBERT, D.B.; SOGIN, M.L.; TESKE, A. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 4592-4601, 2005.

DOBBIE, K.E.; SMITH, K.A. Impact of different forms of N fertilizer on N₂O emissions from intensive grassland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.67, n.1, p.37-46, 2003.

DRINKWATER, L.E.; WAGONER, P.; SARRANTONIO, M. Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. **Nature**, London, v. 396, p. 262-265, 1998.

DUIKER, S.W.; LAL, R. Carbon budget study using CO₂ fluxmeasurements from a no till system in central Ohio. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 54, p. 21-30, 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Meio Ambiente. **Primeiro inventário brasileiro de emissões de gases do efeito estufa: emissões de óxido nitroso proveniente de solos agrícolas**. 2006. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/21445.html>>. Acesso em: 30 jan. 2010.

ESPINDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. de; TEIXEIRA, M.G.; URQUIAGA, S. Decomposição e liberação de nutrientes acumulados em leguminosas herbáceas perenes consorciadas com bananeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 321-328, 2006.

FANG, C.; MONCRIEFF, J.B. The dependence of soil CO₂ 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.

FONTAINE, S.; MARIOTTI, A.; ABBADIE, L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 837-843, 2003.

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.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203 p. (Série Engenharia Agrícola, 1).

GALDOS, M.V.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Soil carbon stocks under and unburned sugarcane in Brazil, **Geoderma**, Amsterdam, v. 153, n. 3/4, p. 347-352, 2009.

HALES, B.A.; EDWARDS, C.; RITCHIE, D. A.; HALL, G.; PICKUP, R.W. & SAUNDERS, J.R. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 668-675, 1996.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 430-471, 1996.

HAVLIN, J.L. KISSEL, D.E.; MADDUX, L.D.; CLAASSEN, M.M.; LONG, J.H. Crop-rotation and tillage effects on soil organic – carbon and nitrogen. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 54, p. 448-452, 1990.

HE, Z.; GENTRY, T.J.; SCHADT, C.W.; WU, L.; LIEBICH, J.; CHONG, S.C.; HUANG, Z.; WU, W.; GU, B.; JARDINE, P.; CRIDDLE, C.; ZHOU, J. Geochip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. **The ISME Journal**, London, v. 1, p. 67-77, 2007.

HUBER, H.; HOHN, M.J.; RACHEL, R.; FUCHS, T.; WIMMER, V.C.; STETTER, K.O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, London, v. 417, p. 63-67, 2002.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Guidelines for national greenhouse gas inventories: agriculture, forestry and other land use**. Hayama: National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006. v. 4. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>>. Acesso em: 05 fev. 2010.

_____. **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. Geneva, 2007. 104 p.

JANTALIA, C.P.; SANTOS, H.P dos.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 82, n. 2, p. 161-173, 2008.

JANTALIA, C.P.; ZOTARELLI, L.; DOS SANTOS, H.P.; TORRES, E.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B. Em busca da mitigação da produção de óxido nitroso em sistemas agrícolas: Avaliação de práticas usadas na produção de grãos no Sul do Brasil. In: ALVES, B.; URQUIAGA, S.; AITA, C.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; CAMARGO, F. O. (Ed.). **Manejo de sistemas agrícolas**. Genesis: Porto Alegre, 2006. p. 81-107.

JONES, H.A.; NEDWELL, D.B. Methane emission and methane oxidation in land-fill cover soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 102, p. 185-195, 1993.

KING, G.M.; ROSLEV, P.; SKOVGAARD, H. Distribution and rate of methane oxidation in sediments of the Florida Everglades. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 2902-2911, 1990.

KLEIN, A.; ALLMANSBERGER, R.; BOKRANZ, M.; KANAUB, S.; MULLER, B. Comparative analysis of genes encoding methyl coenzyme M reductase in methanogenic bacteria. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 213, p. 409-420, 1988.

KUMAR, V.; WATI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; YADAV, B.S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 83-88, 1998.

KUZYAKOV, Y.; FRIEDEL, J.K.; STAHR, K. Review of mechanisms and quantification of priming effects. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1485-1498, 2000.

LA SCALA JUNIOR, N.; BOLONHEZI, D.; PEREIRA, G.T. Short-term soil CO₂ emission after conventional and reduced tillage of a no-till sugar cane area in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 91, p. 244–248, 2006.

LA SCALA JUNIOR, N.; LOPES, A.; MARQUES JUNIOR, J.; PEREIRA, G.T. Carbon dioxide emissions after application of tillage systems for a dark red latosol in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 62, p. 163-166, 2001.

LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science**, Washington, v. 304, p. 1623-1627, 2004.

_____. Soil carbon sequestration in Latin America. **Land Degradation and Development**, New York, v. 18, n. 5, .p.589-590, 2006.

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

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.

LE TREUT, H.; SOMERVILLE, R.; CUBASCH, U.; DING, Y.; MAURITZEN, C.; MOKSSIT, A.; PETERSON, T.; PRATHER, M. Historical overview of climate change. 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. 93-127

LEE, J.; SIX, J.; KING, A. P.; VAN KESSEL, C.; ROLSTON, D. E. Tillage and field scale controls on greenhouse gas emissions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 3, p. 714-725, 2006.

LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. v. 1, 272 p.

LIMA, M.A.; LUIZ, A.J.B.; VIEIRA, R. .; PESSOA, M.C.P.Y.; NEVES, M.C. **Emissões de óxido nitroso provenientes de solos agrícolas**. Relatórios de Referencia, Primeiro Inventário Brasileiro de Emissões Antrópicas de Gases de Efeito Estufa. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia; Embrapa, 2006. 127 p.

LUTON, P.E.; WAYNE, J.M.; SHARP, R.J.; RILEY, P.W. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology Readind**, Inglaterra, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162 p. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2006.

MARQUES, M.G. **Transformações do carbono e do nitrogênio no solo e produção de aveia com o uso de dejetos de suínos em plantio direto**. 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MARY, B.; RECOUS, S.; DARWIS, D.; ROBIN, D. Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 181, p. 71-82, 1996.

MELILLO, J.M.; STEUDLER, P.A.; ABER, J.D.; NEWKIRK, K.; LUX, H.; BOWLES, F.P.; CATRICALA, C.; MAGILL, A.; AHRENS, T.; MORRISSEAU, S. Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. **Science**, Washington, v. 298, p. 2173-2176, 2002.

MOREIRA, M.M.R. **Análise prospectiva do padrão de expansão do setor sucroenergético brasileiro: uma aplicação de modelos probabilísticos com dados georeferenciados**. 2008. 151 p. Dissertação (Mestrado em Economia) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

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

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

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**. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 539-579.

NOVAES, R.F.V. Microbiology of anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, London, v. 18, p. 1-14, 1986.

OORTS, K.; MERCKX, R.; GREHAN, E.; LABREUCHE, J.; NICOLARDOT, B. Determinants of annual fluxes of CO₂ and N₂O in long-term no-tillage and conventional tillage systems in northern France. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 95, p. 133-148, 2007.

ØVEREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3367- 3373, 1997.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PINHEIRO, E.F.M.; LIMA, E.; CEDDIA, M.B.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. **Estoques de carbono e nitrogênio num argissolo amarelo cultivado com cana-de-açúcar: influência da queima ou manutenção da palhada**. Brasília: EMBRAPA. 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

PRADO JÚNIOR, C. **História econômica do Brasil**. 10. ed. São Paulo: Editora Brasiliense, 1976. 364 p.

RAZAFIMBELO, T.; BERNARD BARTHE'S, B.; LARRE'-LARROUY, M.C.; LUCA, E.F.; LAURENT, J.Y.; CERRI, C.C.; FELLER, C. Effect of sugarcane residue management (mulching versus burning) on organic matter in a clayey Oxisol from southern Brazil. **Agriculture Ecosystem and Environment**, Amsterdam, v. 115, n. 1/4, p. 285-289, 2006.

RESENDE, A.S. de; XAVIER, R.P.; OLIVEIRA, O.C. de; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 281, p. 339-351, 2006.

ROBERTSON, C.E.; HARRIS, J.K.; SPEAR, J.R.; PACE, N.R. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 638-642, 2005.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.A.; BELANGER, G.; CHANTIGNY, M.H.; PREVOST, D.; LEVESQUE, G. Emissions of N₂O from alfalfa and soybean crops in eastern Canada. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 68, n. 2, p. 493-506, 2004.

RODHE, H. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. **Science**, Washington, v. 248, p. 1217-1219. 1990.

SIGNOR, D. **Estoques de carbono e nitrogênio e emissões de gases de efeito estufa em áreas de cana-de-açúcar na região de Piracicaba**. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVA, F.T. **Dejetos líquidos de suíno afetam a decomposição da palha de aveia?** 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27-32, 2007.

SNYDER, C.S.; BRUULSEMA, T.W.; JENSEN, T.L.; FIXAN, P.E. Review of greenhouse gas emissions from cropping production systems and fertilizer management effects. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 133, n. 3/4, p. 247-266, 2009.

SOUZA, Z.M.; PRADO, R.M.; PAIXÃO, A.C.S.; CESARIN, L.G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 271-278, 2005.

TAKETANI, R.G.; YOSHIURA, C.A.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; TSAI, S.M. Diversity and identification of methanogenic archaeas and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 97, p. 401-411, 2010.

TAN, I.Y.S.; Van ES, H.M.; DUXBURY, J.M.; MELKONIAN, J.J.; SCHINDELBECK, R.R.; GEOHRING, L.D.; HIVELY, W.D.; MOEBIUS, B.N. Single-event nitrous oxide losses under maize production as affected by soil type, tillage, rotation, and fertilization. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 19-26, 2009.

TOPP, E.; HANSON, R.S. Metabolism of radiatively important trace gases by methane – oxidizing bacteria. In: ROGERS, J.E.; WHITMAN, W.B. (Ed.). **Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides and halomethanes**. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 71-90.

TOPP, E.; PATTEY, E. Soils and sources and sinks for atmospheric methane. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 77, p. 167-178, 1997

TORRES, J.L.R. Efeito da temperatura do ar e precipitação pluviométrica na decomposição de plantas de cobertura no cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31., 2007, Gramado. **Anais...** Gramado: SBCS; UFRGS, 2007. 1 CD-ROM.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.782, 1990

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Dados e cotações**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

VAZOLLER, R.F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas**. 1995. 295 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

VIAN, C.E.F. **Complexo agroindustrial canavieiro: análise do processo de evolução e consolidação tecnológica de 1930 a 2000** Piracicaba: ESALQ, 2006. 58 p. (. Série Pesquisa Departamento de Economia, Administração e Sociologia).

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1996. v. 1: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos, 243 p.

WADT, L.C. **Cultivo de *Pleurotus spp.* em vinhaça visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WATERS, E.; HOHN, M.J.; AHEL, I.; GRAHAM, D.E.; ADAMS, M.D.; ARNSTEAD, M.; BEESON, K.Y.; BIBBS, L.; BOLANOS R; KELLER, M.; KRETZ, K.; LIN, X.; MATHUR, E.; NI, J.; PODAR, M.; RICHARDSON, T.; SUTTON, G.G.; SIMON, M.; SOLL, D.; STETTER, K.O.; SHORT, J.M.; NOORDEWIER, M. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 100, p. 12984-12988, 2003.

WEIER, K.L. N₂O and CH₄ consumption in sugarcane soil after variation in nitrogen and water application. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1931-1941, 1999.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 74, p. 5088-5090, 1977

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WRAGE, N.; VELTHOF, G.L.; VAN BEUSICHEM, M.L.; OENEMA, O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 12/13, p. 1723-1732, 2001.

ZANATTA, J.A. **Emissão de óxido nitroso afetada por sistemas de manejo do solo e fontes de nitrogênio**. 2009. 93 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ZHANG, J.; HAN, X. N₂O emission from the semi-arid ecosystem under mineral fertilizer (urea and superphosphate) and increased precipitation in northern China. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 291-302, 2008.

ZINDER, S.H. Methanogens. In: BURLAGE, R.S.; ATLAS, R.; STHAL, D.; GEESEY, G.; SAYLER, G. (Ed.). **Techniques in microbial ecology**. New York: Oxford, 1998. p. 113-136.

ANEXOS

ANEXO A - Emissão diária de C-CO₂ proveniente da vinhaça ± desvio padrão. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de amostragem

Dias de coleta	Fluxos C-CO ₂ (mg m ⁻² h ⁻¹)					
	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6
1	1343 ± 44	3021 ± 188	1729 ± 184	1351 ± 293	606 ± 157	503 ± 68
2	1397 ± 155	3523 ± 127	972 ± 369	1263 ± 215	1023 ± 73	769 ± 180
3	1511 ± 76	2895 ± 1774	2811 ± 31	3155 ± 132	938 ± 204	933 ± 203
4	2408 ± 1215	2935 ± 471	2776 ± 169	3226 ± 375	2228 ± 459	1159 ± 164
5	1621 ± 367	2102 ± 337	1915 ± 46	1448 ± 174	858 ± 303	714 ± 95
6	2151 ± 197	2234 ± 179	1366 ± 127	918 ± 266	1193 ± 810	268 ± 25
7	1700 ± 52	2776 ± 266	2311 ± 52	1703 ± 156	2586 ± 344	839 ± 134
8	1755 ± 44	2683 ± 128	861 ± 2052	1437 ± 82	2292 ± 429	550 ± 77
9	1226 ± 92	672 ± 53	2401 ± 250	1667 ± 194	2508 ± 251	693 ± 286
10	1478 ± 200	2233 ± 94	2125 ± 99	1744 ± 168	2031 ± 254	530 ± 163
11	1360 ± 167	2281 ± 398	2119 ± 325	1957 ± 151	1936 ± 412	853 ± 113
12	1717 ± 73	1823 ± 551	1213 ± 76	2165 ± 35	1065 ± 775	764 ± 87
13	2130 ± 89	1842 ± 203	2551 ± 60	2204 ± 60	3424 ± 1325	1399 ± 395
14	1335 ± 55	2795 ± 246	2183 ± 470	2566 ± 136	1733 ± 112	1264 ± 189
15	1498 ± 127	2132 ± 130	2497 ± 115	1455 ± 94	1343 ± 170	1332 ± 162

Anexo B - Emissão diária de N-N₂O proveniente da vinhaça ± desvio padrão. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de amostragem

Dias de coleta	Fluxos N-N ₂ O (mg m ⁻² h ⁻¹)					
	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6
1	0,33 ± 0,11	0,42 ± 0,60	0,43 ± 0,64	0,34 ± 0,54	0,32 ± 0,53	0,32 ± 0,53
2	0,04 ± 0,05	0,55 ± 0,63	0,31 ± 0,51	0,30 ± 0,56	-0,12 ± 0,16	0,64 ± 0,57
3	0,06 ± 0,04	1,13 ± 1,44	1,13 ± 0,90	4,15 ± 2,03	1,03 ± 1,05	0,96 ± 0,67
4	0,16 ± 0,12	1,17 ± 1,47	0,36 ± 1,28	1,17 ± 1,62	0,89 ± 0,63	1,48 ± 2,56
5	0,03 ± 0,01	0,37 ± 0,56	0,53 ± 0,71	1,05 ± 0,55	0,12 ± 1,28	1,01 ± 2,03
6	0,06 ± 0,04	0,54 ± 0,69	0,32 ± 0,65	0,41 ± 0,59	0,37 ± 0,56	0,54 ± 0,50
7	0,07 ± 0,02	0,43 ± 0,61	0,14 ± 0,08	0,08 ± 0,04	0,95 ± 0,31	0,67 ± 0,69
8	0,07 ± 0,03	0,40 ± 0,66	0,00 ± 0,06	-0,02 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,39 ± 0,62
9	0,06 ± 0,02	0,43 ± 0,70	0,23 ± 0,06	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,07	0,42 ± 0,64
10	-0,01 ± 0,18	0,39 ± 0,58	-0,03 ± 0,70	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,10	0,35 ± 0,58
11	0,09 ± 0,05	0,73 ± 0,89	0,22 ± 0,05	-0,11 ± 0,28	0,24 ± 0,28	0,34 ± 0,66
12	0,44 ± 0,54	-0,22 ± 0,44	0,06 ± 0,09	0,06 ± 0,09	0,05 ± 0,02	0,35 ± 0,73
13	0,24 ± 0,10	0,38 ± 0,60	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,33 ± 0,56
14	0,15 ± 0,03	0,46 ± 0,65	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,41 ± 0,65
15	0,02 ± 0,05	0,35 ± 0,57	0,03 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,37 ± 0,75

Anexo C - Emissão diária de C-CH₄ proveniente da vinhaça ± desvio padrão. P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os pontos de amostragem

Dias de coleta	Fluxos C-CH ₄ (mg m ⁻² h ⁻¹)					
	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6
1	368 ± 01	1810 ± 1059	697 ± 245	1541 ± 821	832 ± 197	786 ± 189
2	418 ± 124	1196 ± 834	627 ± 402	980 ± 428	1197 ± 36	505 ± 119
3	245 ± 76	995 ± 866	890 ± 394	1305 ± 26	1209 ± 143	224 ± 138
4	341 ± 191	1217 ± 919	1126 ± 210	1631 ± 715	1220 ± 452	402 ± 218
5	324 ± 142	1029 ± 644	988 ± 442	1476 ± 414	811 ± 606	292 ± 87
6	269 ± 132	1262 ± 451	820 ± 253	583 ± 381	1487 ± 1487	183 ± 71
7	344 ± 34	1279 ± 266	1126 ± 628	747 ± 147	1749 ± 695	356 ± 42
8	311 ± 135	1045 ± 850	965 ± 793	864 ± 307	1967 ± 1126	378 ± 65
9	619 ± 233	928 ± 35	1590 ± 1146	777 ± 364	2185 ± 1287	359 ± 174
10	505 ± 97	811 ± 695	1570 ± 1025	881 ± 171	1191 ± 451	267 ± 145
11	391 ± 84	2265 ± 1197	1353 ± 988	817 ± 245	1154 ± 106	460 ± 45
12	411 ± 15	1966 ± 117	899 ± 267	940 ± 164	1142 ± 1273	461 ± 116
13	482 ± 145	1667 ± 2642	1060 ± 451	1952 ± 130	2664 ± 1499	742 ± 406
14	368 ± 50	953 ± 666	1220 ± 604	1779 ± 415	1561 ± 117	581 ± 193
15	395 ± 53	533 ± 250	1357 ± 146	1173 ± 248	1102 ± 88	420 ± 203