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

Emissão de metano e microbiota funcional associadas a vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas de armazenamento e transporte

Bruna Gonçalves de Oliveira

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Bruna Gonçalves de Oliveira
Bióloga

**Emissão de metano e microbiota funcional associadas a vinhaça de cana-de-açúcar em
sistemas de armazenamento e transporte**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

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

Oliveira, Bruna Gonçalves de

Emissão de metano e microbiota funcional associadas a vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas de armazenamento e transporte / Bruna Gonçalves de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
98 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Gás do efeito estufa 2. Efluentes 3. Canais 4. Tanques 5. Metanogênese I. Título

CDD 665.73
O48e

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

Aos meus pais Francisco, Angela e Tude, meus primeiros professores - da vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela minha saúde.

A minha querida família, pelo incentivo e por permanecerem ao meu lado sempre. Aos meus lindos sobrinhos Thales e Murilo, por entenderem minha ausência e tornarem meus dias mais leves e alegres.

A Universidade de São Paulo (ESALQ) pela oportunidade de estudo e ao CENA pela infraestrutura.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e a M. Fernanda pelo auxílio burocrático e ao nosso coordenador, que se tornou um grande amigo, prof. Dr. Fernando Andreote, pelo incentivo e apoio.

A CAPES e FAPESP pelas bolsas de estudo.

A minha querida orientadora profa. Dra. Brigitte, um agradecimento especial pela orientação, incentivo, amizade por acreditar na minha capacidade e ficar ao meu lado sempre. Muito obrigada Bri!

Aos professores Dr. Carlos Clemente Cerri e Carlos Eduardo P. Cerri, pelos ensinamentos, auxílio e participação durante todas as fases da pesquisa. Pelo agradável convívio e orientação.

Aos amigos, técnicos, alunos e estagiários do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental e em especial ao Margatto por todo auxílio, sem você as coletas seriam mais difíceis! Obrigada!

A profa. Dra. Tsai pelo apoio à presente pesquisa e por permitir a utilização de seu laboratório e à Maju e Naissinha pela ajuda nas primeiras análises de qPCR.

Ao prof. Dr. Evan De Lucia pela contribuição teórica e discussões sobre os dados de CH₄ e também pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Roderick I. Mackie, por me receber, orientar e permitir a vivência de uma das melhores experiências da minha vida. Agradeço ainda os momentos de descontração, regado à queijos e vinhos junto à sua querida Vivienne!

Ao meu “anjo da guarda” Eoghan Smyth, pós-doc na Universidade de Illinois, por toda ajuda, paciência, incentivo e amizade durante minha estadia. E principalmente pelos domingos de GOT! Thanks man!

Aos grandes amigos que Illinois me proporcionou e que eu vou levar para sempre em meu coração: Karine, Mike, Inhyuk, Sara, Marjet, Celia, Nick e Wyen.

As unidades produtoras de etanol que cederam suas áreas para pesquisa e ao suporte técnico prestado pelos queridos Mauri e Marcelo, vocês foram essenciais para que tudo acontecesse, Obrigada!

Aos meus (poucos) e bons amigos e um agradecimento especial ao João, pelo carinho e compreensão sempre dedicados à mim com muito amor!

Enfim, à todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e participaram do meu crescimento pessoal e profissional!

Muito Obrigada!

“Imagine walking out in the countryside and not being able to tell a snake from a cow from a mouse from a blade of grass, that’s been the level of our ignorance.”

Carl Woese

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Cana-de-açúcar	17
2.2 Vinhaça	18
2.3 Armazenamento e transporte da vinhaça	19
2.4 Metano	21
2.5. Microbiota metanogênica e o seu estudo através das técnicas moleculares	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Estudo 1: Caracterização dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça	28
3.1.1. Levantamento dos dados	28
3.2 Estudo 2: Quantificação das emissões de CH ₄ provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte	29
3.2.1 Experimentos de campo	29
3.2.1.1 Localização das áreas de estudo	29
3.2.1.2 Descrição das áreas de estudo	30
3.2.1.3 Atributos físico-químicos da vinhaça	32
3.2.1.4 Quantificação dos fluxos de CH ₄ provenientes da vinhaça	32
3.2.1.5 Conversão dos fluxos de CH ₄ em CO ₂ equivalente (CO ₂ eq) e extrapolação das emissões para toda safra 2012/2013	35
3.2.2 Experimento de incubação em laboratório	36
3.3 Estudo 3: Levantamento da microbiota funcional associada à emissão de CH ₄	37
3.3.1 Amostragem de vinhaça e sedimento	38
3.3.2 Extração de DNA	38
3.3.3 PCR em tempo real	39
3.3.4 Pirosequenciamento	40
3.4 Análise estatística dos dados	41
4 RESULTADOS	43
4.1 Estudo 1: Caracterização dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça	43
4.1.1 Armazenamento e transporte de vinhaça	43

4.1.2 Manejo e aplicação.....	45
4.2 Estudo 2: Emissões de CH ₄ provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte.....	47
4.2.1 Caracterização físico-química da vinhaça.....	47
4.2.2 Fluxos de CH ₄ provenientes da vinhaça nos sistemas de armazenamento e transporte ..	52
4.2.3 Correlação entre as variáveis físico-químicas da vinhaça e os fluxos de CH ₄ nos anos safra 2012 e 2013.	54
4.2.4 Fluxos acumulados de CH ₄ nos anos safras 2012 e 2013	55
4.2.5 Conversão dos fluxos de CH ₄ em CO ₂ eq e extrapolação das emissões para o ano safra	57
4.2.6 Fluxos de CH ₄ resultantes do experimento de incubação de laboratório.....	58
4.3 Estudo 3: Microbiota associada	60
4.3.1 Quantificação dos grupos microbianos resultantes do campo	60
4.3.2 Quantificação dos grupos microbianos resultantes do experimento de incubação	65
4.3.2 Diversidade de Bactéria e Arquéia por pirosequenciamento	67
4.3.2.1 Experimento de campo.....	67
4.3.2.2 Experimento de Incubação	73
5 DISCUSSÃO	79
5.1 Estudo 1: Caracterização dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça	79
5.2 Estudo 2: Emissões de CH ₄ provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte.....	80
5.3 Estudo 3: Microbiota associada	84
6 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91

RESUMO

Emissão de metano e microbiota funcional associadas a vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas de armazenamento e transporte

Esta pesquisa teve como objetivo quantificar a emissão de metano (CH₄) proveniente da vinhaça presente em diferentes sistemas de armazenamento e transporte e, adicionalmente, avaliar, por técnicas independentes de cultivo, a microbiota funcional relacionada à produção deste gás. Para atingir esta meta foram realizados três estudos complementares. O primeiro abordou a caracterização dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça encontrados no Brasil baseado em um questionário aplicado às usinas produtoras de etanol. O segundo visou quantificar as emissões de CH₄ em condições de campo provenientes da vinhaça nos canais e tanques e também em laboratório em um estudo de incubação. O terceiro estudo avaliou a microbiota funcional associada à emissão de CH₄ através de técnicas independentes de cultivo, como PCR em tempo real (qPCR) e pirosequenciamento. As análises microbiológicas indicaram que as emissões de CH₄ são produzidas, preferencialmente, através da decomposição anaeróbia do material orgânico dissolvido da vinhaça depositados no fundo dos sistemas. Estas emissões não são desprezíveis e devem ser consideradas nos cálculos de pegada de carbono do etanol. Nos canais sem revestimento a emissão média em dois anos safras consecutivos apresentou valor de 0,75 kg CO₂ eq m⁻³ de vinhaça, aproximadamente 5 vezes superior às emissões na parte revestida. Nos tanques a emissão foi aproximadamente setenta vezes inferior quando comparada ao canal revestido. O experimento de incubação auxiliou no entendimento de que a vinhaça sozinha não produz quantidades significativas de CH₄. Entende-se que os nichos microbianos metanogênicos provavelmente são formados no sedimento, enquanto que a vinhaça mantém as condições de anaerobiose do sedimento necessárias à metanogênese e fornece nutrientes para acelerar a reação. O gênero *Methanobrevibacter* se mostrou dominante na comunidade microbiana metanogênica, conforme demonstrado pelo pirosequenciamento do gene 16S rRNA. Houve correlação positiva entre a abundância do gene 16S rRNA de Arquéia e dos genes funcionais *mcrA* e *mba* com a emissão de CH₄. As informações sobre produção e emissão de CH₄ e das características da vinhaça constituem informações importantes para tomada de decisão sobre a mitigação e/ou aproveitamento do CH₄ gerado para fins econômicos e ambientais.

Palavras-chave: Gás do efeito estufa; Efluentes; qPCR; Pirosequenciamento; Metanogênese

ABSTRACT

Methane emission and functional microbiota associated with sugarcane vinasse in storage and transportation systems

This research aimed to quantify methane (CH₄) emissions from the vinasse in different storage and transportation systems and, additionally, to evaluate the functional microbiota associated with the production of this gas by molecular biology approaches. Three complimentary studies were performed to reach this goal. The first one was related to the characterization of main vinasse storage and transportation systems adopted in Brazil based on a survey administered to the mills, in south-central region of Brazil, producing sugarcane ethanol. The second aimed to quantify the CH₄ emissions from vinasse in both, field - channels and tanks - and laboratory conditions. The third study evaluated the functional microbiota associated with the CH₄ emission by molecular biology approaches like real time PCR and pyrosequencing. Microbial analysis indicated that CH₄ emissions are produced preferably by anaerobic decomposition of the organic material dissolved in the vinasse and deposited on the bottom of the systems. These emissions are not negligible and should be considered in ethanol's carbon footprint calculations. At the uncoated part of the channel, the average emission from two crop years was 0.75 kg CO₂ eq m⁻³ of vinasse, about 5 times greater than the emissions at the coated part. Methane emissions from the tank were about seventy times lower than from the uncoated channel. The laboratory experiment supported the understanding that the vinasse alone produces no significant emission of CH₄. The microbial methanogenic niches were probably formed in the sediment, while the vinasse keeps sediment anaerobic conditions necessary for methanogenesis and provides nutrients to speed up the reaction. The *Methanobrevibacter* genus showed dominant in methanogenic microbial community, as demonstrated by pyrosequencing of the 16S rRNA gene. There was a positive correlation between the abundance of 16S rRNA gene Archaea and the functional mcrA and mba genes with the emission of CH₄. Information on production and emission of CH₄ and vinasse characteristics are important for decision making on mitigation and/or use of gas generated for economic and environmental purposes.

Keywords: Greenhouse gas; Effluents; qPCR; Pyrosequencing; Methanogenesis

1 INTRODUÇÃO

A preocupação mundial em relação às mudanças do clima no planeta, decorrentes das emissões de gases do efeito estufa (GEE), tais como o dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) e metano (CH_4) (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2007) têm sido crescente.

No Brasil, as principais fontes de emissão de GEE estão associadas ao desmatamento, queima de combustíveis fósseis e setor agropecuário (CERRI et al., 2009). Neste sentido, diversas estratégias vem sendo propostas para mitigar estas emissões, sobretudo aquelas relacionadas à redução do desmatamento, melhoria da atividade agropecuária e produção de biocombustíveis (CERRI et al., 2010).

Na produção de biocombustíveis, destaca-se a produção de etanol de cana-de-açúcar, apontada por diversos estudos, como importante estratégia, principalmente na mitigação dos emissões advindas da queima de combustíveis fósseis (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008, SEABRA et al, 2011; CAVALETT et al, 2013), uma vez que o CO_2 emitido pela combustão deste combustível é neutralizado pela cultura da cana-de-açúcar através da fotossíntese.

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, produzindo 21,6 bilhões de litros em 2012 (RENEWABLE FUEL ASSOCIATION, 2013). Entretanto, a capacidade do etanol mitigar as emissões de GEE está associado às estratégias de manejo utilizadas (DAVIS et al., 2013) e à destinação dos resíduos gerados no processo produtivo.

A produção de etanol de cana-de-açúcar gera diversos resíduos, sendo que a vinhaça é o mais abundante, e pode ser considerada uma importante fonte de GEE quanto não manejada adequadamente. A vinhaça pode acarretar emissões de GEE durante o processo de armazenamento e transporte (OLIVEIRA, 2010) e após sua aplicação no campo em fertirrigação (CARMO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; PAREDES et al., 2013).

Na região centro-sul do Brasil a vinhaça de cana-de-açúcar é armazenada e transportada de diferentes maneiras, o que pode impactar significativamente na qualidade e potencial poluidor deste resíduo. Segundo normativa da CETESB, todas as unidades sucroenergéticas do estado de São Paulo devem adotar alguns critérios no quesito armazenamento e transporte, e o não cumprimento da regulamentação pode gerar multa às unidades (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 2006). Todavia, estas normas estão associadas ao impacto do resíduo na poluição de solo e água, e nada está relacionado ao potencial de emitir GEE. Em estudo pioneiro,

Oliveira (2010) verificou que o transporte da vinhaça resultou em altas emissões de CH_4 , e que estas emissões estavam associadas às condições de anaerobiose resultantes do canal condutor, bem como os conteúdos de matéria orgânica dissolvida na vinhaça.

O monitoramento das comunidades microbianas produtoras de CH_4 tem sido realizado por muitos pesquisadores, mas a maioria dos estudos está relacionada à anaerobiose extrema em manguezais, sedimentos marinhos e de água doce, solos alagados e outros ecossistemas (ANDREOTE et al., 2012; BANNING et al., 2005; FREITAG; PROSSER, 2009; NUNOURA et al., 2008; ZELEKE et al., 2013), e não ao armazenamento e transporte de resíduos agrícolas tal qual a vinhaça. Em ambientes anaeróbios, como os sedimentos de canais e tanques de armazenamento e transporte de vinhaça, estudos que avaliam os genes funcionais podem determinar a estrutura das comunidades microbianas de interesse, bem como inferir sobre fatores que podem alterar a composição destas comunidades e impactar nos fluxos de CH_4 .

Diante do exposto, o presente estudo se baseou na hipótese de que o armazenamento e transporte de vinhaça por canais abertos e não revestidos resulta em maiores emissões de CH_4 , e que a produção deste gás, ocorre principalmente, no sedimento depositado no fundo dos canais. Acredita-se ainda que variáveis como temperatura, potencial redox, matéria orgânica e vazão da vinhaça influenciam as comunidades microbianas metanogênicas, limitando esta população e causando, consequentemente, variação nas emissões de CH_4 .

O objetivo central deste estudo foi quantificar a emissão de CH_4 proveniente da vinhaça presente em diferentes sistemas de armazenamento e transporte e, adicionalmente, avaliar, por técnicas independentes de cultivo, a microbiota funcional relacionada à produção de CH_4 .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

Culturas energéticas têm expandido significativamente nos últimos anos no Brasil e entre 2000 e 2012 quase 5 milhões de hectares (Mha) de cana-de-açúcar foram expandidos elevando a um total de 9 Mha (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2014). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, o Brasil lidera o ranking dos produtores mundiais de cana-de-açúcar e na safra 2014/15 produziu 672 milhões de toneladas de cana, com aumento de 2,0% em relação à safra 2013/14, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, responsável por 51,7% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

A cana-de-açúcar é uma cultura anual, cultivada comercialmente em monocultivo e é a principal matéria-prima para obtenção de açúcar e etanol no Brasil (RUDORF et al., 2010). A demanda pelos produtos derivados da cana-de-açúcar é crescente e a proporção destinada à cada um está associada, sobretudo, às demandas e aos valores de mercado. Devido às grandes vantagens da produção simultânea de etanol e açúcar, a configuração mais adotada entre as usinas no Brasil é destilaria de etanol anexa à usina de açúcar (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008). Entretanto, novas usinas implantadas na região centro-sul do Brasil tem sido implantadas visando a produção de etanol e co-geração energia elétrica.

Desde 2007, a cana-de-açúcar tem sido a principal fonte de energia renovável no Brasil, representando 18,2 % da oferta total de energia do país, ou 18,8 % do total de energia primária em 2009 (SEABRA et al., 2011).

Embora o Brasil ocupe o segundo lugar na produção mundial de etanol, atrás apenas dos Estados Unidos, o sistema de produção brasileiro é considerado mais competitivo, pois emite menos GEE em sua cadeia produtiva e gera a própria energia a partir da queima do bagaço (FURTADO et al., 2011). Projeções indicam que a importância de se produzir biomassa no futuro deve-se ao fato desta fornecer até 20% da energia mundial utilizada no século 21 (GOLDEMBERG, 2009).

No processamento industrial da cana para produção de açúcar e etanol, quatro diferentes resíduos ou subprodutos são gerados: a palhada, atualmente deixada no solo visando a proteção e ciclagem de nutrientes e potencial para co-geração de energia (FRANCO et al., 2013), o bagaço, utilizado na co-geração de energia elétrica (AGNIHOTRI; DUTT;

TYAGI, 2010), a torta de filtro, aplicada nos sulcos de plantio com intuito de fornecer nutrientes para a cultura (NUNES JUNIOR, 2008; PENATTI; BONI, 1989; ROSSETO; DIAS, 2005) e a vinhaça, atualmente aplicada no solo em fertirrigação, visando fornecer nutrientes e água para a cana-de-açúcar (BARROS et al., 2010; CAMBUIM, 1983; RESENDE et al., 2006), mas que também pode ser biodigerida e utilizada na co-geração de energia (MORAES et al., 2014).

2.2 Vinhaça

Também denominada restilo ou vinhoto, a vinhaça se caracteriza como principal resíduo resultante do processo produtivo do etanol, gerada durante a etapa de destilação da mistura alcoólica derivada da fermentação (SHEEHAN; GREENFIELD, 1980). Trata-se de um efluente que apresenta elevada concentração de matéria orgânica, rica em macro e micronutrientes, bem como características ácidas e corrosivas, consequentes de processos relacionados ao preparo da matéria-prima para a fermentação (FUESS; GARCIA, 2012).

A elevada concentração de matéria orgânica presente na vinhaça resulta basicamente do excesso de açúcares residuais e da baixa eficiência da destilação (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). Quanto a concentração de nutrientes na vinhaça, o mais abundante é o Potássio (K), seguido de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg), e, em menores concentrações, Nitrogênio (N) e Fósforo (P) (BARROS et al., 2010). Tais características, em especial as elevadas concentrações de K, conferem-lhe um significativo potencial para substituir fertilizante sintéticos (FUESS; GARCIA, 2012).

No passado, a vinhaça era lançada nos cursos de água desencadeando uma série de fatores adversos quanto às questões ambientais, posteriormente, passou a ser aplicada no solo, o que provocou, de início, muitos questionamentos sobre os efeitos poluentes que poderia causar (BRITO et al., 2007). Este processo de aplicação *in natura*, sem qualquer tipo de tratamento nas áreas de plantio de cana-de-açúcar, foi chamado de fertirrigação, e considerado uma aparente solução para o descarte racional da vinhaça (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

Atualmente muitas tecnologias tem sido estudadas para o melhor reaproveitamento e/ou destino da vinhaça, uma vez que alguns solos, sobretudo aqueles localizados próximos aos canais condutores, já se encontram saturados, apresentando elevados teores de K (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Dentre as alternativas para o uso da vinhaça destacam-se a

reciclagem na fermentação, produção de levedura, produção de ração animal, concentração, evaporação, combustão, biodigestão anaeróbia, incineração, meio seletivo para cultivo de microalgas e posterior produção de biodiesel (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; OLIVEIRA, 2011). Segundo Laime et al. (2011) atualmente somente a fertirrigação e o reaproveitamento na fermentação podem ser consideradas tecnologias bem estabelecidas para uso em larga escala. As demais ainda se encontram em diferentes fases de pesquisa e desenvolvimento.

Atualmente, a sustentabilidade ambiental no processo de produção do etanol vem sendo amplamente discutida. Muitos benefícios sociais e econômicos foram listados (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS; GARCIA, 2012), inclusive ambientais na comparação com a produção de combustíveis fósseis (GOLDEMBERG, 2009; MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008). Porém, o tema vinhaça continua sendo polêmico nos efeitos que pode causar no ambiente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; OLIVEIRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Após a produção de etanol e anterior à aplicação de vinhaça no solo, existe uma fase intermediária onde o grande volume de vinhaça gerado é bombeado através de sistemas de armazenamento e transporte para tanques e canais externos à usina. A importância desta fase, está relacionada ao tempo de permanência do resíduo e às condições favoráveis à decomposição, e consequentemente, emissão de GEE. Em um estudo de caso, Oliveira (2010) verificou que 90% da emissão total de GEE proveniente da vinhaça estava associado ao armazenamento e transporte por canais abertos, enquanto que os demais 10% eram emitidos após sua aplicação no solo. Este estudo também observou que 99% da emissão total nos canais transportadores estavam associadas à emissão de CH_4 .

No entanto, apesar destes indícios de que o armazenamento e transporte de vinhaça podem acarretar elevadas emissões de GEE, há pouca informação sobre a real influência que estes sistemas exercem sobre o ambiente, sobretudo no que se refere a adoção dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça e das emissões de CH_4 associadas.

2.3 Armazenamento e transporte da vinhaça

Cada usina adota um sistema característico de produção, armazenamento e transporte 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 advindos do processo de produção do etanol.

Apesar de diferirem significativamente em sua configuração, os sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça são compostos basicamente por torres de resfriamento, tanques, canais e sistemas de bombeamento. Entretanto, não foram encontrados na literatura informações sobre a estimativa de adoção dos diferentes métodos de armazenamento e transporte da vinhaça entre as usinas da região centro-sul do Brasil.

Existe uma gama de sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça, os quais podem apresentar efeitos distintos na poluição de solo, água e atmosfera. Segundo normativa da CETESB (Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola – P.4.231, dez. 2006), todas as unidades sucroenergéticas devem adotar alguns critérios no quesito armazenamento e transporte e o não cumprimento destes quesitos pode gerar multa às unidades (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 2006). Ao estabelecer as condições para utilização da vinhaça, cada unidade sucroenergética deve levar em consideração a questão da capacidade de armazenamento deste resíduo, possibilitando adequado manejo da fertirrigação. O armazenamento temporário da vinhaça permite que a usina tenha flexibilidade para mudança dos equipamentos nas frentes de aplicação no campo, manejo nos períodos de precipitação elevada e possibilidade de manutenção dos equipamentos voltados à fertirrigação (LUZ, 2005).

Os tanques para transporte de vinhaça deverão ser impermeabilizados com geomembrana, ou outra técnica de igual ou superior efeito e deverão ser instalados ao lado de cada tanque de monitoramento, de acordo com o mapa potenciométrico e da Norma 13.895 de Construção de Poços de Monitoramento e Amostragem, os quais objetivam a segurança do sistema. Da mesma forma, os canais mestres ou primários de uso permanente para transporte da vinhaça durante a safra deverão ser impermeabilizados, impedindo a infiltração da vinhaça no solo. Somado a isto, ao final de cada safra os canais deverão passar por limpeza de vinhaça e ou sedimento remanescente (CETESB, 2006).

Segundo a literatura, os principais sistemas de transporte da vinhaça entre a usina e o campo são os canais de irrigação e os caminhões tanque (NUNES JUNIOR et al., 2005). Provavelmente esta estimativa já deve ter sofrido diferenças significativas, porém a literatura não apresenta dados atuais deste processo.

Atualmente, grupos sucroenergéticos, tal qual a Raízen, têm modificado o sistema de armazenamento e transporte de vinhaça, através de tanques e tubulações fechadas, em substituição aos antigos canais. Este sistema, por atuar em maior velocidade e sem contato

direto com o solo, permitindo a redução da deposição de matéria orgânica no fundo dos canais, e consequentemente, apresenta potencial redução das condições favoráveis para emissão de GEE, sobretudo CH_4 .

2.4 Metano

O CH_4 é uma molécula orgânica (hidrocarboneto) abundante na atmosfera (CICERONE; OREMLAND, 1988). Sua concentração aumentou cerca de 150% no período entre 1750 e 2008, passando de 715 para 1787 partes por bilhão em volume (ppbv), respectivamente (DLUGOKENCKY et al., 2011), e vem aumentando a uma taxa de 7 ppbv ano⁻¹ (IPCC, 2007).

Apesar de apresentar curto período de residência (12 anos) na atmosfera, o CH_4 influencia o clima global diretamente pela capacidade de absorver radiação infravermelha e, indiretamente, através de reações fotoquímicas (CICERONE; OREMLAND, 1988). A capacidade de reter radiações infravermelhas torna o CH_4 25 vezes mais eficiente que o CO_2 (IPCC, 2007) e por estar próximo à uma fase estacionária, reduções das emissões de CH_4 podem causar benefícios imediatos ao clima (DLUGOKENCKY et al., 2011).

A abundância atmosférica global média de CH_4 é determinada pela interação entre as emissões e drenos. As fontes de emissões de CH_4 são diversas, abrangendo uma vasta gama de fontes de origem biogênica, como sedimentos marinhos e de água doce, zonas úmidas, pântanos, cupins, fontes geológicas, madeira molhada, incêndios florestais, corpos d'água, e antrópicas, como produção de energia, mineração, aterros sanitários, tratamento de resíduos, tratamentos intestinais especialmente de ruminantes, agricultura como cultivo de arroz, queima de biomassa (MACKIE; WHITE; BRYANT, 1992; O'CONNOR et al., 2010), e manejo de dejetos ou subprodutos (DINUCCIO; BERG, BALSARI, 2008; SARDÁ et al., 2010), resultantes principalmente do setor agrícola, tal como a vinhaça (OLIVEIRA, 2010).

Para saber a real contribuição do CH_4 nas mudanças climáticas globais é necessário realizar e entender análises quantitativas entre as fontes e os drenos deste GEE na atmosfera. Estimativas desta contribuição têm sido realizadas através da aplicação de uma variedade de técnicas de estudo, entre elas medições de campo, análises econômicas, modelagem matemática, utilização de análises isotópicas como ^{13}C e ^{12}C , monitoramento de compostos orgânicos, entre outras (O'CONNOR et al., 2010).

Em torno de 70-80% do CH_4 presente na água, solo, sedimentos e atmosfera é originário de fontes biológicas, produzido através da decomposição anaeróbica da matéria orgânica realizada por microrganismos (LE MER; ROGER, 2001; MACKIE; WHITE; BRYANT, 1992).

A degradação anaeróbica da matéria orgânica ocorre de forma sequencial, envolvendo diferentes níveis tróficos microbianos em direção aos compostos simplificados. 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). A Figura 1 apresenta esquema detalhado de digestão anaeróbica, 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 anaeróbica: 1. Bactérias fermentativas hidrolíticas; 2. Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; 3. Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio; 4. Arquéias metanogênicas redutoras de CO_2 ; 5. Arquéias 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 complexos presentes no sistema são hidrolisados a unidades mais simples pela 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 CO_2 (CHERNICCHARO, 1997).

Nas etapas 2 e 3 ocorre a acetogênese, oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para arqueias 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_2), o CO_2 e o acetato (CHERNICACHARO, 1997).

As duas últimas etapas (4 e 5), correspondem à produção do CH_4 , conhecida como metanogênese, a qual pode ocorrer por dois caminhos: O primeiro caminho é a metanogênese hidrogenotrófica, produção de CH_4 a partir do H_2 , na qual o CO_2 atua como acceptor de elétrons, sendo reduzido a CH_4 . A segunda etapa é a da metanogênese acetotrófica, produção de CH_4 a partir de acetato, em que o C orgânico, na forma de acetato (ácido acético) é convertido em CH_4 (MACKIE; WHITE; BRYANT, 1992).

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

2.5. Microbiota metanogênica e o seu estudo através das técnicas moleculares

A decomposição anaeróbia da vinhaça é realizada principalmente por um grupo específico de microrganismos conhecidos como metanogênicos. Estes microrganismos são procariotos pertencentes ao domínio Arquéia.

Criado por Carl Woese com base em estudos filogenéticos, a nova classificação dos seres vivos substituiu os cinco reinos da taxonomia Lineana tradicional por três domínios: Bactéria, Arquéia e Eucária (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990), sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas, e o terceiro domínio englobando todos os organismos eucarióticos. Dos dois domínios procarióticos conhecidos, Arquéia é o menos estudado e compreendido. Após sua criação, passou por várias alterações taxonômicas e novos filos têm sido criados desde então. Atualmente este domínio consiste em cinco filos: *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota* (POLÓNIA et al., 2014).

Na época de sua descoberta, as arqueias foram consideradas habitantes exclusivos de ambientes extremos, porém estudos recentes baseados em técnicas independentes de cultivo têm demonstrado o domínio Arquéia como cosmopolita, e entre os possíveis habitats inclui-se tecidos de várias espécies de esponjas (POLÓNIA et al., 2014), sedimentos marinhos e de água doce (CHAUDHARY et al., 2013; GUEVARA et al., 2014), colunas de água (ZHANG et al., 2014), diferentes tipos de solos (BATES et al., 2011), entre outros.

Arquéias mesofílicas antes inseridas no filo *Crenarchaeota*, conhecido por englobar arqueias hipertermofílicas redutoras de enxofre, passaram a fazer parte do novo filo *Thaumarchaeota* (BROCHIER-ARMANET et al., 2008; SPANG et al., 2010). *Euryarchaeota*, compreende espécies metanogênicas, halofílicas extremas e algumas hipertermofílicas. *Korarchaeota* é baseado na amplificação do gene 16S rRNA de amostras ambientais ainda não cultivadas como alguns hipertermofílicos de fontes termais e por último, *Nanoarchaeota*, conhecido como evolução do filo *Euryarchaeota* (POLÓNIA et al., 2014).

Arquéias metanogênicas eram consideradas anaeróbias extremas incapazes de sobreviver em elevadas concentrações de oxigênio (O_2). No entanto, nos tempos atuais já existem relatos de tolerância destes microrganismos à exposição substancial de O_2 , mesmo havendo inibição da metanogênese (BASTVIKEN, 2009).

Provavelmente, a característica mais evidente das arqueias metanogênicas está relacionada com sua especificidade catabólica, e assim podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com o substrato utilizado: 1. H_2/CO_2 e formato – ex. gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanogenium*; 2. Acetato – ex. gênero *Methanosaeta*; 3. H_2/CO_2 e acetato – ex. gênero *Methanosarcina*; E por último, 4. Metanol – ex. gêneros *Methanococcus* e *Methanobolus* (MACKIE; WHITE; BRYANT, 1992).

Este grupo microbiano compartilha características únicas incluindo componentes exclusivos de membrana de fosfolípidos, altas concentrações intracelulares da coenzima F420, que resulta em autofluorescência após estimulação sob microscópio de fluorescência, e da metil coenzima M redutase (*mcrA*), que juntamente com o gene 16S rRNA tem sido utilizado amplamente como marcador específico no estudo de diversidade e abundância de grupos metanogênicos (BASTVIKEN, 2009; CHAUDHARY et al., 2013; POLÓNIA et al., 2014).

Informações sobre distribuição e diversidade metanogênica presentes em diferentes sedimentos são escassas. Abordagens tradicionais dependentes de cultivo, apesar de importantes, demandam tempo e exigem um alto grau de precisão para a correta identificação

destes microrganismos (CHAUDHARY et al., 2013), e por isso, se revelaram insuficientes, podendo ocasionar em perdas de informações.

Os avanços no campo da biologia molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas que não requerem o isolamento e cultivo de microrganismos. Com estas técnicas, o DNA total de diferentes amostras como sedimento de tanques e canais de vinhaça é extraído e pode ser analisado de acordo com o objetivo. 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 pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análises dos *amplicons* por diversas técnicas, como DGGE (*fingerprinting*), bibliotecas de clones, pirosequenciamento, *microarray*, PCR em tempo real (qPCR), entre muitas outras (HE et al., 2007; CARDENAS; TIEDJE, 2008; CHAUDHARY et al., 2013).

A maioria das técnicas são utilizadas em conjunto, quando se quer entender a dinâmica de comunidades microbinais tal como a abundância, diversidade e mesmo variação na estrutura, tal qual qPCR e pirosequenciamento.

A qPCR foi desenvolvida com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse (DÖLKEN et al., 1998, HEID et al., 1996). Esta técnica envolve a detecção em tempo real de uma molécula repórter (R), que aumentará a emissão de fluorescência para cada aumento na concentração dos produtos de PCR detectado ao final dos ciclos. O valor da fluorescência, será a medida de comparação com o valor inicial chamado de *threshold* (ct), que gerará como resultado, a abundância relativa de comunidades microbianas estudadas em cada amostra (CHAUDHARY et al., 2013). Assim, torna-se possível a quantificação do gene de interesse ao mesmo tempo em que ocorre sua amplificação.

Inicialmente descrito por Ronaghi et al. (1996), a técnica de pirosequenciamento tem como base a utilização de moléculas de pirofosfato (PPi) na detecção da incorporação de nucleotídeos específicos. Chamado de “método de síntese”, a leitura da sequência na plataforma 454 é realizada a partir da combinação de reações enzimáticas iniciadas com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera CCD (*charge-coupled device*) acoplada ao sistema (CARVALHO; SILVA, 2010). A conversão de PPi em luz é um processo estequiométrico, onde cada molécula de PPi gera

quantidades definidas de fótons e a intensidade luminosa emitida pela reação é captada pelos sensores do seqüenciador (RONAGHI, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta tese é composta por três estudos que se complementam. Na Figura 2 está apresentado um fluxograma, indicando a estrutura do projeto e as interações dos estudos realizados.

Os estudos foram realizados com o objetivo de traçar um panorama do processo de armazenamento e transporte da vinhaça, bem como quantificar as emissões de CH_4 e os principais microrganismos envolvidos na produção deste gás. No **Estudo 1** foi realizado um levantamento dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça adotados na região centro-sul do Brasil, através da elaboração e aplicação de um questionário em diversas usinas sucroenergéticas. Uma vez identificados estes sistemas e escolhidas as áreas de atuação, o **Estudo 2** abrangeu a quantificação das emissões de CH_4 nos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça ao longo dos anos safra 2012/2013, além de uma incubação em laboratório para isolar os efeitos da vinhaça e do sedimento na produção do CH_4 . O **Estudo 3** buscou identificar a estrutura das comunidades microbianas funcionais presentes nos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça e no experimento de incubação, e ainda traçar correlações entre estas comunidades microbianas e as emissões de CH_4 .

Figura 2 – Diagrama dos estudos realizados no presente projeto bem como as ferramentas utilizadas na abordagem metodológica

3.1 Estudo 1: Caracterização dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça

3.1.1. Levantamento dos dados

Para o levantamento dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça adotados na região centro-sul do Brasil e posterior classificação das usinas quanto a estes sistemas, foi elaborado um questionário através do site www.surveymonkey.com. Mais de 100 usinas sucroenergéticas localizadas na região centro-sul do Brasil foram contactadas e convidadas a participar do levantamento. O contato inicial foi realizado via email e ou telefone, e sempre foi mencionado que haveria total sigilo com os dados disponibilizados e não seriam associados os nomes das respectivas empresas com as informações disponibilizadas.

O questionário continha 19 questões de caráter descritivo, as quais englobavam informações sobre produção, armazenamento e transporte da vinhaça, infraestrutura disponível, características e tratamento do resíduo, e disposição final da vinhaça.

Apesar de a solicitação de resposta ter sido feita a mais de uma centena de usinas, apenas 16 unidades sucroenergéticas aceitaram participar do levantamento. A baixa adesão das usinas está associada ao fato da vinhaça ser um resíduo volumoso e foco de fiscalizações e autuações ambientais devido ao manejo inadequado. Durante a aplicação do questionário, algumas usinas, sobretudo aquelas localizadas no estado de São Paulo, mencionaram que não gostariam de fornecer tais informações, pois ainda não estavam totalmente alinhadas com as normativas dos órgãos ambientais.

A seguir estão apresentadas as questões contidas no questionário:

1. Unidade média de vinhaça produzida por dia (m^3).
2. Se há reutilização do calor da vinhaça dentro da indústria e em caso positivo, em que forma se encontra.
3. Forma de bombeamento da vinhaça.
4. Quantidades de casas de bomba existentes na usina.
5. Temperatura inicial e, se houver, temperatura após o resfriamento da vinhaça.
6. Análises físico-químicas da vinhaça realizadas pela usina e sua periodicidade.
7. Se é realizada desidratação da vinhaça pela usina.
8. Se é realizada biodigestão da vinhaça.

9. Se é realizado monitoramento das dornas de fermentação e em caso positivo, se a usina emite relatórios com os dias de contaminação, dosagem e tipo de antibiótico utilizado.
10. Quantidade de vinhaça aplicada na lavoura (m^3).
11. Formas de aplicação de vinhaça.
12. Principais formas de armazenamento e transporte de vinhaça.
13. Quantidade de cada sistema de armazenamento e transporte de vinhaça, como canais revestidos, não revestidos e tanques.
14. Extensão dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça.
15. Tipo de revestimento dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça.
16. Largura e profundidade dos sistemas de armazenamento e distribuição de vinhaça.
17. Fluxo diário de vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte.
18. Período de utilização de cada sistema de transporte de vinhaça ao longo da safra.
19. Periodicidade de limpeza dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça.

As respostas obtidas foram agrupadas e importadas para o Microsoft® Office® Excel para realização da estatística (porcentagens e tendências) e classificação dos sistemas.

3.2 Estudo 2: Quantificação das emissões de CH₄ provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte

3.2.1 Experimentos de campo

3.2.1.1 Localização das áreas de estudo

A escolha das áreas de estudo para determinação dos fluxos de CH₄ provenientes da vinhaça em diferentes sistemas de transporte e armazenamento foi realizada com base nas respostas ao questionário descrito no Estudo 1. Nesta etapa inicial, observou-se que os principais sistemas de armazenamento e transporte da vinhaça na região centro-sul do Brasil estão baseados em tanques revestidos e tubulações e em canais revestidos e não revestidos.

Para tanto, foram selecionadas duas usinas sucroenergéticas, contrastantes no sistema de armazenamento e transporte de vinhaça, para a realização dos estudos de quantificação das emissões de CH_4 durante as etapas de armazenamento e transporte de vinhaça e avaliação dos principais microrganismos envolvidos na produção do gás.

As duas unidades sucroenergéticas selecionadas estão localizadas nas regiões de Bauru ($22^\circ 29' 32''\text{S}$, $48^\circ 46' 57''\text{W}$) e Piracicaba ($22^\circ 38' 05''\text{S}$ $47^\circ 41' 09''\text{O}$) (Figura 3), e representam respectivamente os sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça baseado em canais revestidos e não revestidos e sistemas de tanques revestidos e tubulações. As duas usinas estão localizadas em áreas com classificações climáticas similares (Cwa, subtropical úmido) e apresentam altitude média de 520 m e 554 m, respectivamente nas regiões de Bauru e Piracicaba.

Figura 3 – Mapa do Brasil com destaque para o estado de São Paulo e a localização das áreas de estudo

3.2.1.2 Descrição das áreas de estudo

Área de estudo A: Canais revestidos e não revestidos

A área de estudo A é composta por 40 km de canais revestidos e 20 km de canais não revestidos. Os dois tipos de canais, tratam-se de um sulco feito com retroescavadeira com as seguintes dimensões e características: i) canal revestido – localizado próximo à usina, sendo o primeiro local onde a vinhaça passa após sair da indústria. Este canal é revestido com

cimento, e apresenta largura média de 1,5 m e profundidade de 0,6 m (Figura 4a). ii) canal não revestido – localizado após a parte revestida, apresenta largura média de 1,5 m e profundidade média de 0,7 m e a vinhaça é transportada, através de gravidade e bombeamento em contato direto com o solo (Figura 4b).

Figura 4 – Sistema de armazenamento e transporte de vinhaça por canais. a – canais revestidos. b- canais não revestidos

Área de estudo B: Tanques e tubulações

Neste estudo de caso avaliou-se uma usina que apresenta um sistema de armazenamento e transporte de vinhaça baseado em tanques e tubulações. Esta usina possui um total de dez tanques, sendo que sete destes são utilizados esporadicamente e apenas três são utilizados durante toda a safra. Estes últimos foram selecionados para monitorar a emissão de CH_4 do presente estudo. O tanque 1 apresenta dimensões de 25 m x 20 m de diâmetro, 2 m de profundidade, com volume potencial de 1000 m^3 . O tanque 2 apresenta dimensões de 45 m x 25 m de diâmetro, 2 m de profundidade, com volume potencial de 2300 m^3 (Figura 5a). E por último, o tanque 3 apresenta 56 m x 30 m de diâmetro, 2 m de profundidade, com volume potencial de 4256 m^3 . Os três tanques são revestidos com polietileno de alta resistência e o transporte da vinhaça entre eles é realizado através de casas de bomba e tubulações. A vinhaça fica temporariamente armazenada nestes tanques, e em seguida é bombeada com alta

velocidade até o campo por tubulações fechadas (Figura 5b), não exibindo condições propícias para ocorrer emissões significativas de CH_4 .

Figura 5 – Sistema de armazenamento e transporte de vinhaça por tanques (a), e tubulações fechadas (b)

3.2.1.3 Atributos físico-químicos da vinhaça

Para determinar as variáveis que mais influenciam a comunidade microbiana metanogênica e, conseqüentemente, a emissão de CH_4 pela vinhaça, foram realizadas avaliações e monitoramento *in situ* concomitante às amostragens de CH_4 . Foram realizadas medições de temperatura, pH e potencial redox (Eh) da vinhaça transportada. Outras análises, tais como carbono total (C), nitrogênio total (N), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas em laboratório, imediatamente após a coleta de vinhaça no campo.

3.2.1.4 Quantificação dos fluxos de CH_4 provenientes da vinhaça

Para quantificar as emissões de CH_4 provenientes do processo de armazenamento e transporte da vinhaça foram coletadas amostras de gases ao longo dos diferentes sistemas de distribuição. No sistema de transporte por canais foram estabelecidos quatro pontos de amostragem no canal revestido e quatro pontos no canal não revestido (Figura 6a). Tanto na parte revestida, quanto na não revestida, os pontos de monitoramento das emissões de CH_4 foram alocados de forma equidistante, visando representar melhor a heterogeneidade do canal e proporcionar extrapolação mais adequada das emissões. No sistema de armazenamento e transporte por tanques foi realizada a coleta em um ponto na região central de cada um dos tanques (Figura 6b).

Figura 6 – Esquema ilustrativo representando os principais sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça, bem como os pontos de amostragem de CH_4 em cada um dos sistemas. a – sistema de armazenamento e transporte por canais revestidos e não revestidos. b – sistema de armazenamento e transporte por tanques e tubulações

As amostragens de CH_4 foram realizadas ao longo dos anos safra de 2012 e 2013. Para os sistemas de armazenamento e transporte por canais, as amostragens foram iniciadas em junho de 2012 e finalizadas em dezembro de 2013, totalizando 22 coletas.

Já para o sistema de tanques e tubulações as amostragens iniciaram em outubro de 2012 e finalizaram em dezembro de 2013, totalizando 16 coletas. A quantificação dos fluxos de CH_4 no sistema de tanques foi iniciada tardiamente devido atraso na autorização da usina para montagem dos sistemas de coleta, uma vez que foi necessária a montagem de um sistema composto por roldanas e cabos de aço para realizar a coleta na região central dos tanques. Na Figura 7 estão apresentados sistemas para coleta automática dos fluxos de CH_4 nos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça.

Figura 7 – Sistema automatizado de amostragem das emissões de CH_4 nos sistemas de armazenamento e transporte da vinhaça por canais (a) e por tanques e tubulações (b)

Em cada um dos pontos de coleta de CH_4 foram utilizadas três câmaras estáticas flutuantes automáticas para superfície líquida. Estas câmaras foram confeccionadas em alumínio e ajustadas para manter um volume interno de 20 litros. As câmaras apresentam um sistema de flutuação que permite que o volume interno seja mantido constante. As amostras de gases foram coletadas automaticamente em *vials* de 40 mL através da abertura de válvulas solenóides em tempos pré-estabelecidos (0, 5, 10 e 20 minutos) com o auxílio de uma bateria externa. Anterior à abertura de cada válvula e coleta das amostras foi acionada uma ventoinha no interior de cada câmara por 10 segundos para homogeneização do ambiente interno da câmara.

Após coletadas no campo as amostras de gases foram encaminhadas ao Laboratório de Biogeoquímica Ambiental – (LBA-CENA/USP) para análises. A determinação das concentrações de CH_4 foram realizadas por cromatografia gasosa no equipamento SRI-GC-110® através do FID (*Flame Ionization Detector*). O fluxo deste GEE foi calculado pela

alteração linear das concentrações em função do tempo de incubação dentro da câmara, de acordo com a equação (1) usada por Hutchinson; Livingston (1993):

$$F = (\Delta g / \Delta t) (V/A)k \quad (1)$$

Sendo:

(F) = fluxo de CH₄ (mg m⁻² h⁻¹)

(Δg/Δt) = alteração da concentração de CH₄ dentro da câmara analisada (mg h⁻¹)

(V) = volume da câmara utilizada na amostragem (L);

(A) = área da câmara (m²);

As emissões médias de CH₄ foram obtidas pelo valor médio das três câmaras em cada um dos pontos de amostragem nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça. A emissão anual acumulada de CH₄ ao longo do período experimental foi calculada pela interpolação linear dos fluxos obtidos entre duas coletas sucessivas e a integração numérica da área da curva foi realizada pela regra do trapézio (WHITTAKER; ROBINSON, 1967).

3.2.1.5 Conversão dos fluxos de CH₄ em CO₂ equivalente (CO₂ eq) e extrapolação das emissões para toda safra 2012/2013

Para converter os fluxos de CH₄ em CO₂ eq utilizou-se o potencial de aquecimento global de 25, conforme proposto em IPCC. (2007). Para quantificar a emissão total de CH₄ em CO₂ eq proveniente da vinhaça nos sistemas de armazenamento e transporte por canais e tanques foram utilizadas as equações 2 e 3, respectivamente.

$$E_{\text{canais}} = ((E_{P1} \cdot A_{P1}) + (E_{P2} \cdot A_{P2}) + (E_{P3} \cdot A_{P3}) + \dots + (E_{P8} \cdot A_{P8})) \cdot f \quad (2)$$

$$E_{\text{tanques}} = ((E_{T1} \cdot A_{T1}) + (E_{T2} \cdot A_{T2}) + (E_{T3} \cdot A_{T3})) \cdot f \quad (3)$$

Sendo:

E_{canais} = emissão total no sistema de armazenamento e transporte por canais (kg CO₂ eq dia⁻¹);

E_{tanques} = emissão total no sistema de distribuição por tanques ($\text{kg CO}_2 \text{ eq dia}^{-1}$);

$E_{P1}, E_{P2}, E_{P3}, E_{P4}, E_{P5}, E_{P6}, E_{P7}, E_{P8}$ = emissão de CH_4 em cada ponto ($\text{mg CO}_2 \text{ eq m}^{-2} \text{ h}^{-1}$);

E_{T1}, E_{T2}, E_{T3} = emissão de CH_4 em cada tanque ($\text{mg CO}_2 \text{ eq m}^{-2} \text{ h}^{-1}$);

$AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8$ = área (m^2) representada por cada ponto

A_{T1}, A_{T2}, A_{T3} = área (m^2) de cada tanque

f = fator de conversão de $\text{mg de CO}_2 \text{ eq h}^{-1}$ em $\text{kg CO}_2 \text{ eq dia}^{-1}$

A quantidade média de produção de vinhaça utilizada no cálculo foi de $9340 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$ para o sistema de armazenamento e transporte baseado em canais no ano de 2012 e 10547 e $6500 \text{ m}^3 \text{ vinhaça dia}^{-1}$, respectivamente para canal e tanque, no ano de 2013. E o período da safra foi de 244 dias para canal em 2012 e 238 e 210, respectivamente para canal e tanque no ano de 2013.

3.2.2 Experimento de incubação em laboratório

Uma vez que as emissões de CH_4 proveniente do armazenamento e transporte da vinhaça são resultantes da decomposição anaeróbica de materiais contidos na vinhaça e no sedimento e da interação entre estes dois componentes (OLIVEIRA, 2010), foi realizado um experimento de incubação de laboratório visando identificar a contribuição de cada um destes componentes no fluxo total de CH_4 . Para a realização deste experimento foram coletadas amostras de vinhaça e sedimento na mesma área de estudo que apresenta sistema de distribuição por canais (área 1), sendo as coletas realizadas em junho de 2013. As amostras de vinhaça foram coletadas em galões de 5 litros, e as de sedimento por meio de uma sonda amostradora com alça. Estas amostras foram mantidas refrigeradas e encaminhadas para o laboratório. No laboratório este material foi mantido refrigerado por 24 horas até a montagem do experimento.

O experimento foi instalado em condições controladas de temperatura (20°C) nas dependências do LBA-CENA/USP. Para montagem do experimento foram utilizados frascos de 1,5 L com adição de cânula de vidro e biqueira na tampa para realização das coletas de gás.

Para isolar os efeitos da vinhaça e do sedimento nos fluxos de CH_4 foram estabelecidos três tratamentos de incubação: apenas vinhaça (V); sedimento coletado ao fundo do canal não revestido (S) e vinhaça + sedimento (V+S). A seguir estão apresentadas as

características físico-químicas da vinhaça, sedimento e vinhaça + sedimento utilizados neste experimento (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização físico-química da vinhaça e sedimento presente nos diferentes tratamentos do experimento de incubação

Tratamentos	Temperatura	Eh	COT	NT	DBO	DQO
	°C	mV	-----mg L ⁻¹ -----			
V+S	19,7	-206	6417	201	22523	39729
S	19,5	-233	179*	22*	20307	38990
V	19,5	-225	6222	140	18601	35480

*dados apresentados em mg por g de sedimento⁻¹ seco.

Para a montagem do sistema de incubação foi colocado o equivalente a 500 mL de cada substrato nos frascos, resultando em um espaço vazio (*headspace*) de aproximadamente 1 litro. Cada tratamento foi realizado com cinco repetições. Para determinação das concentrações de CH₄ provenientes do experimento de incubação foram utilizadas amostras coletadas a partir do *headspace*. O tempo de incubação foi determinado através de testes e monitoramento da saturação do CH₄. As amostras foram coletadas em seringas de nylon tipo BD de 20 mL em intervalos regulares de 0, 30 e 60 minutos. O experimento durou ao todo 16 dias, onde as amostragens foram realizadas diariamente até o nono dia após início da incubação e a partir do décimo a amostragem foi realizada a cada dois dias. As análises de CH₄ foram realizadas imediatamente após a coleta por cromatografia gasosa seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Os fluxos diários de CH₄ foram calculados pela alteração linear das concentrações em função do tempo de incubação dentro de cada frasco.

3.3 Estudo 3: Levantamento da microbiota funcional associada à emissão de CH₄

Partindo do pressuposto que diferentes condições de armazenamento e transporte de vinhaça resultarão em condições de anaerobiose distintas, este estudo visou avaliar a microbiota funcional nestas diferentes condições e suas correlações com os fluxos de CH₄. Para tanto, foram realizadas análises microbiológicas da vinhaça e do sedimento depositado ao fundo dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça ao longo do período de estudo.

3.3.1 Amostragem de vinhaça e sedimento

As amostragens de vinhaça e sedimento para análises microbiológicas foram realizadas no início, meio e final da safra de 2012 para os sistemas baseados em canais e somente no final da safra de 2012 para o sistema baseado em tanques. Os locais estabelecidos para coleta de vinhaça e sedimento foram os mesmos utilizados para amostragens de CH₄ (Figura 6).

No transecto de canal revestido foram coletadas amostras somente em P3, devido a ausência de sedimento ao fundo do canal nos demais pontos de coleta de CH₄. Na parte não revestida do canal, foram coletadas amostras nos pontos P5, P6 e P7, uma vez que em P8 também não havia sedimento no fundo do canal. No sistema de tanques, realizou-se amostragem somente em dois dos três tanques utilizados para coleta de CH₄, uma vez que o tanque 1 também não apresentou sedimentação do material. As coletas de sedimento nos tanques ocorreram somente ao final da safra devido ausência de sedimento nos demais períodos.

A coleta de sedimento foi realizada com o auxílio de uma sonda amostradora com alça, onde três repetições foram coletadas (0-20 cm de profundidade e 5 cm de diâmetro). Para amostragem de vinhaça foram utilizados frascos de meio litro, sendo as amostras coletadas em triplicatas. Após coletadas, amostras de sedimento e vinhaça foram armazenadas em gelo e congeladas a -80 °C no laboratório.

3.3.2 Extração de DNA

A extração do DNA total genômico do sedimento e vinhaça foi realizada com a utilização do kit de extração *PowerSoil* DNA (MoBio Laboratories, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,5% e a quantidade de DNA foi determinada através do Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Para realização da extração de DNA total genômico proveniente do experimento de incubação amostras de sedimento e vinhaça foram coletadas em triplicatas no primeiro e último dia de experimento em tubos *falcon* de 15 mL para cada tratamento. O DNA extraído foi diluído para 10 ng mL⁻¹ e armazenado em -80°C para realização das seguintes análises.

3.3.3 PCR em tempo real

A abundância dos genes ribossomais 16S rRNA de Procarioto, Bactéria e Arquéia e dos genes funcionais *mcrA* e *mba* (*Methanobrevibacter* sp.) foi quantificada através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para todas as amostras de sedimento, provenientes dos diferentes sistemas de transporte de vinhaça e também do experimento de incubação. Realizou-se também a amplificação a partir das amostras de vinhaça, provenientes do campo e do experimento de incubação. Porém, as amostras de vinhaça provenientes do campo apresentaram problemas na amplificação e por isso foram descartadas. As reações foram realizadas no equipamento 7500 (Applied Biosystems), utilizando o sistema SYBR GreenI e grupos de *primers* específicos para seus respectivos genes alvo (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos conjuntos de primers utilizados para análise de qPCR

<i>Primer</i>	Grupo alvo	Sequência (5'-3')	Tamanho(pb)	Referência
PRK 341F	Procariotos	5' - CCTAC GGGRB GCASC AG	466	Yu et al., (2005)
PRK 806R		- 3' 5' - GGACT ACYVG GGTAT CTAAT- 3'		
BAC 338F	Bactéria	5' - ACTCC TACGG GAGGC	468	Yu et al., (2005)
BAC 805R		AG - 3' 5' - GACTA CCAGG GTATC TAATC C - 3'		
ARC 787F	Arquéia	5' - ATTAG ATACC CSBGT	273	Yu et al., (2005)
ARC 1059R		AGTCC - 3' 5' - GCCAT GCACC WCCTC T - 3'		
ME 1	<i>mcrA</i>	5' - GCMAT GCARA THGGW	790	Juottonen et al., (2006)
ME 2		ATGTC - 3' 5' - TCATK GCRTA GTTDG GRTAGT - 3'		
MBA F	<i>mba</i>	5' - CGCTA AACCT CCGCA	194	Desenhado
MBA R		ATGTG - 3' 5' - TTAAA CCGGC TACGA ACGCT - 3'		

As amplificações para os genes 16S rRNA de Procarioto, Bactéria e Arquéia foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos

de amplificação: 94°C por 10 minutos, 94°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, sendo realizada posteriormente duas extensões finais de 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. Ao final da reação incluiu-se uma curva de desnaturação (*melting*) nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos, com leitura de dados a cada 0,7°C.

As amplificações para o gene funcional *mcrA* foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação: 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, sendo realizada posteriormente duas extensões finais de 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. Ao final da reação incluiu-se uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos, com leitura de dados a cada 0,7°C.

E por final, as amplificações para o gene funcional *mba* foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação: 95°C por 5 minutos, 95°C por 45 segundos, 58,3°C por 45 segundos sendo realizada posteriormente uma extensão final de 72°C por 1,30 minutos. Ao final da reação incluiu-se uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos, com leitura de dados a cada 0,7°C. Da mesma forma que para os demais genes quantificados em todas as reações foi incluído controle negativo, usando água como molde em vez de DNA.

3.3.4 Pirosequenciamento

Para realização do pirosequenciamento do gene 16S rRNA de Procarioto realizou-se amplificações em triplicata de todas as amostras de sedimento provenientes tanto do campo quanto do experimento de incubação. Da mesma forma que para qPCR, a amplificação do gene a partir das amostras de vinhaça apresentaram problemas e foram descartadas e o pirosequenciamento foi realizado somente a partir das amostras de sedimento.

O pirosequenciamento foi realizado pelo Centro de Biotecnologia situado na Universidade de Illinois Urbana-Champaign, através da utilização da plataforma 454 Titanium (Roche, EUA). Os genes 16S rRNA (região V4-V5) foram amplificados a partir da utilização do *primer* universal 519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') como *forward* e diferentes *tags* de identidade (*Barcode*) como *reverse*. Para cada amostra foi utilizado um

barcode diferente. Como controle positivo foi utilizada amostra ambiental conhecida anteriormente já sequenciada.

As amplificações foram realizadas em duplicatas, o volume total das reações de PCR foi de 50 µl, contendo 10 µl de Taq5X Master Mix (BioLabs Inc., New England), 2 µl de DNA genômico (10 ng), 2 µl (10 µM) de cada *primer*, 2 µl de DMSO e o restante completado com água estéril. O produto da PCR das amostras foi verificado em gel de agarose 1,5%, purificado com a utilização do kit de purificação *QIAquick* PCR purification kit (Qiagen Sample & Assay Technologies) e enviado para sequenciamento.

3.4 Análise estatística dos dados

No experimento de campo a análise estatística dos dados foi realizada considerando delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada ponto de amostragem de CH₄. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados e o teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para comparação das médias entre os sistemas bem como para comparação da abundância dos genes de interesse quantificados por qPCR. Foram realizadas análises de correlação simples entre variáveis (Correlação de Pearson) entre os fluxos de CH₄ e atributos físico-químicos da vinhaça e abundância dos genes funcionais. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.

Para as análises das sequências obtidas a partir da técnica de pirosequenciamento foi utilizado como *pipeline* o *Quantitative insights into microbial ecology* (QIIME 1.8). Foi realizada classificação das sequências quanto à qualidade por triagem, onde sequências que apresentaram *score* abaixo de 25 e tamanho inferior à 200 pares de bases (pb) foram removidas. Após remoção das sequências dos *primers* foi detectado os possíveis erros de sequenciamento com a utilização da ferramenta Denoiser. A partir desta matriz foi calculado o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). A riqueza de UTOs foi estimada mediante uso do estimador Chao1 e a diversidade das comunidades do gene 16S rRNA foi verificada através do índice de Distância Filogenética (*PD Whole Tree*). A Beta diversidade foi expressa através de uma Análise de Componentes Principais (PCA).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo 1: Caracterização dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça

Com as informações obtidas por meio do questionário foi possível traçar em linhas gerais o destino da vinhaça após a fase industrial. E desta forma, melhor direcionar e embasar as decisões com respeito a locais (pontos amostrados), periodicidade e fatores interferentes nas amostragens dos gases e o estudos microbiológicos na vinhaça.

4.1.1 Armazenamento e transporte de vinhaça

Dentre as usinas avaliadas, as quantidades mínimas e máximas de vinhaça produzida por dia foram de 1.968 e 17.000 m³ dia⁻¹, o que é dependente de fatores como: o tamanho da usina, quantidade de água para embebição da cana para extração do caldo e da quantidade de cana destinada a produção de etanol (Tabela 3).

A temperatura da vinhaça determinada após o processo de separação por destilação (temperatura inicial) variou entre 65 e 96° C, sendo que na maioria das usinas apresentaram temperaturas acima de 80° C. Sendo que, aproximadamente 80% das usinas reutilizam a energia calorífica presente na vinhaça no interior da indústria e chamam este processo de resfriamento. Dentre as formas de reutilização da energia 36% destina-se ao processo de tratamento e aquecimento do mosto (caldo), 18% na destilaria, 18% no trocador de calor, 9% para a fabricação de açúcar, 9% no processo de fermentação e 9% no processo de embebição.

A quantidade média de vinhaça aplicada no campo por fertirrigação é variável, apresentando valores de 30 até 400 m³ ha⁻¹ ano⁻¹, sendo que a maioria das usinas aplicam anualmente mais 100 m³ ha⁻¹.

Tabela 3 – Produção de vinhaça, temperaturas inicial e após resfriamento e quantidade de vinhaça utilizada na fertirrigação das áreas cultivadas com cana-de-açúcar

Unidades Produtoras	Produção de vinhaça m³ d⁻¹	Temp. Inicial °C	Temp. Resfriamento °C	Fertirrigação m³ ha⁻¹ ano⁻¹
1	8.450	95	45	300
2	10.800	95	40	30-40
3	3.636	70	45	**
4	17.000	95	45	345
5	16.500	95	45	400
6	8.000	70	..	150
7	1.968	90	43	65
8	2.800	70	45	150
9	3.774	65	45	112
10	10.800	96	52	120-300
11	6.000	80	..	108
12	3.600	85	65	100-150
13	6.000	80	40	180
14	3.640	68	47	150
15	6.480	80	45	**
16	3.854	95	45	120

Considerando os diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça, a maioria das usinas (81 %) indicaram que utilizam sistemas de tanques e tubulações fechadas, enquanto que o restante (19 %) utiliza sistemas baseados em canais com e sem revestimento. Concomitantemente a estes principais sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça, 50% das usinas indicaram que utilizam também caminhões tanques para transportar a vinhaça para locais mais afastados da indústria, entretanto este método é pouco representativo em termos de quantidade.

Com relação ao sistema de tanques, todas as usinas possuem pelos menos três tanques de armazenamento e transporte de vinhaça, mas apenas os tanques principais são utilizados durante toda a safra. As dimensões dos tanques primários variam bastante de usina para usina e mesmo dentro da mesma usina, a capacidade mínima observada foi de 1000 m³ enquanto que a máxima foi de 5000 m³. Os tanques secundários são utilizados de acordo com a frente de aplicação da vinhaça e/ou como segurança em caso de transbordamento dos tanques principais.

Quanto ao revestimento, 90% das usinas responderam que os tanques são revestidos por geomembrana (polietileno de alta densidade – PEAD) e 10% apresentam tanques sem revestimentos, as quais são secundários e utilizados conforme descrito acima.

Mesmo com a Normativa da Cetesb P.4231 (CETESB, 2006) proibindo o transporte de vinhaça em canais não revestidos, em todas as usinas que utilizam os sistemas de canais foi verificado a presença de canais sem revestimento. A extensão, assim como as dimensões dos canais variaram entre as usinas. A menor extensão para canais não revestidos foi de 2,5 km enquanto que a maior foi de 100 km. Para os canais revestidos a menor extensão foi de 1,6 km e a maior extensão foi de 46 km. Em média os canais apresentaram 1,5 m de largura por 1 m de profundidade. Assim como os tanques, 90% das usinas que apresentam canais revestidos utilizam geomembrana, enquanto 10% utilizam concreto como revestimento. Todas as usinas com sistemas de canais utilizam bombeamento e gravidade para o transporte da vinhaça ao longos dos canais.

Outro fator importante a destacar nos sistemas de armazenamento e transporte, é a quantidade de sedimento presente no fundo dos tanques e canais transportadores. O questionário aplicado indicou que 69% das usinas realizam limpeza dos canais e/ou tanques anualmente, enquanto que 25% realizam limpeza a cada dois anos e apenas 6% duas vezes ao ano (Figura 8).

Figura 8 – Periodicidade da limpeza dos diferentes sistemas de transporte

4.1.2 Manejo e aplicação

A caracterização físico-química da vinhaça é um parâmetro importante que demonstra as condições em que o resíduo se encontra para ser aplicado no canavial em fertirrigação. As variáveis comumente analisadas são: pH, C total, DBO, DQO, sólidos totais e os macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S). De acordo com a Normativa da Cetesb P.4.231 (CETESB, 2006) essa

caracterização química deve ser realizada semanalmente, sobretudo no que se refere aos teores de K para ajustar as doses de ferirrigação no campo.

Entretanto, os resultados deste estudo indicaram que 31% das usinas realizam essa análise mensalmente, 30% semanalmente, e 6% realizam uma caracterização por safra e 25% não especificam a periodicidade (Figura 9).

Figura 9 – Periodicidade das análises físico-químicas da vinhaça

Quando questionadas se existe pré-tratamento realizado anterior a fertirrigação, apenas 6% das unidades responderam que realizam concentração da vinhaça. Neste sistema a água retirada da vinhaça é reutilizada nos processos industriais e a vinhaça concentrada é aplicada no solo com auxílios de caminhões tanque. Nenhuma das unidades avaliadas realizam a biodigestão da vinhaça para cogeração de energia.

Dentre os métodos de aplicação de vinhaça no solo, verificou-se que todas as unidades avaliadas utilizam a aspersão, e 19% também utilizam caminhões tanques com sistema de dispersão acoplado a parte traseira para aplicação direta da vinhaça.

4.2 Estudo 2: Emissões de CH₄ provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte

4.2.1 Caracterização físico-química da vinhaça

A caracterização química da vinhaça foi realizada ao longo dos anos safra de 2012 e 2013 para os diferentes sistemas de armazenamento e transporte. Devido à grande quantidade de dados, os resultados foram agrupados em início, meio e final de safra, a fim de verificar as mudanças sazonais, bem como as correlações com as emissões de CH₄. Os resultados da caracterização química da vinhaça proveniente dos sistemas de armazenamento e transporte pelos canais e tanques estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

De modo geral observou-se redução da temperatura ao longo dos canais condutores de vinhaça. A vinhaça chega ao início do canal revestido com temperaturas médias entre 51 a 63° C e ao final da parte revestida com valores variando de 33 a 41° C (Tabela 4). Já ao longo da parte sem revestimento do canal a temperatura da vinhaça não apresenta um padrão de variação, pois neste sistema a temperatura é altamente influenciada pela temperatura do ar atmosférico. Durante todo o período de avaliação, as temperaturas na parte sem revestimento variaram de 20 a 35° C.

Os valores de potencial de óxido-redução (Eh) exibiram uma tendência bastante clara de redução ao longo dos canais condutores, evidenciando o aumento das condições de anaerobiose. Com exceção de P3 que apresentou valor médio de -2,5 mV no meio de safra, os valores foram positivos para os três primeiros pontos de amostragem situados no canal revestido para safra de 2012. De P4 até P8 foi observado redução nos valores, indicando ocorrência de metanogênese, uma vez que a literatura indica que a metanogênese ótima ocorre a partir de -200 Milivolt.

Já para a safra 2013 os valores de Eh decresceram nos pontos revestidos e tanto no meio quanto final de safra todos os pontos apresentaram valores negativos. Valores mais negativos foram observados no final da safra de 2013 para ambos os sistemas baseado em canais. Ao comparar os dois anos safra, foi possível verificar que de maneira geral 2013 apresentou valores mais negativos. O declínio dos valores positivos para negativos indica ausência de oxigênio e conseqüentemente, mudança das condições oxidantes, antes favoráveis

aos microrganismos aeróbios, para condições redutoras, agora favoráveis aos microrganismos anaeróbios.

Os valores de pH da vinhaça ao longo dos canais condutores exibiram algumas variações significativas. Com exceção de alguns valores no início e final de safra de 2012, valores ácidos variando de 4,0 a 6,0 são predominantes. Os valores mais altos de pH foram observados na parte não revestida do canal. No final da safra de 2012 o pH variou de 6,4 a 9,1, o que provavelmente está associado a algum tratamento alcalino realizado na indústria. Nos demais períodos avaliados a vinhaça chega ao canal condutor com pH ácido variando de 4,2 a 5,2. Para a safra 2013 foi verificado maior homogeneidade nos valores de pH ao longo dos pontos amostrais, sendo que, a vinhaça chegava ao início do canal (P1) condutor com pH variando de 4,4 a 5,1 e no ponto final de amostragem (P8) os valores verificados foram entre 4,5 e 6,6 (Tabela 4).

Com exceção das avaliações realizadas do final da safra de 2013, observou-se redução significativa nos conteúdos de C total ao longo do canal condutor de vinhaça, evidenciando perdas gasosas neste trajeto para os dois anos safra. Os maiores conteúdos de C total na vinhaça foram observados no meio de safra. Já para o N total o mesmo comportamento não foi observado. Da mesma forma que para os valores de C total, os valores de DBO e DQO foram maiores na safra de 2012 e apresentaram variação acentuada entre os anos safra. Os valores de DBO e DQO foram crescentes ao longo do ano safra, demonstrando maiores conteúdos no final de cada safra avaliada.

Tabela 4 – Caracterização físico-química da vinhaça presente nos sistemas de armazenamento e transporte por canais revestidos (P1, P2, P3 e P4) e não revestidos (P5, P6, P7 e P8) safras 2012 e 2013

Atributos ¹	Safra	Época	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Temperatura (° C)	2012	Início	58	53	44	33	20	20	21	21
		Meio	55	51	45	41	29	31	33	35
		Final	51	51	44	37	23	23	23	23
	2013	Início	55	53	45	36	23	32	33	34
		Meio	63	58	50	37	24	29	30	33
		Final	56	53	45	36	24	27	28	29
Eh (mV)	2012	Início	63	41	24	-60	-65	-137	-134	-122
		Meio	64	44	-2,5	-94	-116	-171	-134	-183
		Final	62	22	26	-83	-120	-141	-142	-156
	2013	Início	56	30	15	-64	-25	-137	-138	-125
		Meio	-14	-45	-56	-109	-215	-279	-275	-260
		Final	-97	-106	-143	-209	-298	-305	-283	-256
pH	2012	Início	4,2	5,5	4,9	6,3	4,2	7,6	6,1	7,4
		Meio	5,2	5,1	5,1	5,5	4,3	4,3	4,3	4,4
		Final	6,4	6,6	6,5	8,4	9,0	9,4	9,4	9,1
	2013	Início	5,1	5,1	5,2	5,4	5,2	5,9	5,9	6,6
		Meio	4,4	4,4	4,2	4,2	4,4	4,4	4,5	4,5
		Final	4,3	4,3	4,3	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5
CT (g L⁻¹)	2012	Início	10,82	9,68	9,31	8,93	8,15	7,10	7,57	7,05
		Meio	20,08	19,19	18,40	17,41	15,50	15,08	15,04	14,12
		Final	14,77	14,71	12,80	14,03	9,13	8,18	8,75	8,31
	2013	Início	8,08	8,31	8,68	7,77	8,79	7,18	7,30	7,30
		Meio	11,30	14,23	12,29	10,86	7,06	7,09	8,02	6,87
		Final	6,17	5,88	7,54	7,60	8,23	7,79	7,83	10,25
NT (g L⁻¹)	2012	Início	0,55	0,45	0,45	0,41	0,51	0,31	0,41	0,28
		Meio	0,25	0,27	0,25	0,22	0,20	0,18	0,18	0,16
		Final	0,19	0,24	0,24	0,22	0,16	0,16	0,19	0,17
	2013	Início	0,26	0,26	0,28	0,25	0,27	0,24	0,21	0,21
		Meio	0,35	0,41	0,37	0,33	0,26	0,26	0,31	0,29
		Final	0,16	0,17	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,27
DBO (g L⁻¹)	2012	Início	18,72	18,57	18,33	18,01	18,01	17,46	17,93	17,39
		Meio	19,50	19,25	19,03	19,02	18,12	18,07	18,04	17,93
		Final	22,47	25,03	27,18	22,27	28,18	20,39	21,80	22,37
	2013	Início	10,92	11,25	11,72	10,52	11,94	10,14	10,37	10,40
		Meio	7,43	7,04	7,75	7,82	8,03	7,97	8,00	8,13
		Final	20,12	19,40	20,77	20,82	21,00	20,91	21,00	21,11
DQO (g L⁻¹)	2012	Início	29,37	29,19	29,08	29,00	28,88	28,15	28,42	28,13
		Meio	37,65	37,47	37,23	37,22	37,18	37,09	38,89	38,62
		Final	39,60	39,92	38,12	38,14	38,18	37,98	37,97	37,80
	2013	Início	19,32	19,52	19,95	19,22	20,12	18,71	18,93	18,87
		Meio	21,84	21,66	22,04	22,12	22,12	21,33	21,40	22,42
		Final	33,13	33,00	33,14	33,28	33,50	33,44	33,20	33,77

¹ Eh = condutividade elétrica; CT = carbono total; NT = nitrogênio total; DBO = demanda bioquímica de oxigênio; DQO = demanda química de oxigênio.

Similar ao observado no sistema de canais, a temperatura da vinhaça foi menor nos tanques 2 e 3 em comparação ao tanque 1 (Tabela 5). Entretanto, esta variação de temperatura foi menos acentuada quando comparada ao sistema de canais.

Os três tanques apresentaram valores negativos de Eh no final da safra de 2012 e também em toda safra de 2013. Os valores de Eh também reduziram significativamente aumentando as condições de anaerobiose.

Os valores de pH da vinhaça não exibiram variações significativas entre os tanques ou época de amostragem e variaram de 4,2 a 4,9 neste sistema armazenamento e transporte

Tendências de redução dos conteúdos de C total na sequência dos tanques foram observadas, enquanto que os conteúdos N total não variaram muito. Corroborando com os conteúdos de C total, foram observados maiores valores de DBO e DQO no meio da safra 2013.

Tabela 5 – Caracterização físico-química da vinhaça presente nos sistemas de armazenamento e transporte por tanques (T1, T2 e T3) nas safras 2012 e 2013

Atributos¹	Safra	Época	T1	T2	T3
Temperatura (° C)	2012	Final	47	32	37
		Início	40	33	32
	2013	Meio	43	41	40
		Final	41	40	34
Eh (mV)	2012	Final	-64	-106	-119
		Início	-52	-156	-204
	2013	Meio	-64	-106	-119
		Final	-43	-125	-130
pH	2012	Final	4,9	4,4	4,2
		Início	4,6	4,5	4,4
	2013	Meio	4,4	4,4	4,4
		Final	4,6	4,3	4,3
CT (g L ⁻¹)	2012	Final	11,17	9,87	9,63
		Início	12,30	8,58	9,03
	2013	Meio	14,75	12,88	14,58
		Final	12,95	10,03	9,82
NT (g L ⁻¹)	2012	Final	0,27	0,30	0,33
		Início	0,47	0,32	0,30
	2013	Meio	0,56	0,49	0,55
		Final	0,39	0,32	0,33
DBO (g L ⁻¹)	2012	Final	20,47	19,50	19,37
		Início	8,82	7,30	7,60
	2013	Meio	24,79	23,57	24,54
		Final	18,28	17,11	16,94
DQO (g L ⁻¹)	2012	Final	39,65	38,12	38,01
		Início	25,22	23,12	23,41
	2013	Meio	50,24	49,78	50,00
		Final	45,98	45,61	45,32

¹ Eh = condutividade elétrica; CT = carbono total; NT = nitrogênio total; DBO = demanda bioquímica de oxigênio; DQO = demanda química de oxigênio.

4.2.2 Fluxos de CH₄ provenientes da vinhaça nos sistemas de armazenamento e transporte

A Figura 10 mostra a variação das emissões de CH₄ durante o período avaliado proveniente do sistema de transporte de vinhaça baseado em canais.

Para o ano safra de 2012 os fluxos variaram de 1 a 23; 2 a 17; 11 a 152 e 1 a 353 mg CH₄ m⁻² h⁻¹, respectivamente para os pontos P1, P2, P3 e P4, localizados na parte revestida do canal. Já na parte sem revestimento, observaram-se emissões variando de 48 a 1288; 217 a 1505; 184 a 1768; 348 a 1005 mg CH₄ m⁻² h⁻¹, respectivamente para P5, P6, P7 e P8.

No ano safra de 2013 verificou-se que as emissões de CH₄ variaram de 1 a 5; 5 a 166; 8 a 70 e 79 a 176 mg m⁻² h⁻¹, respectivamente para P1, P2, P3 e P4, enquanto que na parte não revestida observou-se emissões de CH₄ muito superiores, variando de 51 a 560; 214 a 1339; 280 a 1258 e 299 a 995 mg m⁻² h⁻¹, respectivamente em P5, P6, P7 e P8.

Com exceção do pico de emissão observado em julho de 2013 para P2 (166 mg CH₄ m⁻² h⁻¹) e das emissões na ordem de grandeza de 115; 152 e 117 mg CH₄ m⁻² h⁻¹ ocorridas em julho, agosto e setembro de 2012 para P3, as emissões dos três primeiros pontos de amostragem, situados no canal revestido foram muito baixas e inversamente proporcionais às altas temperaturas. A partir de P4 as emissões de CH₄ foram maiores e crescentes até P7, decaindo novamente em P8. Com exceção de P5, foi observado aumento da emissão de CH₄ em até cinco vezes nos pontos não revestidos em relação aos revestidos. De maneira geral as emissões de CH₄ foram maiores na safra de 2012 e somente P6 manteve a mesma média de emissões nos dois anos.

Figura 10 – Fluxos de CH₄ provenientes da vinhaça presente nos sistemas de distribuição por canais. Os valores representam média de três repetições $\pm$ desvio padrão. 1, 2, 3 e 4 representam os pontos de amostragem inseridos no canal revestido; 5, 6, 7 e 8 representam os pontos de amostragem inseridos no canal não revestido

As emissões de CH₄ no sistema de transporte por tanques e tubulações variaram de 0,4 a 19; 4 a 352 e 0,5 a 9 mg m⁻² h⁻¹ respectivamente para T1, T2 e T3 para o final da safra de 2012, e de 0,9 a 36; 0,4 a 47 e 0,1 a 10 mg m⁻² h⁻¹ respectivamente, para T1, T2 e T3 durante a safra de 2013 (Figura 11).

Vale ressaltar, que a safra de 2012 foi monitorada somente de outubro à dezembro e todos os valores apresentados se referem ao final da safra. Em diferente magnitude, os fluxos de CH₄ provenientes da vinhaça no sistema de armazenamento e transporte por tanques também apresentou a mesma tendência dos canais, valores maiores no ano safra 2012 quando comparado ao ano safra de 2013. Durante o final da safra de 2012 os fluxos de CH₄ provenientes de T2 foram 15 vezes maiores que os demais tanques. Os três tanques apresentaram emissão semelhante no início da safra de 2013, já do meio para o final da safra, T2 apresentou emissão três vezes maior que os demais tanques.

Figura 11 – Fluxos de CH₄ provenientes da vinhaça presente nos sistemas de distribuição por tanques. Os valores representam média de três repetições $\pm$ desvio padrão

4.2.3 Correlação entre as variáveis físico-químicas da vinhaça e os fluxos de CH₄ nos anos safra 2012 e 2013.

A análise de correlação entre variáveis indicou os principais atributos físico-químicos da vinhaça que influenciaram os fluxos de CH₄ ao longo das safras 2012 e 2013. No sistema de canais foram observadas algumas correlações significativas (Tabela 6), enquanto que no sistema de tanques correlações significativas não foram obtidas (dados não mostrados).

Foram observadas correlações significativas e inversas entre os fluxos de CH₄ e valores de Eh e temperatura da vinhaça nos dois anos safra avaliados. Observou-se também uma baixa correlação inversa, porém significativa, entre os fluxos de CH₄ e os conteúdos de N

total na vinhaça. Na safra 2013, foram observadas alta correlações diretas dos valores de DBO e DQO com os fluxos de CH₄ nos pontos P6, P7 e P8.

Tabela 6 – Coeficientes de correlação (Pearson) entre os fluxos de CH₄ e os atributos físico-químicos da vinhaça para os respectivos pontos de coleta no sistema de transporte de vinhaça baseado em canais nas safras de 2012 e 2013.

Pontos de coleta	Eh	Temperatura	pH	C	N	DBO	DQO
<i>Safra de 2012</i>							
P1	-0,34	0,18	0,20	-0,23	-0,49	0,47	0,30
P2	0,21	0,26	-0,35	0,33	-0,19	0,05	0,47
P3	-0,37	0,02	-0,46	0,44	-0,14	-0,59	0,25
P4	-0,44	0,26	-0,06	0,40	-0,24	-0,11	0,39
P5	-0,14	-0,31	-0,35	0,38	0,07	0,30	0,14
P6	-0,31	0,21	0,13	0,25	-0,55	0,47	0,17
P7	-0,14	-0,90*	0,07	0,30	-0,78**	0,25	0,87
P8	-0,12	-0,05	0,18	0,34	-0,54	-0,13	-0,34
Todos pontos	-0,64**	-0,61**	-0,15	0,15	-0,34**	-0,24	0,11
<i>Safra de 2013</i>							
P1	-0,84	0,31	-0,73	0,16	-0,05	0,30	0,62
P2	0,43	-0,26	-0,18	-0,17	-0,16	0,93	0,99**
P3	-0,89*	-0,83*	-0,75	0,08	0,01	0,70	0,91
P4	-0,85*	-0,53	-0,73	0,07	0,11	0,52	0,77
P5	-0,26	-0,97**	0,65	0,22	-0,50	0,52	0,19
P6	-0,58	0,25	0,29	0,35	0,30	0,99**	0,91*
P7	-0,67	-0,52	-0,03	0,16	0,09	0,97*	0,99**
P8	0,21	0,01	-0,03	0,22	-0,67	0,90*	0,99**
Todos pontos	-0,67**	-0,60**	0,22	-0,21	-0,27**	0,28	0,25
2012 e 2013	-0,62**	-0,60**	0,16	-0,13	-0,32**	0,04	0,14

* e ** indicam correlação ao nível de significância de 5% e 1%

4.2.4 Fluxos acumulados de CH₄ nos anos safras 2012 e 2013

Os fluxos acumulados de CH₄ resultantes do armazenamento e transporte de vinhaça por canais no ano safra de 2012 exibiram diferenças significativas entre os pontos avaliados ($p < 0,05$) (Figura 12a).

Na safra de 2012 os pontos revestidos foram divididos em dois grupos, o primeiro, composto por P1 e P2, apresentaram emissão anual acumulada de ordem de 0,5 Mg CH₄, enquanto que P3 e P4 emissão acumulada de 6,0 Mg CH₄. A emissão acumulada de CH₄ dos

pontos não revestidos foram de 11,8; 21,6; 27,3 e 18,5 Mg, respectivamente para P5, P6, P7 e P8.

Na safra de 2013 os três primeiros pontos amostrados no canal revestido não apresentaram diferenças significativas entre si. Já P4 apresentou emissões da mesma magnitude de P5, primeiro ponto alocado no canal não revestido. Os demais pontos não revestidos (P6, P7 e P8) exibiram emissões significativamente superiores. Em 2013, as emissões acumuladas anuais de CH₄ foram 0,2; 2,4; 2,9; 9,2; 6,6; 21,2; 18,9 e 16,8 Mg CH₄, respectivamente em P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8 (Figura 12b). Diferente do ano safra de 2012 onde foi verificada maior emissão em P7, verificou-se maiores valores de emissão em P6 para 2013. Com exceção de P6 e P8, verificou-se diferença significativa em todos os pontos ao comparar a emissão entre os diferentes anos safra.

Figura 12 – Fluxos acumulados de CH₄ provenientes da vinhaça presente no sistema de distribuição por canais para os anos safra de 2012 (a) e 2013 (b). Os valores representam a média (n=5) $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *representa os pontos que não diferem estatisticamente entre os anos safra. P1, P2, P3 e P4 representam os pontos de amostragem no canal revestido; P5, P6, P7 e P8 representam os pontos de amostragem no canal não revestido

As emissões acumuladas para o sistema de transporte de vinhaça por tanques foram calculadas somente para o ano safra de 2013, uma vez que para o ano safra de 2012 as amostragens foram realizadas somente no final da safra. As emissões acumuladas foram de 150, 350 e 167 kg CH₄ e somente T2 diferiu significativamente dos demais (Figura 13).

Figura 13 – Fluxos acumulados de CH₄ provenientes da vinhaça presente no sistema de distribuição por tanques para o ano safra de 2013. Os valores representam a média (n=5) ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. T1, T2 e T3 representam os pontos de amostragens nos tanques

4.2.5 Conversão dos fluxos de CH₄ em CO₂eq e extrapolação das emissões para o ano safra

Ao considerar a área útil de cada sistema de armazenamento e transporte da vinhaça, a duração da safra e a produção diária de vinhaça, foi realizada a extrapolação das emissões de CH₄, bem como sua conversão em CO₂eq para os anos safra de 2012 e 2013 (Tabela 6).

Na parte revestida do canal as emissões de CH₄ foram semelhantes nos dois anos safra, apresentando valores de 131,0 e 146,4 Mg CH₄ safra⁻¹, respectivamente para 2012 e 2013. Ao converter estes valores, obteve-se emissões de 327,55 e 365,9 Mg CO₂ eq safra⁻¹. Entretanto, a parte revestida do canal representou apenas 14 e 19 % das emissões totais de CH₄ nos anos safras 2012 e 2013, respectivamente.

As emissões totais de CH₄ na parte não revestida dos canais resultaram em valores em torno de 6 e 4 vezes maiores que a parte revestida nos anos safra 2012 e 2013. A intensidade de emissão de CH₄ foi de 1,0 e 0,8 kg CO₂ eq m⁻³ de vinhaça transportada no sistema de

canais, nas safras 2012 e 2013. Após analisar a média dos dois anos safra, obteve-se uma intensidade de emissão de $0,9 \text{ kg CO}_2 \text{ eq m}^{-3}$ de vinhaça, sendo que 83,3% destas emissões foram provenientes da parte não revestida do canal.

O sistema de armazenamento e transporte baseado em tanques foi o que menos contribuiu em termos de CH_4 e $\text{CO}_2 \text{ eq}$. A extrapolação foi realizada somente para o ano de 2013, uma vez que a amostragem de CH_4 no ano de 2012 foi realizada somente no final da safra, o que poderia super ou subestimar as extrapolações. A emissão observada neste sistema foi de $0,7 \text{ Mg CH}_4 \text{ safra}^{-1}$ equivalente a $16,7 \text{ Mg CO}_2 \text{ eq safra}^{-1}$.

Tabela 6 – Emissões totais de CH_4 convertidas em CO_2 equivalente e as intensidades de emissão de CH_4 por m^3 de vinhaça nos dois sistemas de armazenamento e transporte avaliados durante as safras 2012 e 2013

Fontes de emissão	Unidade	Canais			Tanques
		Revestido	Não revestido	Total	
Safra de 2012					
Emissão total	Mg CH ₄	13,1	79,2	92,3	..
	Mg CO ₂ eq	327,5	1980,6	2308,2	..
Intensidade de emissão	kg CH ₄ m ⁻³	0,01	0,03	0,04	..
	kg CO ₂ eq m ⁻³	0,14	0,87	1,0	..
Safra de 2013					
Emissão total	Mg CH ₄	14,6	63,5	78,2	0,7
	Mg CO ₂ eq	365,9	1587,9	1953,9	16,7
Intensidade de emissão	kg CH ₄ m ⁻³	0,01	0,03	0,04	0,0005
	kg CO ₂ eq m ⁻³	0,15	0,63	0,78	0,0122
Média das safras 2012/2013					
Emissão total	Mg CH ₄	13,8	71,3	85,2	0,7
	Mg CO ₂ eq	346,7	1784,2	2131,0	16,7
Intensidade de emissão	kg CH ₄ m ⁻³	0,01	0,03	0,04	0,0005
	kg CO ₂ eq m ⁻³	0,14	0,75	0,9	0,0122

4.2.6 Fluxos de CH_4 resultantes do experimento de incubação de laboratório

Os fluxos de CH_4 provenientes do experimento de incubação estão apresentados na Figura 14. Considerando o período de avaliação de 16 dias, verificou-se variação nos fluxos de 0,2 a 0,4; 1,8 a 40,1 e 9,6 a 64,8 $\text{mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente nos tratamentos vinhaça (V), sedimento (S) e sedimento com vinhaça (S+V).

Nos tratamentos S e S+V observou-se picos de emissões nos primeiros dias de avaliação. De modo geral, o tratamento S+V apresentou maiores emissões de CH₄ ao longo período de avaliação. O tratamento V apresentou emissões próximas de zero durante o período avaliado, o que indica que apesar da vinhaça apresentar carga orgânica alta em condições de anaerobiose, a vinhaça por si só não fornece condições ideais para metanogênese e formação de CH₄.

Figura 14 – Fluxos de CH₄ provenientes da vinhaça e sedimento em incubação de laboratório. Valores representam a média (n=5) ± desvio padrão. S+V: sedimento + Vinhaça. S: sedimento. V: vinhaça

Ao considerar os fluxos acumulados de CH₄ ao longo do período de incubação, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento V em relação aos demais. Os tratamentos S e S+V não diferiram e apresentaram maiores emissões ao longo do período experimental (Figura 15).

Figura 15 – Fluxos acumulados de CH₄ provenientes da vinhaça e sedimento em incubação de laboratório. Os valores representam a média (n=5) $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. S+V: sedimento + Vinhaça. S: sedimento. V: vinhaça

4.3 Estudo 3: Microbiota associada

4.3.1 Quantificação dos grupos microbianos resultantes do campo

A quantificação dos genes ribossomais 16S para Procarioto, Bactéria e Arquéia, bem como dos genes funcionais *mba* e *mcrA* foi realizada a partir de amostras coletadas ao longo da safra de 2012 através da técnica de qPCR. Todos os pontos avaliados ao longo do canal transportador apresentaram menor abundância do gene 16S rRNA para Procarioto no início da safra em relação às demais épocas (Figura 16a).

Os valores variaram de $3,2 \times 10^8$ (cópias do gene g de sedimento⁻¹), encontrado no início de safra para P5, a $1,3 \times 10^{13}$, encontrado no final de safra para P3. Considerando o período de amostragem, verificou-se no início da safra maior abundância em P3, no meio da safra maiores abundâncias em P3, P5 e P7, e no final de safra não foi verificada diferença significativa entre os pontos, com valores médios de abundância de $1,2 \times 10^{13}$, $6,4 \times 10^{12}$, $6,76 \times 10^{12}$ e $1,3 \times 10^{13}$, respectivamente para P3, P5, P6 e P7.

A abundância do gene 16S rRNA para Bactéria foi a maior observada quando comparada com os demais genes quantificados (Figura 16b). Similar ao observado para Procarioto, P3, P6 e P7 apresentaram menor abundância no início da safra. Em P6 não

observou-se diferença significativa entre início e meio de safra, demonstrando menor abundância nestes dois períodos. Os valores variaram de $4,9 \times 10^{11}$ em P7 no início de safra, a $1,0 \times 10^{15}$ em P3 no final de safra. Considerando o início da safra, maiores valores foram encontrados em P5, seguidos de P3, P6 e P7, respectivamente. No meio da safra somente P6 apresentou diferença significativa com menor abundância ($4,6 \times 10^{12}$) e no final da safra a abundância foi decrescente, respectivamente para P3, P5, P6 e P7.

Em referência ao número de cópias do gene 16S rRNA, especificamente para Arquéia, P3 apresentou valores decrescentes ao longo da safra, P5 não apresentou diferença significativa entre início e meio de safra e maior abundância no final da safra ($3,2 \times 10^9$). Os pontos P6 e P7 apresentaram o mesmo perfil, menor abundância no início, com valores de $1,5 \times 10^7$ e $1,8 \times 10^7$, respectivamente, e ausência de diferença significativa entre meio e final de safra (Figura 16c).

Os tanques 1 e 2 não diferiram significativamente entre si para nenhum gene quantificado ($p < 0,05$). Assim como verificado no sistema baseado em canais, a maior abundância ocorreu para o domínio Bactéria, seguida por Procariotos e Arquéias. Considerados sistemas diferentes, não pode-se comparar canais *versus* tanques, porém ao levantar a magnitude da presente análise, o número de cópias do gene 16S rRNA para Arquéia, apresentou ordem de grandeza até nove vezes menor que número de cópias provenientes dos canais não revestidos e três vezes do ponto situado no canal revestido.

Figura 16 – Número de cópias dos genes 16S rRNA para Procarioto (a), Bactéria (b) e Arquéia (c). Os valores representam a média ($n=5$) $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada ponto de amostragem e letras maiúsculas dentro de cada período da safra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P3, P5, P6 e P7 representam os pontos de amostragem nos canais e T1 e T2 representam os pontos de amostragem nos tanques. EH: início de safra, MH: meio de safra e LH: final de safra

Estimativa da abundância dos genes funcionais envolvidos na metanogênese detectados a partir das amostras de sedimento presente nos diferentes sistemas de

armazenamento e transporte de vinhaça estão apresentadas na Figura 17. De maneira geral o número de cópias do gene *mba* foi maior que *mcrA*. Para quantificação do gene *mcrA* cada ponto avaliado apresentou perfil característico. P3 apresentou maior abundância no início da safra ($2,1 \times 10^6$), quando comparado com meio e final de safra. P5 apresentou abundâncias similares no início e final de safra. P6 apresentou maior abundância no final da safra e valores similares no início e meio de safra, enquanto que P7 apresentou maiores abundâncias no meio e final de safra, com valores de $2,3 \times 10^7$ e $8,0 \times 10^6$, respectivamente.

Considerando as diferentes épocas da safra, não foi verificada diferença entre os pontos no início de safra. Já no meio de safra a abundância foi igual em P3 e P5 e maior em P6 e P7. No final de safra o único ponto amostrado com diferença significativa foi P3, apresentando valores inferiores de abundância (Figura 17b).

A grande abundância do gene *mba* presente nas amostras de sedimento demonstrou alta especificidade do *primer* utilizado para detecção e quantificação de microrganismos metanogênicos (Figura 17b). P3 apresentou maior abundância no início da safra ($1,7 \times 10^9$) a qual sofreu decréscimo significativo nas demais épocas. A abundância obtida por P5 foi igual nos três períodos de amostragem, enquanto que em P6 e P7 apresentaram o mesmo perfil, com menor número de cópias no início e abundância semelhante para o meio e final da safra. Da mesma forma que para quantificação do 16S de Arquéia, a abundância de ambos os genes funcionais no sistema de transporte de vinhaça baseado em tanques foi baixa e não apresentou diferenças significativas.

Figura 17 – Número de cópias dos genes funcionais *mcrA* (a) e *mba* (b). Os valores representam a média ($n=5$) $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada ponto de amostragem e letras maiúsculas dentro de cada período da safra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P3, P5, P6 e P7 representam os pontos de amostragem nos canais e T1 e T2 representam os pontos de amostragem nos tanques. EH: início de safra, MH: meio de safra e LH: final de safra

Foram observadas correlações significativas entre o número de cópias dos genes funcionais e as emissões de CH₄ para o sistema de armazenamento e distribuição baseado em canais (Tabela 7). P3 apresentou correlação significativa e inversa para *mcrA* no meio e final da safra, o que significa que os fluxos de CH₄ aumentaram apesar do decréscimo na abundância de genes ao longo da safra. P5 e P6 apresentaram correlação positiva significativa na maioria das avaliações. Apesar de P7 apresentar maiores valores de emissão de CH₄ no período intermediário da safra, a correlação positiva ocorreu somente no início e final de safra. T1 e T2 não apresentaram correlação com o número de cópias de *mcrA*.

Quanto às correlações para *mba*, P3 apresentou correlação significativa e inversa no início da safra, o que faz sentido, pois neste período foi onde verificou-se maior abundância de *mba* e menor emissão de CH₄, ou seja, por algum fator limitante, neste ponto a comunidade metanogênica, apesar de abundante, não estava com atividade elevada. Em P5 a abundância dos genes *mba* exibiu correlações diretas e significativas com as emissões de CH₄ no meio e final de safra. P6 apresentou correlação inversa no meio da safra, enquanto que P7 mostrou correlação direta no final. T1 e T2 não apresentaram correlação com o número de cópias de *mba*.

Tabela 7 – Coeficientes de correlação (Pearson) entre os fluxos de CH₄ e a abundância dos genes *mcrA* e *mba* para os respectivos pontos de coleta no sistema de transporte de vinhaça baseado em canais e tanque ao longo da safra de 2012

Período	Pontos de amostragem					
	P3	P5	P6	P7	T1	T2
<i>mcrA</i>						
Início	-0,06	-0,06	0,97**	0,99**	..	..
Meio	-0,97*	0,99**	0,89*	-0,54	..	..
Final	-0,95*	0,82*	0,99**	0,99**	-0,01	0,52
<i>mba</i>						
Início	-0,86*	0,55	-0,32	-0,00	..	..
Meio	0,51	0,90*	-0,87*	0,41	..	..
Final	0,42	0,99**	-0,46	0,86*	-0,00	-0,52

* e ** indicam correlação ao nível de significância de 5% e 1%

4.3.2 Quantificação dos grupos microbianos resultantes do experimento de incubação

A figura 18 mostra a estimativa do número de cópias dos genes 16S rRNA, respectivamente para Procarioto, Bactéria e Arquéia provenientes do experimento de incubação de laboratório.

Tanto a abundância de procariotos (Figura 18a), quanto de bactérias (Figura 18b) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos V+S e V no início do experimento. No final da safra, V apresentou maior abundância quando comparado com V+S para os dois grupos estudados. Os valores médios encontrados para procariotos foram de $3,55 \times 10^{12}$ e $4,23 \times 10^{12}$, respectivamente para V+S e V no início do experimento, e $1,83 \times 10^{12}$ e $1,23 \times 10^{13}$, respectivamente para V+S e V no final do experimento.

Ao comparar o número de cópias dos genes no início e final do experimento de incubação verificou-se diferença significativa somente em V, onde a maior abundância ocorreu no final. Os valores médios para bactéria variaram de $2,45 \times 10^{14}$, para V+S a $9,45 \times 10^{14}$ para V, ambos provenientes do final do experimento.

A abundância de Arquéia demonstrou diferença significativa tanto no início quanto no final do experimento entre os tratamentos e os maiores valores encontrados foram provenientes do tratamento V+S, $5,60 \times 10^8$ e $2,31 \times 10^8$, respectivamente para início e fim de experimento (Figura 18c). O número de cópias do 16S de Arquéia no tratamento V foi pelo menos quatro vezes menor em termos de magnitude quando comparado ao tratamento V+S. Não houve diferença significativa entre início e final de experimento para nenhum tratamento.

Figura 18 – Número de cópias dos genes 16S rRNA para procarioto (a), Bactéria (b) e Arquéia (c). Os valores representam a média ($n=5$) $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e letras maiúsculas dentro de cada período do experimento não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. V+S: compreende o tratamento composto por Vinhaça e sedimento e V compreende o tratamento composto somente por vinhaça

O gene *mba* proveniente do experimento de incubação foi mais abundante que 16S rRNA de Arquéia, demonstrando especificidade na amplificação (Figura 19). Da mesma forma que para arqueia, o tratamento V+S apresentou maior número de cópias, com valores de $4,05 \times 10^{10}$ e $5,10 \times 10^{10}$ tanto no início quanto final do experimento, apresentando diferença significativa com o tratamento V. O tratamento V+S não diferiu entre início e final do experimento enquanto V foi diferente, apresentando maior abundância no início. Os valores de V foram de $6,01 \times 10^5$ e $1,95 \times 10^4$, respectivamente para início e fim de experimento.

Não foi observada correlação entre a emissão de CH₄ e os genes quantificados no experimento de incubação.

Figura 19 – Número de cópias do gene funcional *mba*. Os valores representam a média (n=5) ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e letras maiúsculas dentro de cada período do experimento não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. V+S: compreende o tratamento composto por Vinhaça e sedimento e V compreende o tratamento composto somente por vinhaça

4.3.2 Diversidade de Bactéria e Arquéia por pirosequenciamento

4.3.2.1 Experimento de campo

A técnica de pirosequenciamento foi realizada com o objetivo de acessar à estrutura da comunidade e diversidade microbiana proveniente de amostras de sedimento depositado nos diferentes sistemas de distribuição e transporte de vinhaça. Informações do sequenciamento, diversidade e riqueza estão apresentadas na Tabela 8. O índice de diversidade mostrou que de maneira geral o início da safra foi mais diverso que meio e final de safra e o mesmo ocorreu com a riqueza. Uma vez que o objetivo principal do presente trabalho foi entender a dinâmica da comunidade microbiana metanogênica relacionada à produção de CH₄ serão apresentados resultados tanto do domínio Arquéia quanto de Bactéria. Porém, ênfase maior será dada aos resultados provenientes de Arquéia.

Tabela 8 – Número de sequências, UTOs, diversidade filogenética e riqueza para o gene 16S rRNA provenientes das amostras de sedimento nos diferentes pontos de amostragem

Pontos de amostragem	Sequências	UTOs	Chao1	Distância Filogenética
<i>Início de safra</i>				
P3	13472	480	150	13
P5	14848	1162	198	14
P6	11926	1071	231	15
P7	10597	896	156	13
<i>Meio de safra</i>				
P3	17870	185	15	2
P5	20586	978	111	9
P6	12538	919	131	12
P7	17469	1407	352	16
<i>Final de safra</i>				
P3	13893	87	8	2
P5	14099	709	106	9
P6	12957	766	119	9
P7	11946	877	124	11
T1	16192	177	37	5
T2	14486	147	28	3

Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) do gene 16S rRNA foram classificadas ao nível de 97% de similaridade

Ao considerar os valores médios de início, meio e final de safra para cada ponto de amostragem verificou-se que 1% de todas UTOs pertencem ao domínio Arquéia para P3, 5% para P5, 7% para P6, 10% para P7 e 1% T1 e T2 (Figura 20). Uma vez que a porcentagem de todas as sequências do gene 16S rRNA para Aquéia cobrem em média 2% dos solos, os números encontrados neste trabalho foram muito expressivos.

Figura 20 – Frequência dos domínios Bactéria e Arquéia presentes nas amostras de sedimento provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte. P3, P5, P6 e P7 representam os pontos de amostragem nos canais e T representa o ponto de amostragem no tanque. I: início de safra, M: meio de safra e F: final de safra

A estrutura das comunidades microbianas não diferiram significativamente entre os pontos amostrados em termos de filo para Arquéia. Com exceção de T, que apresentou em torno de 20% de UTOs provenientes do filo *Crenarchaeota*, mais de 99% das arquéias apresentadas ao longo dos pontos foram pertencentes ao filo *Euryarchaeota* (Figura 21a). Os principais e mais abundantes filós detectados no domínio Bactéria foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Figura 21b).

Figura 21 – Filiação taxonômica das sequências do gene 16S rRNA à nível de filo para o domínio Arquêia (a) e para o domínio Bactéria (b). P3, P5, P6 e P7 representam os pontos de amostragem nos canais e T representa o ponto de amostragem no tanque. I: início de safra, M: meio de safra e F: final de safra

A estrutura da comunidade metanogênica analisada a partir das sequências do gene 16S rRNA não foram significativamente diferentes entre os pontos de amostragem. Somente tanque (T) apresentou diferença significativa. Dentro do filo *Euryarchaeota*, a classe mais representativa foi *Methanobacteria* (85 a 98%), seguida de *Methanomicrobia* (2 a 15%).

Verificou-se também que 20% das sequências das amostras do sistema de armazenamento e transporte de vinhaça baseado em tanques foram provenientes de *MCB* não classificados - filo *Crenarchaeota* (Figura 22a).

Methanobrevibacter foi considerado o gênero mais abundante e representativo de microrganismos metanogênicos encontrados no sedimento de vinhaça (50-90 % do total de sequências), seguindo por *Methanosarcinaceae*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium* e *Methanosaeta* (Figura 22c) .

Figura 22 – Filiação taxonômica das sequências do gene 16S rRNA para o domínio Arquéia ao nível de classe (a), família (b) e gênero (c). P3, P5, P6 e P7 representam os pontos de amostragem nos canais e T representa os pontos de amostragem no tanque. I: início de safra, M: meio de safra e F: final de safra

Por meio da análise de PCA foi possível observar o agrupamento dos pontos amostrados de acordo com as sequências analisadas. Verificou-se que o primeiro eixo da análise explica 42 % da variação dos dados, o que estaria relacionado, principalmente à separação das amostras por período da safra (Figura 23).

As sequências do início de safra se agruparam do lado esquerdo do plote e diferiram dos demais períodos. Apesar da maioria das amostras de meio de safra se agruparem do lado esquerdo do plote verificou-se amostras no centro e no lado direito do plote. O mesmo ocorreu com as amostras de final de safra, que se agruparam do meio para o lado direito.

Apenas 27% explica a variação dos dados para o segundo eixo analisado, o que mostra um agrupamento dos pontos amostrados. Verificou-se que para o período intermediário da safra P3 se agrupou ao centro do plote, P5 também se agrupou ao centro do plote, porém apresentou repetições próximas à parte inferior. P6 se agrupou na parte inferior e P7 na parte superior. Para o final da safra a maior parte dos pontos amostrados se agruparam na parte inferior do plote, porém as repetições de P5 e P6 bem como as amostras provenientes do sistema baseados em tanques se agruparam na parte superior.

Figura 23 – Análise de componentes principais baseadas nas sequências do pirosequenciamento do gene 16S rRNA das amostras de sedimento provenientes do campo. P3, P5, P6 e P7 representam os pontos de amostragem nos canais e T1 e T2 representam os pontos de amostragem nos tanques

4.3.2.2 Experimento de Incubação

Os valores de diversidade e riqueza a partir do pirosequenciamento do gene 16S rRNA provenientes das amostras de vinhaça e sedimento incubadas em laboratório estão

apresentados na Tabela 8. Tanto no início quanto no final do experimento o tratamento V+S apresentou maiores índices de riqueza e diversidade, porém a quantidade de sequências foi maior para o tratamento V.

Tabela 8 – Número de sequências, UTOs, diversidade filogenética e riqueza para o gene 16S rRNA provenientes das amostras de sedimento e vinhaça nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Sequências	UTOs	Chao1	Distância Filogenética
<i>Início do experimento</i>				
V+S	26795	260	913	35
V	32416	101	242	12
<i>Final do experimento</i>				
V+S	25423	268	869	37
	28037	88	192	10

Verificou-se que menos de 1% de todas as sequências analisadas são provenientes do domínio Arquêia para V, tanto no início quanto no final do experimento. Para V+S os valores chegam a 4 e 5%, respectivamente, para início e final do experimento (Figure 24). Estes resultados mostram, em pequena escala, a mesma dinâmica encontrada no campo.

Figura 24 – Frequência dos domínios Bactéria e Arquêia presentes nas amostras de sedimento e vinhaça provenientes do experimento de incubação. V+S: compreende o tratamento composto por vinhaça e sedimento e V compreende o tratamento composto somente por vinhaça

Como visto nos resultados do pirosequenciamento das amostras de campo, a estrutura da comunidade microbiana proveniente das amostras de incubação não diferiu em termos de Arquéia (Figura 25a). Em torno de 99,9% das sequências obtidas pertencem ao filo *Euryarchaeota*. Da mesma forma, os filios mais comuns do domínio Bactéria foram os mesmos encontrados nas amostras provenientes do campo.

O tratamento V+S exibiu o mesmo perfil no início e final do experimento, apresentando aproximadamente 80% das sequências pertencentes ao filo *Firmicutes* e um pouco menos de 20% pertencente à *Bacteroidetes*. Em menores proporções foram encontradas sequências pertencentes aos filios *Actinobactéria* e *Proteobactéria* (Figura 25 b). Já o tratamento V apresentou alteração da composição ao longo do experimento, onde no início 78% das sequências foram pertencentes à *Firmicutes* e 12% à *Bacteroidetes* e no final apresentou uma redução na abundância de *Firmicutes* (40%) e aumento nas abundâncias de *Bacteroidetes* (20%) e *Proteobactéria* (40%).

Figura 25 – Filiação taxonômica das sequências do gene 16S rRNA à nível de filo para o domínio Arquéia (a) e para o domínio Bactéria (b) presentes nas amostras de sedimento e vinhaça provenientes do experimento de incubação. V+S: compreende o tratamento composto por vinhaça e sedimento e V compreende o tratamento composto somente por vinhaça

Em termos de Classe (Figura 26a), Família (Figura 26b) e Gênero (Figura 26c) a composição da comunidade metanogênica proveniente das amostras de sedimento e vinhaça incubadas em laboratório não diferiu significativamente. Somente V no final do experimento apresentou diferenças como ausência de UTOs pertencentes à classe *Methanomicrobia* e *Parvarchaea*, encontrada no mesmo tratamento no início do experimento e também em V+S.

Assim como para as amostras de campo, mais de 98% das sequências obtidas pertenceram a um único gênero: *Methanobrevibacter* e pertencente à família *Methanobacteriales*.

Figura 26 – Filiação taxonômica das sequências do gene 16S rRNA à nível de classe (a), família (b) e gênero (c) presentes nas amostras de sedimento e vinhaça provenientes do experimento de incubação. V+S: compreende o tratamento composto por vinhaça e sedimento e V compreende o tratamento composto somente por vinhaça

A PCA realizada para as amostras do experimento de incubação mostrou agrupamentos distintos entre o tratamento V no final do experimento e os demais tratamentos (Figura 27). As repetições de V+S agruparam-se na mesma região tanto no início quanto no final do experimento. Repetições de V no início diferiram significativamente de V no final do experimento e se agruparam próximas às amostras de V+S, no lado esquerdo do plote. Vinhaça no final do experimento (VF) agrupou-se do lado direito do plote, demonstrando perfil diferente quando comparado aos outros tratamentos. Desta forma, 46% da variação da comunidade microbiana pode ser discriminada no eixo horizontal (PC1), enquanto que o eixo vertical explica 23%, separando V+S de V inicial.

Figura 27 – Análise de componentes principais baseadas nas sequências do pirosequenciamento do gene 16S rRNA das amostras de sedimento e vinhaça provenientes do experimento de incubação. V+S: compreende o tratamento composto por vinhaça e sedimento e V compreende o tratamento composto somente por vinhaça. I: início do experimento. F: final do experimento

5 DISCUSSÃO

5.1 Estudo 1: Caracterização dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça

A aplicação do questionário permitiu perceber que o setor sucroenergético vem apresentando progressos no que se refere ao armazenamento e transporte de vinhaça na região centro-sul do Brasil. Segundo a maioria das respostas obtidas, o sistema atualmente mais adotado é baseado em tubulações fechadas e tanques, os quais substituíram os canais abertos, revestidos e não revestidos, que constituem o segundo sistema mais utilizado. No entanto, desde que 62,5 % das usinas que cederam informações pertencem ao mesmo grupo sucroenergético, empenhado em melhorar as condições para armazenamento e transporte de vinhaça, pode ter havido uma inversão dessa classificação. Sabe-se que muitas usinas na região centro-sul ainda utilizam o sistema mais antigo, em que canais revestidos coexistem com canais sem revestimento.

O revestimento de tanques e canais evita o contato da vinhaça com o solo e reduz significativamente os riscos de contaminação do solo, cursos d'água, lençóis freáticos e lixiviação dos conteúdos orgânicos da vinhaça (REZENDE, 1984; LUDOVICE, 1997; SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). A maioria das usinas utilizam PEAD o que pode evitar os impactos que a infiltração da vinhaça causa no solo e também nas águas subterrâneas. Estudos recomendam que seja feito o monitoramento do sistema de revestimento já que as altas temperaturas podem enrijecer e causar rupturas no material (LAVOIE; BUENO; LODI, 2013), causando assim a contaminação de solo e águas subterrâneas.

Um outro ponto importante levantado neste questionário foi o resfriamento da vinhaça anterior ao armazenamento e transporte. Partindo do pressuposto que o tratamento do caldo se destaca pelo elevado consumo de energia (FUESS; GARCIA, 2012), a alta taxa de reutilização do calor da vinhaça dentro da própria indústria (80%) pode ser considerada uma forma de mitigação das emissões de GEE, devido à substituição energética realizada.

Se por um lado a reutilização do calor da vinhaça pode mitigar as emissões, por outro o processo diminui as altas temperaturas iniciais vinhaça para uma média de 40-50°C, viabilizando a formação de nichos microbiológicos metanogênicos e consequentemente, pode acarretar maiores emissões de CH₄. Outros estudos devem ser realizados visando esclarecer o

efeito da utilização do calor da vinhaça nos fluxos de CH_4 no armazenamento e transporte de vinhaça.

No percurso entre a saída da indústria e anterior à fertirrigação, a vinhaça, quando disposta em canais ou tanques, sofre variação na coloração e composição, resultado da ação redutora extremamente alta, que exige elevada quantidade de oxigênio (O_2) para decomposição dos compostos orgânicos nela presentes (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Nesta fase é iniciada a sedimentação da matéria orgânica presente na vinhaça no fundo dos sistemas de canais e tanques, com formação dos nichos microbiológicos. Com isso, têm início os processos de decomposição dos resíduos e a consequente emissão de CH_4 . O processo de limpeza e monitoramento dos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça assume assim papel de destaque nas práticas voltadas para a mitigação da emissão de CH_4 .

De modo geral, verificou-se que o levantamento dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça, bem como as questões relacionadas ao manejo do resíduo anterior à aplicação no solo, como: pré-tratamento, reuso de água e monitoramento das características físico-químicas, apesar de monitorados ainda não fornece informações precisas e esclarecidas. Nota-se também que gradativamente o setor vem investindo e buscando conhecimento de forma a compreender a dinâmica da vinhaça, objetivando redução de custos, melhor aproveitamento do resíduo e indiretamente reduzindo as emissões de CH_4 .

A literatura relacionada a outras culturas sucroenergéticas, como o milho e a beterraba açucareira, não traz informação alguma sobre o sistema de armazenamento e transporte do material equivalente à vinhaça gerada pelo processamento da cana-de-açúcar. Mesmo nos países que usam esta cultura como matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, como a Austrália e Índia não foi possível obter informações a respeito desse assunto.

5.2 Estudo 2: Emissões de CH_4 provenientes da vinhaça nos diferentes sistemas de armazenamento e transporte

As altas temperaturas nos primeiros pontos de amostragem situados no canal revestido foram inversamente proporcionais às emissões de CH_4 , limitando a ocorrência da metanogênese. Estudos indicam que a temperatura ótima para metanogênese está entre 30 e 40°C e que valores muito abaixo ou acima destes causam redução na produção de CH_4 não só devido à inibição da atividade metanogênica, mas também dos outros microrganismos

envolvidos no processo (LE MER; ROGER, 2001). A partir de P4 a progressiva diminuição da temperatura levou a um aumento gradativo das emissões de CH₄ até P7.

Outro fator limitante ao desenvolvimento de organismos metanogênicos no canal revestido foi o Eh, que segundo Le Mer e Roger (2001) deve ser inferior a -150 mV para ocorrer a metanogênese. Já nos pontos alocados no canal não revestido, em P5, P6 e P7, onde houve significativa emissão de CH₄, verificou-se elevada carga orgânica na vinhaça, além da anaerobiose extrema, comprovada pelos valores de Eh.

A intensa emissão de CH₄ causou redução nos valores de C, DBO e DQO ao longo dos pontos de coleta e está de acordo com Su et al., (2003) que observou que a produção de CH₄ em superfícies líquidas está associada com o conteúdo de matéria orgânica dissolvida. Segers (1998) mostrou que os altos teores de matéria orgânica lábil em sistemas eutróficos aumenta o consumo de oxigênio dissolvido liberando grandes quantidades de substrato para metanogênese.

As maiores emissões de CH₄ provenientes do sistema de armazenamento e transporte de vinhaça por canais no período intermediário da safra de 2012 estão relacionados à maiores concentrações de C neste período, coincidentes com a época do ano em que a cana-de-açúcar apresenta maiores valores de brix, influenciados pelo elevado grau de maturação da cultura na estação seca do ano (SILVA; JERONIMO; LÚCIO, 2008).

Já na safra de 2013, apesar da vinhaça apresentar concentrações elevadas de C no período intermediário, as maiores emissões ocorreram no período final da safra, provavelmente devido ao aumento do Eh, que foi mais negativo no final da safra do que no período intermediário. Flutuações sazonais nas emissões de CH₄ provenientes de superfícies líquidas são provocadas por uma série de fatores ambientais ligados à composição do substrato e ao clima. Uma vez que estes fatores estão sujeitos a mudanças constantes em condições de campo, torna-se difícil estabelecer uma correlação entre determinado fator e as emissões de CH₄ (SINGH, 2001). O processo da metanogênese nos sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça é, portanto, bastante dinâmico, podendo ser limitado por um determinado fator, e influenciados pela interação de vários outros.

As emissões pouco significativas de CH₄ observadas no último ponto de coleta do canal não-revestido (P8) devem estar relacionadas com os menores conteúdos orgânicos (C, DBO e DQO), além de uma menor lâmina de vinhaça. Estas condições permitiram que o sedimento depositado no fundo do canal entrasse em contato com o O₂ do ambiente e reduzisse as condições de anaerobiose extrema necessária para metanogênese. Bastviken (2009) ao avaliar emissões de CH₄ provenientes de sedimentos aquáticos, verificou que

baixos fluxos de CH_4 são obtidos com a oxigenação de sedimentos e que maiores emissões, bem como maior atividade metanogênica são encontradas quando sedimentos são encobertos mantendo suas condições anóxicas.

Os elevados fluxos de CH_4 produzidos no sistema de canais representam a somatória das emissões provenientes da vinhaça e do sedimento no fundo do canal, sobretudo na parte sem revestimento. O experimento de incubação auxiliou no entendimento de que a vinhaça sozinha não produz significativa emissão de CH_4 . As maiores emissões do tratamento composto somente pelo sedimento, quando comparado à vinhaça, se deu por conta da umidade do sedimento, causado pelo residual de vinhaça. Apesar da superfície do sedimento ter sido mantida em condições óxicas, a parte intermediária no frasco apresentou Eh negativo indicando condições de anaerobiose, favorável às emissões de CH_4 . Entretanto, quando a vinhaça foi incubada junto com o sedimento, tal como acontece nos canais, obteve-se maiores emissões de CH_4 . Entende-se que os nichos microbianos metanogênicos provavelmente são formados no sedimento, enquanto que a vinhaça mantém as condições de anaerobiose do sedimento necessárias à metanogênese e fornece nutrientes para acelerar a reação.

De maneira geral, apesar de baixas, as emissões de CH_4 provenientes da vinhaça nos sistemas de armazenamento e transporte por tanques apresentaram picos e variação ao longo das amostragens. Tal fato deve estar associado a algumas condições específicas da vinhaça e ou do ambiente, e ainda à ocorrência de bolhas de CH_4 . As emissões de CH_4 provenientes de superfícies líquidas podem ocorrer através de dois processos: i) difusão do sedimento para o meio aquoso e/ou ii) ebulição, formação de bolhas (PALMA-SILVA et al., 2013). O segundo processo é mais significativo quando verifica-se altas concentrações de CH_4 nos sedimentos anóxicos (MARINHO et al., 2009), como é o caso das emissões provenientes da vinhaça transportada por canais não revestidos. Segundo Marani e Alvalá (2007) a alta variabilidade nas emissões de CH_4 provenientes de superfícies líquidas é esperada e atribuída ao fato do mecanismo de liberação das moléculas de CH_4 pelo processo de ebulição envolver variáveis como turbulência da água e mudança na pressão hidrostática próxima à superfície. A profundidade da lâmina de água também influencia os fluxos de CH_4 , alterando sua solubilidade por meio da pressão e causando também variações de temperatura (JOYCE; JEWELL, 2003).

Nossos resultados indicaram que as maiores emissões de CH_4 são provenientes dos sistemas considerados mais antigos, nos quais a usina não utiliza revestimento e mantém a vinhaça em contato direto com o solo. A modernização do sistema de armazenamento e

transporte da vinhaça, como o revestimento dos canais e a adoção de tanques e tubulações fechadas apresentam potencial para reduzir significativamente as emissões de CH₄.

Existe pouca informação na literatura sobre as emissões de CH₄ resultantes da vinhaça, sobretudo no que se refere ao período de sua permanência no sistema de armazenamento e transporte. Oliveira (2010) também avaliou as emissões de CH₄ em canais abertos com e sem revestimento e obteve intensidade de emissão de 1,4 kg de CO₂ eq m⁻³ de vinhaça transportada, valores na mesma ordem de grandeza dos dados apresentados no presente estudo (0,9 kg de CO₂ eq m⁻³). Estes resultados indicam que apesar da avaliação ocorrer em diferentes usinas, onde ocorre mudança na dimensão dos canais, na composição da vinhaça, diferença no método de amostragem e também no período avaliado, as técnicas adotadas nas amostragens, análises e cálculos são precisas e indicam que neste tipo de sistema a vinhaça contribui significativamente quanto às emissões de GEE.

Ao comparar a magnitude dos resultados do presente trabalho com outros tipos de resíduos líquidos, verificou-se que Sardá et al. (2010) e Dinuccio; Berg e Balsari. (2008) avaliando emissão de CH₄ proveniente de sistema de armazenamento de dejetos suínos, observaram emissões superiores variando de 9,6 a 12,0 g CH₄ m⁻² h⁻¹. Por outro lado, Sharpe et al. (2002) reportou baixas emissões (458 mg m⁻² h⁻¹) provenientes do mesmo tipo de resíduo. Estes resultados indicam que há uma grande variação nas emissões de CH₄ nos sistemas de armazenamento e transporte de resíduos agrícolas. Isto pode ser explicado pelo fato de que eles são dinâmicos e submetidos à influências externas, como variações de temperatura, umidade e atributos físico-química do resíduo, além das variações como a altura, largura e comprimento do sistema de armazenamento e transporte utilizado (SHARPE; HARPER; BYERS, 2002; SOMMER et al., 2007; DINUCCIO; BERG; BALSARI, 2008; SARDÁ et al., 2010).

Na última década, foram feitas várias estimativas da emissão total de GEE (pegada de carbono) na produção de cana-de-açúcar (FIGUEIREDO; LA SCALA, 2011; GALDOS et al., 2010) e etanol (DIAS DE OLIVEIRA; VAUGHAN; RYKIEL, 2005; MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008; SEABRA et al., 2011; CAVALETT et al., 2012). No entanto, nenhuma delas incluiu as emissões de CH₄ provenientes do armazenamento e transporte da vinhaça. A incorporação das emissões provenientes dessa fonte, sobretudo daquelas resultantes de canais não revestidos, aumentarão as emissões totais de CO₂eq proveniente da produção de etanol no Brasil.

A intensidade de emissão de CH₄ no sistema de tanques e tubulações fechadas foi quase mil vezes ou uma ordem de grandeza menor do que no sistema de canais, o que

evidencia que este sistema não favorece a produção de CH₄. Nossos resultados evidenciam que a adoção dos tanques revestidos e tubulações fechadas é uma excelente estratégia para mitigar significativamente as emissões de CH₄ resultantes da produção de etanol de cana-de-açúcar.

5.3 Estudo 3: Microbiota associada

A abundância do gene 16S para Procarioto e Bactéria não sofreu interferência dos diferentes sistemas de armazenamento e transporte de vinhaça. A maior abundância destes grupos microbianos ocorreu do meio para o final da safra e indica que os teores de matéria orgânica e nutrientes presentes na vinhaça favorecem o desenvolvimento microbiano nestes locais.

De acordo com Guevara et al. (2014) as comunidades microbianas encontradas em sedimentos desempenham importante função na ciclagem de nutrientes e a adição de nutrientes nestes sistemas está diretamente relacionada à abundância dos grupos microbianos. Nilsson et al. (1991) ao estudar sedimentos marinhos de águas rasas e verificou que a adição de nutrientes apresenta efeito significativo sobre a biomassa e, atividade microbiana, principalmente no que diz respeito à grupos bacterianos.

Em comparação com a abundância bacteriana, a abundância do gene 16S rRNA para o domínio Arquéia foi menor e menos sensível à determinados fatores relacionados ao sedimento, assim como visto na literatura (LIU et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Por outro lado, Swan et al. (2010) verificaram que a abundância de Arquéia excedeu a de Bactéria em sedimentos anóxicos de um lago hipersalino da Califórnia.

Verificou-se a influência do sistema de armazenamento e transporte de vinhaça sobre a comunidade de arqueias e a maior abundância encontrada nos canais não revestidos, o que correlacionou com a ausência de revestimento e aos menores valores de Eh. Segundo Ahila et al. (2014) arqueias são atualmente conhecidas por estarem envolvidas em uma variedade de processos biogeoquímicos, tal qual transformação do C orgânico em CH₄, o que explica a maior abundância nos canais não revestidos no meio e final de safra, quando foram encontrados teores elevados de C. A ausência de revestimento deste sistema, permitiu maior sedimentação dos conteúdos orgânicos presentes na vinhaça, os quais quando totalmente encobertos pela lâmina de vinhaça, mantém condições ideais para desenvolvimento de nichos microbianos, especificamente metanogênicos.

A abundância de Arquéia e dos genes funcionais *mcrA* e *mba* foram baixas para o sistema de armazenamento e transporte baseado em tanques. Segundo Zhang et al. (2014) a abundância de Arquéia pode variar de acordo com a profundidade dos sedimentos. Para Chaudhary et al. (2013) além da abundância e diversidade metanogênica, o transporte das moléculas de CH₄ até a atmosfera também sofre variação com a diferença de profundidade do sedimento, tipo de substrato disponível e variações de temperatura. Cetecioglu et al. (2009) compararam amostras de sedimentos marinhos anóxicos e identificaram que apesar das comunidades microbianas apresentarem mesma distribuição em diferentes profundidades, a abundância e predominância de membros metanogênicos diminuem significativamente com a profundidade e dependem dos nutrientes fornecidos pela lâmina de água, ou neste caso, da vinhaça.

Os maiores valores de diversidade e riqueza do gene 16S rRNA encontrados no início da safra dos sedimentos indicam haver uma seleção microbiológica ao longo do período. No início da safra, a sedimentação de material orgânico presente na vinhaça é menor que nos outros períodos, aumentando a variedade de diversidade e riqueza. Passado o período inicial da safra a quantidade de material orgânico depositado ao fundo destes sistemas aumenta, o redox se torna mais negativo e os teores de sulfatos mais baixos.

Ao levar em consideração que em média a porcentagem de todas as sequências recuperadas para o gene 16S de Arquéia provenientes de solos é de aproximadamente 2% (BATES et al., 2011), os valores obtidos neste trabalho (5 a 10 %), foram muito expressivos para o sistema de armazenamento e transporte de vinhaça baseado em canais não revestidos e estão em concordância com as emissões de CH₄. Os pontos que apresentaram maiores porcentagens de Arquéia (P5, P5 e P7) apresentaram também maiores emissões de CH₄.

A magnitude dos valores de abundância do gene *mcrA* para os sistemas de canais foi muito próxima à encontrada em sedimentos de um estuário na China (ZELEKE et al., 2013). Os resultados deste trabalho também demonstraram redução do número de cópias do gene com a profundidade, assim como ocorreu nas amostras de sedimento provenientes dos tanques.

Maiores abundâncias de *mcrA* e *mba* no final da safra para maioria dos pontos alocados nos canais pode estar relacionada com a intensidade de fatores ambientais, tais como a disponibilidade de nutriente, a salinidade e a concentração de sulfato (WALDRON et al., 2007; ZELEKE et al., 2013). Apesar de não ter sido realizada análise de sulfato do sedimento estudado no presente trabalho, resultados da caracterização da vinhaça realizados pelas usinas demonstraram redução significativa destes teores ao longo da safra, demonstrando que esta

limitação reduziu a competição pelo substrato entre arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato e aumentou a população metanogênica ao longo da safra corroborando com a literatura (WALDRON et al., 2007; WINFREY; ZEIKUS, 1977; ZELEKE et al., 2013).

Corroborando com nossos resultados, Freitag e Prosser (2009) observaram aumento da abundância microbiana metanogênica ao longo de um experimento de incubação de solos turfosos e atribuíram como explicação à estes resultados a curva de crescimento microbiano. Os autores identificaram ainda, correlação linear entre a abundância do gene funcional e as emissões de CH₄, similarmente ao que foi verificado no presente estudo.

Apesar de não haver relatos na literatura de trabalhos de caracterização de comunidades metanogênicas a partir do gene funcional *mcrA*, provenientes da vinhaça em diferentes sistemas de armazenamento e transporte, esta abordagem tem sido muito utilizada para outros ecossistemas, como solos alagados, resíduos suínos, turfeiras, sedimentos marinhos e de água doce, entre outros (BANNING et al., 2005; FREITAG; PROSSER, 2009; NUNOURA et al., 2008; ZELEKE et al., 2013) demonstrando informações satisfatórias. Verifica-se ainda, possíveis correlações deste gene com a caracterização dos nichos estudados (JUOTTONEN, 2005).

Porém, a técnica precisa ser usada com cautela, por permitir uma visão limitada sobre a dinâmica do processo metanogênico (FREITAG; PROSSER, 2009). O complexo enzimático *mcrA* é fortemente influenciado por fatores como temperatura, e a quantificação destes genes pode sub ou superestimar a atividade metanogênica. Assim, a utilização de abordagens multidisciplinares para estudo do sistema, as quais envolvem quantificação dos genes, das emissões de CH₄ e identificação dos microrganismos de interesse surge como alternativa. Por este motivo, foi utilizado o gene *mba*, desenhado para o gênero *Methanobrevibacter*. Este conjunto de *primer* foi utilizado pelo fato de 99% das sequências obtidas a partir do pirosequenciamento serem pertencentes a este gênero e demonstrou alta especificidade, quando comparado com *mcrA*.

Assim como verificado em outros estudos relacionados à ambientes de anaerobiose extrema (POLÓNIA et al., 2014; ZELEKE et al., 2013; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990) o filo mais abundante para todas as amostras de sedimento estudadas foi *Euryarchaeota*, filo ao qual pertence todas as arqueias anaeróbicas capazes de realizar a metanogênese (VALENTINE, 2007). Apenas o sistema de armazenamento e transporte de vinhaça por tanques apresentou uma pequena porcentagem de *Crenarchaeota*, o que está de

acordo com Polónia et al. (2014), que identificou que 30% das sequências obtidas a partir de sedimentos marinhos foram provenientes deste filo.

Os resultados indicaram que a microbiota associada às amissões de metano aloca-se no sedimento depositado ao fundo dos diferentes sistemas de distribuição e transporte de vinhaça e não na vinhaça propriamente dita, apesar da utilização desta como fonte de nutrição. Em torno de 99% das sequências obtidas pelo pirosequenciamento demonstraram que o grupo microbiano metanogênico de ambos sistemas de armazenamento e transporte é composto basicamente pelo gênero *Methanobrevibacter*, e apesar de não conseguirmos classificação à nível de espécie, as sequências obtidas foram filiadas à sequência de *Methanobrevibacter acididurans*, isolada pela primeira vez de um digestor alimentado com resíduos de uma destilaria de etanol na Índia (SAVANT. et al., 2002).

Os resultados do pirosequenciamento das amostras do experimento de incubação demonstraram em pequena escala a mesma dinâmica dos resultados de campo. Maior abundância do filo *Euryarchaeota* no tratamento V+S é explicada pelas condições ideais para formação de nichos metanogênicos no sedimento fornecida pela vinhaça.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa comprovam a hipótese de que a vinhaça é uma importante fonte de CH₄ no setor sucroenergético. O CH₄ é originário da decomposição anaeróbia de material orgânico sedimentado no fundo dos canais e tanques. Informações produzidas a partir das técnicas de pirosequenciamento e qPCR demonstraram que a comunidade microbiana metanogênica se concentra nestes sedimentos.

As amostragens sistemáticas dos gases emitidos pela vinhaça e análises cromatográficas dos pontos amostrados na parte não revestida do canal mostraram que a quantidade de CH₄ não é desprezível e que precisa ser contabilizada na pegada de carbono do etanol. Os dados obtidos em duas safras consecutivas mostraram que as emissões totais de CH₄ para este tipo de canal atingiram em média 7,5 kg CO₂ eq m⁻³ de vinhaça. Este valor é 5 vezes maior do que o obtido na parte revestida do canal. Consequentemente, o revestimento do canal pode ser considerado importante forma de reduzir a emissão de CH₄ proveniente da vinhaça. A adoção do sistema de tanques e tubulações fechadas proporciona uma intensidade de emissão de CH₄ aproximadamente mil vezes menor do que os canais revestidos. Uma possível explicação para a baixa emissão observada nos tanques pode estar relacionada ao fato de menos material orgânico ser depositado no fundo do tanque e ainda permanecer por um curto intervalo de tempo. A utilização destes valores deve portanto, ser empregado com cautela uma vez que representam as situações específicas avaliadas nesta pesquisa. Outras usinas podem apresentar diferentes configurações nos sistemas de armazenamento e transporte. A própria heterogeneidade da composição da vinhaça é outro importante fator a ser considerado.

Houve correlação positiva entre a abundância do gene 16S rRNA de Arquéia e dos genes funcionais *mcrA* e *mba* com a emissão de CH₄. As sequências obtidas a partir do pirosequenciamento do gene 16S rRNA demonstrou que a comunidade microbiana metanogênica foi dominada por sequências pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter*.

Com base nos dados de origem do CH₄ derivada de processos microbiológicos e da intensidade das emissões associadas ao conhecimento do efeito das variações dos atributos físico-químicos da vinhaça gerados nesta pesquisa, é possível aplicar este conjunto de informações com o objetivo de mitigar a emissão ou criar condições favoráveis à sua produção para fins energéticos ou outros usos.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.; DUTT, D.; TYAGI, C.H. Complete characterization of bagasse of early 461 species of *saccharum officinerum*-CO 89003 for pulp and paper making. **Bioresources**, Raleigh, v. 5, p. 1197-1214, 2010.
- AHILA, N.K.; KANNAPIRAN, E.; RAVINDRAN, J.; RAMKUMAR, V.S. Studies on methanogenic consortia associated with mangrove sediments of Ennore. **Journal of Environmental Biology**, Vikas Nagar, v. 35, p. 649–654, 2014.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D. ; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; BAENA, S.; LOPEZ, M.V.; TAKETANI, R.G. ; MELO, I.S. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. e38600, 2012.
- BANNING, N.; BROCK, F.; FRY, J.C.; PARKES, R.J.; HORNIBROOK, E.R.C.; WEIGHTMAN, A.J. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 947–960, 2005.
- BARROS, R.P.; VIÉGAS, P.R.A.; SILVA, T.L.; SOUZA, R.M.; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R.A.; BARRETTO, M.C.V.; MELO, A.S. 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.
- BASTVIKEN, D. Methane. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STRACKEBRANDT, E. (Ed.). **Encyclopedia of inland waters**, Oxford, United Kingdom: Elsevier Publishers, 2009. p. 783–805.
- BATES, S.T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J.G.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, London, v. 5, p. 908-917, 2011.
- BRITO, F.L.; ROLIM, M.M.; SILVA, J.A.A.; PEDROSA, E.M.R. Qualidade do percolado de solos que receberam vinhaça em diferentes doses e tempo de incubação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.11, p.318-323, 2007.
- BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 245–252, 2008.
- CAMBUIM, F.A. **A ação da vinhaça sobre a retenção de umidade, pH, acidez total, acumulação e lixiviação de nutrientes, em solo arenoso**. 1983. 133p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1983.
- CARDENAS, E.; TIEDJE, J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, p. 544-549, 2008.
- CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L.C.; SOUSA NETO, E.R.; PITOMBO, L.M.; DUARTE-NETO, P.J.; VARGAS, V.P.; ANDRADE, C.A.; GAVA, G.J.C.; ROSSETTO, R.;

CANTARELLA, H.; NETO, A.E.; MARTINELLI, L.A. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **Global Change Biology Bioenergy**, Urbana-Champaign, v. 5, p. 267–280, 2012.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 735-744, 2010.

CAVALETT, O.; JUNQUEIRA, T.L.; DIAS, M.O.S.; JESUS, C.D.F.; MANTELATTO, P.E.; CUNHA, M.P.; FRANCO, H.C.J.; CARDOSO, T.F.; FILHO, R.M.; ROSSEL, C.E.V.; BONOMI. Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. **Clean Technologies and Environmental Policy**, Berlim, v. 14, p. 399–410, 2012.

CAVALETT, O.; CHAGAS, M.F.; SEABRA, J.E.A.; BONOMI, A. Comparative LCA of ethanol versus gasoline in Brazil using different LCIA methods. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, Landsberg, v. 18, p. 647-658, 2013

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, p. 831-843, 2009.

CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; MAIA, S.M.F.; CERRI, C.E.P.; COSTA JUNIOR, C.; FEIGL, B.J.; MELLO, F.F.C.; GALDOS, M.V.; MOREIRA, C.S.; CARVALHO, J.L.N. Greenhouse gas mitigation options in Brazil for land-use change, livestock and agriculture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, p.102-116, 2010.

CETECIOĞLU, Z.; INCE, B.K.; KOLUKIRIK, M.; INCE, O. Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the Marmara Sea. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 58, p. 384–395, 2009.

CHAUDHARY, P.P.; BRABLCOVA, L.; BURIANKOVA, I.; RULIK, M. Molecular diversity and tools for deciphering the methanogen community structure and diversity in freshwater sediments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 97. p. 7553–7562, 2013

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

CRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, Oxford, v. 33, p. 2752-2761, 2013.

CICERONE, R.J.; OREMLAND, R.S. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 2, p. 299–327, 1988.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, Quarto Levantamento, Brasília, abr. 2014 - **Companhia Nacional de Abastecimento**. – Brasília: Conab 2014.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. P4.231 – dezembro/2006.

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

DAVIS, S.C.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; COWIES, A.L.; GEORGES, B.H.; OGLE, S.M.; SMITH, P.; NOORDWIJK, M.V.; VAN WIJK, M.T. Management swing potential for bioenergy crop. **Global Change Biology Bioenergy**, Urbana-Champaign, v. 5, p. 623–638, 2013.

DIAS DE OLIVEIRA, M.E.; VAUGHAN, B.E.; RYKIEL, E.J.; Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. **BioScience**, London, v. 55, p. 593–602, 2005.

DINUCCIO, E.; BERG, W.; BALSARI, P. Gaseous emissions from storage of untreated slurries and the fractions obtained after mechanical separation. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 42, p. 2448-2459, 2008

DLUGOKENCKY, E.J.; NISBET, E.G.; FISHER, R.; LOWRY, D. Global atmospheric methane: budget, changes and dangers. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, London, v. 369, p. 2058–2072, 2011.

DÖLKEN, L.; SCHÜLER, F. Quantitative detection of t(14;18)-positive cell by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques**, Natick, v. 6, p. 1058-1064, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 10 jul. 2014.

FIGUEIREDO, E.B.; LA SCALA, N. Greenhouse gas balance due to the conversion of sugarcane areas from burned to green harvest in Brazil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 141, p. 77–85, 2011.

FRANCO, H.C.J.; PIMENTA, M.T.B.; CARVALHO, J.L.N.; MAGALHÃES, P.S.G.; ROSSELL, C.E.V.; BRAUNBECK, O.A.; VITTI, A.C.; KÖLLIN, O.T.; NETO, J.R. Assessment of sugarcane trash for agronomic and energy purposes in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 305-312, 2013

FREITAG, T.E.; PROSSER, J.I. Correlation of methane production and functional gene transcriptional activity in a peat soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 6679–6687, 2009.

FUESS, L.T.; GARCIA, M. L. **Qual o valor da vinhaça?** Mitigação de impacto ambiental e recuperação de energia por meio da digestão anaeróbia. São Paulo : Cultura Acadêmica, Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, 2012. 130p.

- FURTADO, A.T.; SCANDIFFIO, M.I.G. The Brazilian sugarcane innovation system. **Energy Policy**, London, v. 39, p. 156-166, 2011.
- GALDOS, M.V.; CERRI, C.C.; LAL, R.; BERNOUX, M.; FEIGL, B.J.; CERRI, CEP. Net greenhouse gas fluxes in Brazilian ethanol production systems. **Global Change Biology Bioenergy**, Urbana-Champaign, v. 2, p. 37-44, 2010.
- GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 582-587, 2009.
- GUEVARA, R.; IKENAGA, M.; DEAN, A.L.; PISANI, C.; BOYER, J.N. Changes in Sediment Bacterial Community in Response to Long-Term Nutrient Enrichment in a Subtropical Seagrass-Dominated Estuary. **Microbial Ecology**, New York, v. 68, p. 427-440, 2014.
- 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.
- HEID, C.A.; STEVENS, J. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, p. 986-994, 1996.
- HUTCHINSON, G.L.; LIVINGSTON, G.P. Use of chamber systems to measure trace gas fluxes. In: Harper, L.A. (Ed.), *Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change*. ASA, CSSA e SSSA, Madison, (ASA Spec. Publ. 55), pp. 63-78, 1993.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **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. 104p.
- JOYCE, J.; JEWELL, P.W. Physical controls on methane ebullition from reservoirs and lakes. **Environmental & Engineering Geoscience**, Amsterdam, v. 9, p. 167-178, 2003.
- JUOTTONEN, H.; GALAND, P.E.; TUUTTILA, E.S.; LAINE, J.; FRITZE, H.; YRJALA, K. Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 1547-1557, 2005.
- LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRE, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, p. 16-29, 2011.
- LAVOIE, F.L.; BUENO, B.S.; LODI, P.C. Efeito da vinhaça na membrana impermeabilizante usada nos tanques de armazenamento. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, São Paulo, v. 29, p. 128-138, 2013.
- 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.

LIU, L.; PENG, Y.; ZHENG, X.H.; XIAO, L.; YANG, L.Y. Vertical structure of bacterial and archaeal communities within the sediment of a eutrophic lake as revealed by culture-independent methods. **Journal of Freshwater Ecology**, London, v. 25, p. 565–573, 2010.

LUDOVICE, M.T.F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático**. 143p. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LUZ, P.H.C. Novas tecnologias no uso da vinhaça e alguns aspectos legais. In: II SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2005. **Anais...** Piracicaba: 2005. p.1-53.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R.; Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 9, p. 582-595, 2008.

MACKIE, R.I.; WHITE, B.A.; BRYANT, M. Methanogenesis, Biochemistry. In: LEDERBERG, J. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**, San Diego, USA: Academic Press, 1992. p. 97-109.

MARANI, L.; ALVALÁ, P.C.; Methane emissions from lakes and floodplains in Pantanal, Brazil. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 41, n.1, p. 627-1633, 2007.

MORAES, B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, L.G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO, PE.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, Amsterdam, v. 113, p. 825-835, 2014.

NILSSON, P.; JOHNSON, B.; SWANBERG, I.L.; SUNDBACK, K. Response of a marine shallow-water sediment system to an increased load of inorganic nutrients. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 71, p. 275–290, 1991.

NUNES JUNIOR, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. **Idea News**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 92, p. 22-30, 2008.

NUNES JUNIOR, D.; PINTO, R.S.A.; TRENTO, F.E.; ELIAS, A.I. Indicadores agrícolas do setor canavieiro: safra 2003/2004. **Idea News**, Ribeirão Preto, 2005. p.1-111.

NUNOURA, T.; OIDA, H.; MIYAZAKI, J.; MIYASHITA, A.; IMACHI, H.; TAKAI, K. Quantification of mcrA by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 240–247, 2008.

O’CONNOR, F.M.; BOUCHER, O.; GEDNEY, N.; JONES, C.D.; FOLBERTH, G.A.; COPPELL, R.; FRIEDLINGSTEIN, P.; COLLINS, W.J.; CHAPPEL LAZ, J.; RIDLEY, J.; JOHNSON, C.E. Possible role of wetlands, permafrost, and methane hydrates in the methane cycle under future climate change: A review. **Reviews of Geophysics**, Washington, v. 48, RG4005, p. 1-33, 2010.

OLIVEIRA, B.G. **Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de *archaea* presente no sedimento do canal de distribuição.** 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OLIVEIRA, M. Vinhaça alternativa: resíduo da produção de etanol pode ser usado para produzir biodiesel. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 186, p. 70-73, 2011.

OLIVEIRA, B.G.; CARVALHO, J.L.N.; CERRI, C.E.P.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma, Amsterdam**, v. 200-201, p. 77–84, 2013.

PALMA-SILVA, C.; MARINHO, C.C.; ALBERTONI, E.F.; GIACOMINI, I.B.; BARROS, M.P.F.; FURLANETTO, L.M.; TRINDADE, C.R.T.; ESTEVES, F.A. Methane emissions in two small shallow neotropical lakes: The role of temperature and trophic level. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 81, p. 373-379, 2013.

PAREDES, D.S.; LESSA, A.C.R.; SANT’ANNA, S.A.C.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and N fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, London, v. 98, p. 41-55, 2013.

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

POLÓNIA, A.R.M.; CLEARY, D.F.R.; DUARTE, L.N.; DE VOOGD, N.J.; GOMES, N.C.M. Composition of Archaea in seawater sediment and sponges in the Kepulauan Seribu reef system Indonesia. **Microbiology Ecology**, New York, v. 67, p. 553–567, 2014.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Ethanol Industry Outlook.** Washington, 2013. 32p. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook>> Acesso: 30 nov. 2014.

RESENDE, A.S.; XAVIER, R.P.; OLIVEIRA, O.C.; 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.

REZENDE, J.O. Vinhaça: Outra grande ameaça ao meio ambiente. **Revista Magistra**, Cruz das Almas, p. 34-148, 1984.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; NYREN, P. Realtime DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 242, p. 84–89, 1996.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 11, p. 3-11, 2001.

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar: indagações e reflexões. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 110, p. 6-11, 2005.

- RUDORFF, B.F.T.; AGUIAR, D.A.; SILVA, W.F.; SUGAWARA, L.M.; ADAMI, M.; MOREIRA, M.A. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo State (Brazil) using Landsat data. **Remote Sensing**, Basel, v. 2, p. 1057–1076, 2010.
- SARDÁ, L.G.; HIGARASHI, M.M.; MULLER, S.; OLIVEIRA, P.A.; COMIN, J.J. Redução da emissão de CO₂, CH₄ e H₂S através da compostagem de dejetos suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, p. 1008-1013, 2010.
- SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C.; CHUM, H.L.; FARONI, C.E.; SARTO, C.A. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 5, p. 519–532, 2011.
- SEGERS, R. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. **Biogeochemistry**, The Hague, v. 41, p. 23-51, 1998.
- SHEEHAN, G.J.; GREENFIELD, P.F. Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. **Water Research**, New York, v. 14, p. 257-77, 1980.
- SHARPE, R.R.; HARPER, L.A.; BYERS, F.M. Methane emissions from swine lagoons in Southeastern US. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 90, p. 17-24, 2002.
- SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- SILVA, M.A.; JERONIMO, E.M.; LÚCIO, A.D. Perfilhamento e produtividade de cana-de-açúcar com diferentes alturas de corte e épocas de colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 979-986, 2008.
- SINGH, S.N. Exploring correlation between redox potential and other edaphic factors in field and laboratory conditions in relation to methane efflux. **Environment International**, Amsterdam, v.25, p. 265-274, 2001.
- SOARES, L.H.B.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. **Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil**. Seropédica: EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2009. 14 p. (Circular Técnica, 27).
- SOMMER, S.G.; SOREN, O.P.; SORENSEN, P.; POULSEN, D.H.; MOLLER, H.B. Methane and carbon dioxide emissions and nitrogen turnover during liquid manure storage. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, London, v. 78, 27-36, 2007.
- SPANG, A.; HATZENPICHLER, R.; BROCHIER-ARMANET, C.; RATTEL, T.; TISCHLER, P.; SPIECK, E.; STREIT, W.; STAHL, D.A.; WAGNER, M.; SCHLEPER, C. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing Archaea supports the phylum *Thaumarchaeota*. **Trends Microbiology**, Cambridge, v. 18, p. 331– 340, 2010.
- SU, J.J.; LIU, B.Y.; CHANG, YC. Emission of greenhouse gas from livestock waste and wastewater treatment in Taiwan. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 95, p. 253-263, 2003.

SWAN, B.K.; EHRHARDT, C.J.; REIFEL, K.M.; MORENO, L.I.; VALENTINE, D.L. Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake the Salton Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 757–768, 2010.

VALENTINE, D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 316–323, 2007.

WALDRON, P.J.; PETSCH, S.T.; MARTINI, A.M.; NÜSLEIN, K. Salinity constraints on subsurface archaeal diversity and methanogenesis in sedimentary rock rich in organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4171–4179, 2007.

WHITTAKER, E.T; ROBINSON, G. **The Calculus of Observations: A Treatise on Numerical Mathematics**. 4th.ed. New York: Dover, 1967. 376p.

WILKIE, A.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 63-102, 2000.

WINFREY, M.R.; ZEIKUS, J.G. Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 275–281, 1977.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 4576–4579, 1990.

ZELEKE, J.; LU, S.L.; WANG, J.G.; HUANG, J.X.; LI, B.; OGRAM, A.V.; QUAN, Z.X. Methyl coenzyme M reductase A (mcrA) gene-based investigation of methanogens in the mudflat sediments of Yangtze River Estuary, China. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 257-267, 2013.

ZHANG, J.; YANG, Y.; ZHAO, L.; YUZHAI LI XIE, S.; YONG LIU, Y. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, DOI 10.1007/s00253-014-6262-x, 2014.