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

Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo

Paulo Roger Lopes Alves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2015**

Paulo Roger Lopes Alves
Engenheiro Agrônomo

Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA**
CARDOSO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2015

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

Alves, Paulo Roger Lopes

Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo / Paulo Roger Lopes
Alves. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba,
2015.

138 p. : il.

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

1. Ecotoxicologia 2. Fauna do solo 3. Micro-organismos 4. Poluição do solo I. Título

CDD 631.8
A474a

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

Ao meu pai, Antonio Pardo Alves
À minha mãe, Maria Antonia Lopes Alves,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde, sabedoria, coragem e energias positivas todos os dias.

À professora Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pela orientação, incentivo, ensinamentos, confiança e, especialmente, pelo forte laço de amizade criado. Um exemplo de profissionalismo, dedicação e amor à ciência.

Ao professor Dr. José Paulo Sousa pela oportunidade da coorientação, acolhimento em Portugal durante a realização do doutorado sanduíche, e pela amizade.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), em especial à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade de desenvolver o estudo.

À fundação CAPES pela concessão da bolsa de doutorado no país e no exterior (projeto nº8045-13-5).

À Universidade de Coimbra (Coimbra-Portugal), por me receber durante o período de estágio no exterior.

Aos meus pais, Antonio Pardo e Maria Antonia, e irmãos; Robson e Vitor Hugo, pelo amor, apoio, respeito, compreensão e confiança de sempre.

À Cláudia Lucas, por todo o amor, carinho, amizade, compreensão, apoio e cumplicidade em todos os momentos.

Aos doutores Tiago Natal da Luz e Fernando Dini Andreote pela amizade, convivência e colaboração em importantes etapas deste trabalho.

Aos professores doutores Fernando Dini Andreote, Carlos Eduardo Pellegrini Cerri e Jussara Borges Regitano, avaliadores do exame de qualificação, pelas valiosas contribuições para a melhoria do projeto de pesquisa.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do Solo da USP/ESALQ: Luis Fernando Baldesin e Denise Mescolotti, pelos ensinamentos, amizade e pela assistência no decorrer do estudo.

Ao amigo José Geraldo Jr., por fornecer as amostras de vinhaça e mudas de cana-de-açúcar, e pela grande amizade criada durante o doutorado.

À Marina Colzato, pela ajuda com as análises químicas dos elementos potencialmente tóxicos.

Às minhas cunhadas Eliane e Carina, e aos meus sobrinhos Guilherme, Gustavo e Leonardo pelo apoio, carinho e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo da USP/ESALQ: Daniel Bini, Ana Julia Bortolazzo, Thiago Gumiere, Rafael Vasconcellos, Alexandre Martines, André Nakatani, Jamil Pereira, Mylenne Pinheiro, German Estrada, Arthur Prudêncio, Joice Bonfim, Marina Horta, Nicole Passaglia, Pilar Mariani e Cristiane Alcântara, pela importante amizade, auxílio, ensinamentos, e acolhimento no laboratório.

Aos colegas do Lab. Solos da Universidade de Coimbra: Tiago Natal da Luz, Sónia Chelinho, Mathieu Renaud, Joana Alves, Antonio Silva, João Raimundo, Henrique Pereira, Carla Pereira, Filipa Reis, Stephanie Jurburg, Akeju Tolutope, Sara Mendes, Dalila Costa, Filipe Chichorro, Nuno Capela, João Pontes, Daniela Alves, Teresa Elói e Cristina Rufino, pela ajuda, amizade e receptividade em Portugal.

Aos demais amigos de Piracicaba: Flávio Macedo, Adriano Lucheta, Fabrício Terra, Eduardo Mariano, Felipe Galuppo, Gustavo, Victor Crepaldi, Layanne Souza, Alice Cassetari, Luciano França, Vivian Carvalho, Elisa Matos, Tatiane Beloni, Juliana Deganelo, Élcio Santos, Fábio Pértille, Jéssica Drum, Michele Silva e Guilherme, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos de Londrina: Lucas Spisla, Daniel Migliorini, Luciano Koyashiki, André Nagaya, Alex Rezende, Leandro Chiarotti, Guilherme Gouveia, Raphael Borghesi, Diego Alfieri, Hugo Favoreto, Márcio Favoreto, Roberto Delicato, Jussiara de Lima, Marcia Tiemi pelos bons momentos proporcionados, essenciais para a descontração.

A todos os demais familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram durante a caminhada acadêmica.

"All substances are poisons; there is none which is not a poison. The right dose
differentiates the poison from a remedy"

Paracelsus

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	23
1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Cana-de-açúcar	29
2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar	29
2.3 Uso de bioindicadores de qualidade do solo	31
2.4 Ecotoxicologia	33
2.4.1 Avaliações sobre a fauna do solo	34
2.4.2 Avaliações sobre a microbiota do solo	35
2.8 Justificativa	37
2.6 Objetivos gerais	38
2.7 Objetivos específicos	38
Referências	39
3 EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE A FAUNA DO SOLO	48
Resumo	48
Abstract	49
3.1 Introdução	49
3.2 Materiais e Métodos	52
3.2.1 Solos e vinhaças utilizados	52
3.2.2 Organismos avaliados e condições de criação	53
3.2.3 Testes ecotoxicológicos padronizados	55
3.2.3.1 Procedimentos experimentais	55
3.2.3.2 Testes de fuga com <i>Eisenia andrei</i>	57
3.2.3.3 Testes de fuga com <i>Folsomia candida</i>	57
3.2.3.4 Testes de reprodução com <i>Eisenia andrei</i>	58
3.2.3.5 Testes de reprodução com <i>Enchytraeus crypticus</i>	58
3.2.3.6 Testes de reprodução com <i>Hypoaspis aculeifer</i>	59
3.2.3.7 Testes de reprodução com <i>Folsomia candida</i>	59
3.2.4 Análise de dados	60
3.3 Resultados	61

3.3.1 Análises químicas e físicas.....	61
3.3.2 Testes de fuga.....	64
3.3.3 Testes de reprodução.....	66
3.4 Discussão.....	71
3.5 Conclusões	78
Referências	78
4 USO DE INDICADORES MICROBIANOS PARA AVALIAR O POTENCIAL POLUIDOR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE OS MICRO- ORGANISMOS EM SOLOS TROPICAIS.....	86
Resumo.....	86
Abstract.....	87
4.1 Introdução	87
4.2 Material e Métodos.....	91
4.2.1 Coleta e preparo dos solos e vinhaças.....	91
4.2.2 Procedimentos dos experimentos em microcosmos.....	91
4.2.3 Análise do crescimento e metabolismo microbianos	93
4.2.4 Análise da colonização das raízes de cana por FMA	94
4.2.5 Análise da estrutura da comunidade bacteriana do solo	94
4.2.6 Análise de dados	95
4.3 Resultados	96
4.3.1 Parâmetros químicos e físicos dos solos e vinhaças.....	96
4.3.2 Efeitos sobre o crescimento e metabolismo microbianos	101
4.3.3 Efeitos sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos	108
4.3 Discussão.....	111
4.4.1 Efeitos sobre a biomassa microbiana	111
4.4.2 Efeitos sobre o metabolismo microbiano	111
4.4.3 Efeitos sobre a colonização por FMA	114
4.4.4 Efeitos sobre a estrutura da comunidade bacteriana do solo	115
4.4 Conclusões	119
Referências	119
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
APÊNDICES	131
ANEXOS.....	135

RESUMO

Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo

O uso da vinhaça de cana-de-açúcar na fertirrigação de solos agrícolas, além de ser uma boa opção para o descarte do resíduo, gera vantagens econômicas. Embora, há anos, este tipo de efluente seja amplamente aplicado em áreas agrícolas, pouco se sabe sobre seus riscos ecológicos para os organismos do solo. Neste estudo, os efeitos de duas vinhaças provenientes de usinas destilatórias diferentes (VA e VB), e outra derivada de uma destilação em laboratório (VC), sobre a fauna e microbiota do solo, foram avaliados em dois Latossolos (LV e LVA) e em um Solo Artificial Tropical (SAT). Concentrações crescentes das vinhaças foram aplicadas nos três solos para avaliar os efeitos sobre a reprodução e comportamento de espécies da fauna, bem como os efeitos dos efluentes sobre a biomassa microbiana de carbono (BMC), respiração basal ($C-CO_2$), atividade da enzima desidrogenase (DHA), colonização de raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e estrutura da comunidade bacteriana foram avaliados nos Latossolos LV e LVA. Para a fauna do solo, as vinhaças das usinas destilatórias foram consideradas as mais tóxicas, uma vez que os solos tratados com estes efluentes foram evitados pelas minhocas e colêmbolos, assim como a reprodução de todas as espécies foi reduzida em pelo menos um, entre os solos testados. A vinhaça originada em laboratório não causou fuga nos organismos testados e somente reduziu a reprodução de minhocas e enquitreídeos em SAT e LVA, respectivamente. Os ácaros foram os organismos menos sensíveis à presença das vinhaças. O crescimento (BMC) e metabolismo microbiano ($C-CO_2$) aumentaram na presença de todas as vinhaças, assim como também houve incremento na colonização dos FMA nas raízes, em LVA. Entretanto, a estrutura da comunidade bacteriana foi alterada na presença das vinhaças, ocorrendo, inclusive, reduções da riqueza e diversidade, bem como aumentos da dominância de alguns grupos bacterianos no solo LV. A toxicidade das vinhaças para a fauna foi atribuída, principalmente, ao alto teor de sais, em especial ao potássio. Contudo, sugeriu-se que os aumentos no crescimento e metabolismo microbiano foram decorrentes do aumento da matéria orgânica e de outros nutrientes, adicionados ao solo pelas vinhaças. As alterações na colonização dos FMA nas raízes de cana-de-açúcar e na estrutura da comunidade bacteriana também podem ter sido influenciadas pelo acréscimo de nutrientes no solo, ou foram respostas a elementos ou substâncias poluidores presentes nas vinhaças, como, por exemplo, o excesso de potássio, ou outros aditivos utilizados durante a fermentação. Estes resultados indicam que critérios de proteção para organismos do solo devem ser considerados na derivação das doses de vinhaça de cana-de-açúcar aplicadas em solos tropicais.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Fauna do solo; Micro-organismos; Poluição do solo

ABSTRACT

Ecotoxicological assessment of sugarcane vinasse in the soil

The use of vinasse of cane sugar in ferti-igation of agricultural soils is a good option for disposal of this waste and generates economic advantages. This type of waste has been applied to agricultural soil for many years; however, there is little information about its ecotoxicological risks on soil organisms. In this study, the effects of two vinasse from different distillerie plants (VA and VB), and another from a laboratory distillation (VC) on the soil fauna and soil microorganisms were evaluated in two Oxisols (LV and LVA) and in a Tropical Artificial Soil (TAS). Increasing concentrations of these vinasses were applied to the soils to assess the effects on the behavior and reproduction of fauna species, and the effects of the effluents on microbial biomass carbon (MBC), basal respiration (C-CO₂), dehydrogenase activity (DHA), colonization by mycorrhizal fungi (AMF) and on the structure of the bacterial community were evaluated in the Oxisols. For the soil fauna, the vinasses from commercial distilleries proved to be the most toxic: earthworms and collembolans avoided the soils that were contaminated with these vinasses, and the reproduction of all organisms was reduced in at least one of the soils. The vinasse from the laboratory did not promote any avoidance behavior in the tested organisms and only reduced the reproduction of earthworms and enchytraeids in TAS and LVA soil, respectively. Mites were the least sensitive organisms to the vinasses. Microbial growth (MBC) and metabolism (C-CO₂, DHA) increased in the presence of all the vinasses, and there was an increase in the AMF colonization of sugar-cane roots. The structure of the soil bacterial community was significantly modified by all the vinasses, with richness and diversity reductions, and increases of the dominance of bacterial groups. For the soil fauna the toxicity was attributed mainly to the high salt contents, especially to the potassium content in the vinasses. However, the increases in microbial growth and metabolism were attributed to the additional organic carbon and other nutrients added into the soils by the wastes. Changes in colonization by AMF and on the bacterial community may also have been influenced by the nutrient increase; however, these were especially considered microbial responses to the polluting elements/substances in the vinasses, as high potassium content, antibiotics or other substances added during the fermentation process. These results indicate that protection criteria for soil organisms should be considered during the derivation of the application limits of sugarcane vinasse in tropical soils.

Keywords: Ecotoxicology; Soil fauna; Microorganisms; Soil pollution

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 - Comportamento de fuga de *E. andrei* em dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 48h. Os valores estão expressos em média de percentagem de fuga $[(N. \text{ no controle} - N. \text{ no tratamento}) / (N. \text{ total da réplica}) \times 100] \pm \text{desvio padrão } (n = 5)$. Asteriscos (*) indicam fuga significativa das minhocas dos solos contaminados (*Fisher's exact test*, $p \leq 0.05$).....64
- Figura 3.2 - Comportamento de fuga de *F. candida* em dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 48h. Os valores estão expressos em média de percentagem de fuga $[(N. \text{ no controle} - N. \text{ no tratamento}) / (N. \text{ total da réplica}) \times 100] \pm \text{desvio padrão } (n = 5)$. Asteriscos (*) indicam fuga significativa dos colêmbolos dos solos contaminados (*Fisher's exact test*, $p \leq 0.05$).....65
- Figura 3.3 - Número de juvenis de *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus* e *Hypoaspis aculeifer* (média $\pm$ SD) nos dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 56, 28 e 14 dias, respectivamente. Asteriscos (*) indicam redução significativa do número de juvenis, quando comparado ao respectivo controle (one-way ANOVA, Dunnett's pot-hoc test - $p \leq 0.05$).....69
- Figura 3.4 - Número de juvenis de *Folsomia candida* (média $\pm$ SD) nos dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 28 dias. Asteriscos (*) indicam redução significativa do número de juvenis, quando comparado ao controle (one-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test - $p \leq 0.05$).....70
- Figura 4.1 - pH (média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação das concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em

microcosmos ($n = 4$). Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle.....99

Figura 4.2 - Umidade (média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação das concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$). Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle.....100

Figura 4.3 - Percentagem de colonização das raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares (FMA; média $\pm$ SD) no Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 60 dias da aplicação das vinhaças VA, VB e VC em concentrações crescentes, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$). Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle.

^a – dados referentes a apenas uma planta, pois houve mortalidade das demais plantas.....108

Figura 4.4 - Análise de coordenadas principais (PCoA) das UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) relativas às comunidades bacterianas do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10 (quadrados), 30 (triângulos) e 60 dias (losangos) da aplicação das concentrações C2 (azul) e C4 (vermelho) das vinhaças VA, VB e VC e controles (preto) nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos.. ...109

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 - Concentrações de duas vinhaças provenientes de usinas destiladoras (VA e VB) e uma vinhaça produzida em laboratório (VC), utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos com as espécies *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Folsomia candida*, e em dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em solo artificial tropical (SAT); os cálculos com base nos limites legais para a aplicação das vinhaças (V) em cada solo também estão incluídos. Os valores apresentados estão expressos em mL de vinhaça kg⁻¹ de solo seco.55
- Tabela 3.2 - Caracterização física e química dos solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e do solo artificial tropical (SAT), bem como das vinhaças (VA, VB e VC), utilizados nos ensaios ecotoxicológicos laboratoriais.....61
- Tabela 3.3 - Concentrações totais dos Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) nos solos (LV, LVA e SAT) tratados com a maior concentração de cada vinhaça, e valores-limites de prevenção (VP) e intervenção agrícola em Área Agrícola de Proteção Máxima (VI - APM_{Max}) destes elementos nos solos, de acordo com CETESB (2014).....62
- Tabela 3.4 - Maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), menor concentração testada com efeito observado (LOEC), e concentrações de efeito em 20% (EC₂₀) e 50% (AC₅₀, EC₅₀), calculadas com base nos resultados dos ensaios de fuga e reprodução com as espécies *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Folsomia candida*, expostas às concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em solo artificial tropical (SAT). Os valores estão expressos em mL de vinhaça kg⁻¹ de solo seco.67-68
- Tabela 4.1 - Concentrações das vinhaças VA, VB e VC aplicadas no Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos.91

Tabela 4.2 - Caracterização química e física do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), utilizados nos ensaios ecotoxicológicos nos microcosmos.....	96
Tabela 4.3 - Caracterização química e física das vinhaças provenientes de usinas destilatórias (VA e VB) e da vinhaça produzida em laboratório (VC), aplicadas no Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos.	97
Tabela 4.4 - Concentrações totais dos Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) nos solos (LV, LVA) tratados com a maior concentração de cada vinhaça, e valores-limites de prevenção (VP) e intervenção agrícola em Área Agrícola de Proteção Máxima (VI - APM _{ax}) destes elementos nos solos, de acordo com CETESB (2014)..	98
Tabela 4.5 - Biomassa microbiana de carbono (BMC; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias após da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$).....	102
Tabela 4.6 - Respiração basal (C-CO ₂ ; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$).....	104
Tabela 4.7 - Quociente metabólico microbiano (q CO ₂ ; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$).....	105
Tabela 4.8 - Atividade da enzima desidrogenase (DHA; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$).....	106
Tabela 4.9 - Matriz de coeficientes (r) de correlação linear (Pearson) entre os atributos químicos/físicos e parâmetros microbianos do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após aplicação das concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC e controles. ...	107
Tabela 4.10 - Índices de riqueza (número de UTOs) diversidade (Shannon) e dominância, calculados a partir dos perfis de UTOs (médias entre as	

repetições) referentes às comunidades bacterianas do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após aplicação das concentrações C2 e C4, das vinhaças VA, VB e VC, independentemente do tempo de amostragem.110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µL	Microlitro
AC ₅₀	Concentração causadora de 50% de fuga
Al	Alumínio
As	Arsênio
APMax	Área agrícola de proteção máxima
ANOSIM	Análise de similaridade
ANOVA	Análise de variância
B	Boro
BMC	Biomassa microbiana de carbono
C-CO ₂	Carbono do dióxido de carbono
C:N	Relação carbono/nitrogênio
C1	Primeira concentração da vinhaça testada
C2	Segunda concentração da vinhaça testada
C3	Terceira concentração da vinhaça testada
C4	Quarta concentração da vinhaça testada
C5	Quinta concentração da vinhaça testada
C	Carbono
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
cm	Centímetro
Co	Cobalto
CO	Carbono orgânico
CO ₂	Dióxido de carbono
Cr	Cromo
CT	Carbono total
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de variação
CRA	Capacidade máxima de retenção de água
CTC	Capacidade de troca catiônica

d	Dia
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DHA	Desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DQO	Demanda química de oxigênio
EC ₂₀	Concentração de efeito em 20%
EC ₅₀	Concentração de efeito em 50%
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EC	European Community
EPT	Elemento potencialmente tóxico
Fe	Ferro
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
g	Grama
h	Hora
H + Al	Acidez potencial
Hg	Mercúrio
HP 14	Critério de ecotoxicidade para resíduos
HPA	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
ICP OES	Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado
ISO	International Standard Organization
K	Potássio
KC	Fator de transformação da biomassa microbiana
ks	Concentração de potássio no solo
kvi	Concentração de potássio na vinhaça
LOEC	Menor concentração testada com efeito observado
LV	Latossolo Vermelho
LVA	Latossolo Vermelho-Amarelo
m	Minuto
M	Mol
mL	Mililitro
mg	Miligrama
Mg	Magnésio

mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MO	Matéria orgânica
mol	Quantidade específica da substância
MOS	Matéria orgânica do solo
N	Nitrogênio
ng	Nanograma
Ni	Níquel
nm	Nanometro
NOEC	Maior concentração testada sem efeito observado
NT	Nitrogênio total
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
P	Fósforo
Pb	Chumbo
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
qCO ₂	Quociente metabólico do solo
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo
S	Enxofre
SAT	Solo Artificial Tropical
SMP	Shoemaker-McLean-Pratt
SD	Desvio padrão
T-RFLP	<i>Terminal restriction fragment length polymorphism</i>
TEA	Ácido-trietanolamina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TNT	Trinitrotolueno
TTC	Cloreto de trifetil tetrazólio
TTF	Trifenil tetrazólio formazan

U	Unidade
UTO	Unidade taxonômica operacional
V	Dose de vinhaça
VA	Vinhaça A
VB	Vinhaça B
VC	Vinhaça C
VI	Valor de intervenção
VP	Valor de prevenção
Zn	Zinco

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção do etanol derivado da cana-de-açúcar é uma das maiores do mundo. Este fato resulta da crescente demanda pelo uso deste produto na forma de biocombustível, entre outros fins. Como consequência desta intensa produção, bilhões de litros de vinhaça, um resíduo líquido, são gerados no país anualmente. Este efluente, que historicamente é conhecido por causar poluição em rios, já gerou sérios prejuízos para o meio ambiente. Por este motivo, têm sido propostos diversos tratamentos e usos alternativos para a vinhaça com o objetivo de minimizar seus impactos ambientais. Entre eles, destaca-se a fertirrigação de solos agrícolas, a qual pode ser considerada vantajosa em vários aspectos; pois, ao mesmo tempo em que é uma alternativa viável para o descarte de grandes volumes do efluente, este manejo devolve boa parte dos nutrientes extraídos do solo pela cultura, aumentando assim a produtividade da cana-de-açúcar. Além disso, o material orgânico presente na vinhaça também parece favorecer o crescimento e a atividade dos micro-organismos no solo, bem como há indicações de que o efluente pode melhorar algumas características físicas do sistema edáfico.

Por outro lado, sabe-se que, quando aplicada em excesso, a vinhaça pode causar saturação de sais, ou sua lixiviação entre outros prejuízos no solo. Neste sentido, o Estado de São Paulo, representado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), criou uma norma que estabelece critérios e procedimentos para disposição de vinhaça em solos agrícolas. Baseado principalmente nos teores de potássio na vinhaça e no solo. Este documento estabelece os limites máximos de aplicação do efluente em solos agrícolas, os quais têm o objetivo de proteger o solo contra efeitos negativos em suas características químicas. Entretanto, ainda que existam indícios de impactos sobre a fauna e microbiota edáfica, não existem critérios legais de proteção para estes organismos.

Uma vez que organismos do solo têm papel fundamental na ciclagem de nutrientes, estruturação do solo, entre outros diversos processos que mantêm o sistema ativo e sustentável, é necessário que os riscos ecotoxicológicos da fertirrigação de solos agrícolas com vinhaça sejam identificados. Deste modo, é possível derivar limites de aplicação que protejam tanto as propriedades químicas e físicas, quanto os organismos do solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura fundamental para o desenvolvimento econômico do Brasil, pois dela derivam o etanol, açúcar entre outros produtos, em menor escala. Este primeiro, também chamado de álcool, além de ser uma alternativa para a queima de combustíveis fósseis, é responsável por expressiva parte do produto interno bruto do país. Os interesses a respeito deste biocombustível vão além das fronteiras nacionais, uma vez que a busca por tecnologias energéticas de fontes renováveis e de menores impactos ambientais são de interesse mundial (PASQUALIN, 2009).

Com mais de 25 anos de história de utilização do etanol em larga escala, o Brasil desenvolveu tecnologia de motores e logística sem precedentes no mundo, com uma rede de mais de 28 mil postos com bombas de etanol hidratado (UNICA, 2011). Atualmente, é um dos maiores produtores mundiais de etanol, com produção de cerca de 23,64 bilhões de litros em 2013 (MME, 2014). Além disto, este é o único país a utilizar o etanol em larga escala como combustível de fonte renovável, alternativo ao petróleo.

2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

Uma das limitações ligadas ao aumento da produção nas usinas sucroalcooleiras é a grande quantidade de resíduos gerados no final do processo de fermentação e destilação do álcool. A vinhaça é o maior exemplo disto, visto que este resíduo líquido, derivado do processo de destilação do vinho, obtido após o processo de fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou melaço, é um dos mais volumosos resíduos da atividade produtiva de álcool e açúcar. Estima-se que para cada litro de álcool produzido são gerados 8 – 15 litros de vinhaça (FREIRE; CORTEZ, 2000; NAIK; JAGADEESH; ALAGAWADI, 2008). Se for levada em consideração a produção de etanol brasileira em 2013 (MME, 2014), e o volume médio mínimo de vinhaça produzido nas usinas (8 litros de vinhaça por litro de álcool), estima-se que são gerados mais de 200 bilhões de litros deste resíduo, anualmente, no país.

Este subproduto da destilação é de coloração marrom escura, natureza ácida e com cerca de 2 a 6% de constituintes sólidos, em que se destacam os teores de matéria orgânica. Normalmente, apresenta quantidade apreciável de potássio e valores médios de cálcio e magnésio. Entretanto, sua composição é bastante variável, dependendo, principalmente, da composição do vinho que, por sua vez, depende de fatores como a natureza e a composição da matéria-prima, sistema usado no preparo do mosto, método de fermentação adotado, tipo de aparelho destilatório, técnica de destilação, tipo de separador de flegma, entre outros (SILVA; ORLANDO FILHO, 1981; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

Quando descartado nos corpos hídricos, sem tratamento, este efluente pode ocasionar sérios problemas ambientais (SATYAWALI; BALAKRISHANAN, 2008). Entretanto, durante décadas a vinhaça foi descartada diretamente em mananciais superficiais, principalmente nos rios e ribeirões próximos das usinas destiladoras, onde dizimou boa parte da microbiota formadora do plâncton (ALMEIDA, 1952; FERREIRA, 2009). Sua força poluente, cerca de cem vezes superior à do esgoto doméstico, é decorrente da riqueza em matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e potássio e, portanto, os efeitos negativos da vinhaça em corpos hídricos ocorrem, em sua maioria, como consequências da desoxigenação das águas, devido às suas elevadas demandas química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Além disso, em sua composição podem estar presentes substâncias fitotóxicas, antibacterianas e compostos recalcitrantes, tais como fenóis, polifenóis, metais pesados, entre outras substâncias que podem ter efeitos negativos sobre os micro-organismos que habitam os locais de disposição (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

Desde o início do século XX (1910) há grande preocupação em conter a ação poluidora da vinhaça em corpos aquáticos (ALMEIDA, 1952), contudo, a proibição do descarte de vinhaça nos rios, lagoas e baixios foi determinada apenas em 1967, através do Decreto-Lei nº 303. Segundo Hassuda (1989), houve uma evolução na regulamentação da disposição da vinhaça no Brasil e, em 1988, foram criadas novas regras sobre a preservação dos depósitos naturais de águas subterrâneas (Lei nº 6.134) e o uso, conservação e preservação do solo agrícola (Lei nº 6.171). Atualmente, devido ao grande volume do efluente disposto no solo, o Estado de São Paulo têm sido pioneiro no uso de critérios e procedimentos para controle da

aplicação de vinhaça em áreas agrícolas, seguindo a Norma Técnica P4.231 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2006).

Uma vez que a vinhaça resiste à maioria dos tratamentos normalmente empregados a outros resíduos industriais, a pressão sobre produtores de álcool levou ao desenvolvimento de novos tratamentos e alternativas para o seu descarte de maneira sustentável (FERREIRA et al., 2011). Entre elas estão: a concentração do resíduo, adição na ração animal, fabricação de tijolos, vinhodutos marítimos, geração de biogás (biodigestão anaeróbica), reciclagem na fermentação, disposição em áreas de sacrifício (solos não cultiváveis), incineração, combustão, produção de leveduras e fertirrigação em solos agrícolas (GRANATO, 2003; LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011). Entre as diversas opções, o emprego na fertirrigação ainda é considerado a melhor forma de reduzir a poluição ambiental, uma vez que todo resíduo formado é devolvido à cultura, onde fertiliza solos agrícolas (OLIVEIRA et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2013) e impede que a vinhaça seja jogada nos rios (COPERSUCAR, 1978; LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011).

Entretanto, para realizar a disposição em solos agrícolas de maneira consciente, a norma técnica P4.231 (CETESB, 2006) determina que a dosagem de aplicação para o enriquecimento dos solos deve ser calculada considerando a capacidade de troca catiônica do solo, a concentração de potássio (no solo e vinhaça) e a extração média desse elemento pela cultura de cana, em cada ciclo. Estes critérios, principalmente baseados em características químicas dos solos e vinhaças, tem o objetivo de prevenir desequilíbrio de nutrientes, saturação de sais no solo e lixiviações para águas subterrâneas (RIBEIRO et al., 2010). Entretanto, estes critérios podem ainda proteger algumas propriedades físicas do solo, pois se sabe que a aplicação deste efluente também tem consequências sobre a estabilidade de agregados do solo, entre outros parâmetros, os quais estão ligados às altas concentrações de sais que causam dispersão de argila (FERREIRA; MONTEIRO, 1987; TEJADA et al., 2007; LEAL et al., 2009).

2.3 Uso de bioindicadores de qualidade do solo

Ainda que os critérios atualmente utilizados para a disposição de vinhaça em solos agrícolas sejam essenciais para garantir menores impactos sobre as propriedades químicas e físicas dos solos, a norma atuante não traz considerações

a respeito dos aspectos biológicos. Entretanto, sabe-se que em ecossistemas terrestres, os invertebrados e micro-organismos são os principais responsáveis pelos diversos processos biológicos e bioquímicos, subjacentes a diversos serviços do ecossistema, nomeadamente ao nível da regulação do ciclo de nutrientes e da regulação da qualidade da água, via processos de filtração. Estes organismos participam direta (micro-organismos) e indiretamente (invertebrados, devido à sua função na catalisação destes processos) dos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, por meio da decomposição da matéria orgânica. Estas transformações, principalmente a mineralização, têm fundamental importância para os sistemas agrícolas e florestais, pois a ciclagem dos elementos químicos tem o papel de suprir boa parte da demanda nutricional das plantas (CORTET et al., 1999; CULIK; ZEPPELINI, 2003).

Atualmente, os indicadores das propriedades químicas e físicas do solo têm sido alvo principal nos estudos de impactos antrópicos na natureza, pois por muito tempo considerou-se que as propriedades biológicas eram mais difíceis de prever ou até mesmo de medir. Segundo Parisi et al. (2005), grande parte dos estudos tradicionais com indicadores utilizam os parâmetros: matéria orgânica do solo (como indicador químico) e a estabilidade de agregados (como indicador físico), sendo menor o número de trabalhos que relacionam os indicadores biológicos à qualidade do solo. Entretanto, em alguns casos, os impactos de contaminantes no solo são mais facilmente identificados pelos efeitos observados sobre a biota do que em resultados baseados em análises químicas físicas e químicas (EVERTS et al., 1989; KROGH, 1994). Tal fato é atribuído à maior sensibilidade dos processos biológicos a certas mudanças no solo, as quais fornecem sinalizações precoces de riscos no ecossistema terrestre (PANKHURST; GUPTA, 1997).

Por meio do uso de bioindicadores de qualidade é possível reduzir as incertezas do risco ecológico da vinhaça em solos agrícolas. Na União Europeia, a aplicação de resíduos no solo deve ser realizada de acordo com as regulações previstas na Diretiva 2008/98/EC (EC, 2008), as quais classificam estes materiais de acordo com 15 propriedades de periculosidade, incluindo um critério para o risco ecotoxicológico (H14 – “ecotoxic”). Este critério é utilizado para identificar resíduos que representam ou podem representar riscos imediatos ou retardados para um ou vários setores do ambiente. Segundo Méhu, Bazin e Grelier-Volatie (2004), este critério pode ser determinante para decidir a periculosidade de mais de 80% dos

resíduos. No Brasil, embora não existam legislações específicas para as aplicações de resíduos no solo, existem resoluções (ex. CONAMA nº 420/09) que estabelecem valores de referência de qualidade para a presença de metais, entre outras substâncias no solo (CONAMA, 2009; CETESB, 2014). Entretanto, estes valores são baseados apenas em resultados de análises químicas, ensaios toxicológicos (risco à saúde humana) ou em ensaios ecotoxicológicos realizados em Países de clima temperado (como ocorre para os valores orientadores holandeses, que estão na base dos Valores de Prevenção brasileiros). Portanto, existe uma carência geral da utilização de bioindicadores da qualidade do solo na derivação de valores de referência para os solos tropicais.

2.4 Ecotoxicologia

O primeiro conceito de ecotoxicologia foi criado em 1969 por R. Truhaut, que a definiu como: “ciência que descreve os efeitos tóxicos de vários agentes químicos em organismos vivos, especialmente sobre as populações e comunidades nos ecossistemas” (TRUHAUT, 1977). A essência desta “jovem” ciência se baseia na ecologia e na toxicologia, porém, deve ser tratada como multidisciplinar; unindo ainda a química, farmacologia e epidemiologia, com a compreensão das origens e destinos dos produtos químicos no ambiente e suas interações com os organismos vivos (CONNELL et al., 1999). Atualmente, o conceito que se utiliza é o de que: por meio de estudos e testes ecotoxicológicos torna-se possível a identificação e avaliação das interferências causadas pelas substâncias introduzidas no meio ambiente pela atividade humana sobre os organismos vivos (MARKERT; BREURE; ZECHMEISTER, 2003). Este conceito pode ainda ser expandido para o de “ciência que prevê os efeitos de agentes potencialmente tóxicos sobre os ecossistemas naturais e organismos não alvo” (HOFFMAN et al., 2003).

Historicamente, a ecotoxicologia foi desenvolvida, primeiro, para os ecossistemas aquáticos e mais tarde para os terrestres. Durante a evolução dos estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos, foram criados métodos padronizados e bioensaios com invertebrados, peixes e algas, nos quais uma grande base de dados de toxicidade foi criada para os organismos deste ambiente (VAN STRAALLEN, 2002). Já no ecossistema terrestre, apesar das essenciais funções dos invertebrados no solo e sua utilidade como bioindicadores dos

distúrbios ecológicos serem reconhecidas há muito tempo (SCHUURMANN; MARKERT, 1997), até 1995 havia apenas dois métodos disponíveis para a avaliação do risco de contaminantes sobre biota terrestre: um para a fauna do solo; que é o teste com minhocas em solo artificial (OECD, 1984a), e outro que utiliza plantas (OECD, 1984b). A seguir, um conjunto de novas metodologias foi desenvolvido e a base de dados de testes ecotoxicológicos terrestres cresceu consideravelmente (LØKKE; VAN GESTEL, 1998; GOMEZ-EYLES et al., 2009). Contudo, o número de testes padronizados disponíveis para o meio terrestre (principalmente com a fauna do solo) ainda é menor do que aqueles existentes para o meio aquático (VAN STRAALLEN, 2002; CARDOSO; ALVES, 2012; VAN GESTEL, 2012). No Brasil, o desenvolvimento dos estudos ecotoxicológicos tem a mesma tendência da evolução mundial, visto que há vários anos têm-se utilizado testes de ecotoxicidade com organismos aquáticos, enquanto que, para a fauna terrestre, os estudos tiveram maior expressão apenas após a criação de um Solo Artificial Tropical por pesquisadores brasileiros, em conjunto com grupos internacionais (GARCIA, 2004; JÄNSCH; GARCIA; RÖMBKE, 2005; RÖMBKE et al., 2005, CHELINHO et al., 2011, 2012; NIEMEYER et al., 2010, 2012a, b; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012; BUCH et al., 2013; ALVES et al., 2013, 2014).

2.4.1 Avaliações sobre a fauna do solo

A maior parte dos ensaios ecotoxicológicos com organismos da fauna do solo é baseada nas respostas de letalidade, reprodução, crescimento e comportamento, após exposição a solos contaminados. Partindo das etapas mais básicas da avaliação do risco ecológico de contaminantes no solo, os ensaios ecotoxicológicos laboratoriais podem ser considerados uma das principais ferramentas da análise de risco, pois através deles são definidas as futuras etapas de um esquema de avaliações de risco ou, em muitos casos, por si só já são suficientes para a tomada de decisão sobre o risco associado a determinadas substâncias (CARDOSO; ALVES, 2012). Estes ensaios têm por objetivo expor espécies representantes da fauna do solo a concentrações crescentes de contaminantes e avaliar os impactos de maneira individual (espécie única), ou em conjunto (multi-especies). No solo, as minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e os ácaros predadores são os principais organismos utilizados para os ensaios ecotoxicológicos. Esta escolha, realizada com

base na relevância ecológica, facilidade de manutenção em laboratório e no curto tempo de geração destas espécies, facilita a padronização de espécies para o uso comum em ensaios laboratoriais, o que consequentemente também favorece a comparação dos resultados (RONDAY; HOUX, 1996; FOUNTAIN; HOPKIN, 2005). Além disso, ressalta-se que o uso de várias espécies (mesmo que testadas individualmente) aumenta a relevância ecológica da análise laboratorial, uma vez que cada organismo responde de maneira diferente aos poluentes e, portanto, os valores de risco podem variar (VAN GESTEL, 2012).

Por outro lado, nos casos onde se pretende simular com maior precisão as interações entre os contaminantes, espécies e as propriedades dos solos, é possível aumentar a complexidade dos ensaios utilizando estratégias de semi-campo (micro e mesocosmos) ou em nível de campo, dependendo do nível de incerteza sobre o risco ecológico obtido nas etapas anteriores (RÖMBKE; BAUER; MARSCHNER, 1996).

Poucos estudos relacionam os impactos da vinhaça de cana-de-açúcar sobre os organismos da fauna do solo (PEDROSA et al., 2005; CAIXETA et al., 2011; MATOS et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; CHRISTOFOLETTI; ESCHER; FONTANETTI, 2013), entretanto, sabe-se que o risco ecotoxicológico de resíduos tem sido cada vez mais questionado pelos órgãos ambientais e, portanto, o número de estudos neste segmento tem aumentado (ALVARENGA et al., 2007; ROSA et al., 2007; MOSER; RÖMBKE, 2009; NATAL-DA-LUZ et al., 2011). Estas são evidências de que o uso de organismos da fauna pode potencializar a identificação da poluição em solos tratados resíduos (WILKE et al., 2008).

2.4.2 Avaliações sobre a microbiota do solo

As avaliações sobre a microbiota, embora sejam consagradas na bioindicação da qualidade do solo (BANDICK; DICK, 1999; BADIANE et al., 2001; LAGOMARSINO et al., 2009), fornecem informações atuais e complementares às análises químicas (e às biológicas com a macro e mesofauna), pois expressam a sensibilidade dos micro-organismos às alterações no ambiente por meio de respostas rápidas e que podem ser comparadas em diferentes cenários agrícolas (LIU et al., 2007). Os testes de toxicidade microbiana em solos podem ser rápidos, simples e baratos, além de demandar pequenas amostras de solo (BLAISE, 1991).

As respostas dos micro-organismos aos contaminantes podem ser observadas através de respostas sobre a biomassa microbiana, letalidade, taxa de crescimento, influências sobre as simbioses (ex. fungos micorrízicos), mudanças na diversidade genética e funcional das comunidades microbianas do solo, além das interferências nas atividades de degradação e metabolismo de energia, por meio de enzimas específicas relacionadas aos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre no solo (KAPANEN; ITÄVAARA, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; IPSILANTIS et al., 2009; RASTOGI; SANI, 2011).

A atividade e biomassa microbiana é um importante bioindicador das alterações na decomposição de resíduos orgânicos (MATTANA; ORTIZ; ALCANIZ, 2010), ciclagem e solubilização de nutrientes, degradação de compostos xenobióticos e outros poluentes, entre outras funções. Por estas razões, tem sido apontada como componente importante na manutenção da qualidade do solo e da produtividade das plantas (NOGUEIRA et al., 2006; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA; 2010). A atividade catalizadora de diversas enzimas (ex. desidrogenase, urease, asparaginase, celulase, protease, β -glicosidase, arilsulfatase, fosfatase, entre outras) na dinâmica dos ciclos biogeoquímicos também pode representar os níveis metabólicos da comunidade microbiana do solo após intervenções antrópicas, como é o caso da aplicação de resíduos no solo. Estas enzimas podem ser encontradas livres no solo, como exoenzimas excretadas por micro-organismos, ligadas às estruturas celulares ou internamente nas células, quando são liberadas após a morte e lise celular (BADIANE et al., 2001). Assim, atuam como estratificadores ecológicos quando a comunidade microbiana do solo tem suas atividades enzimáticas afetadas pela presença de compostos poluentes (BANDICK; DICK, 1999; NAYAK; BABU; ADHYA, 2007; GARBISU; ALKORTA; EPELDE, 2011).

A atividade da enzima desidrogenase, muito utilizada em pesquisas sobre a atividade microbiana, traz respostas sobre o metabolismo oxidativo nos solos e, portanto, indica a atividade microbiana total do sistema (sistema redox microbiano e atividades oxidativas; TREVORS, 1984). Uma série de estudos sobre os impactos ambientais causados por diferentes tipos de contaminantes (ex. petróleo, pesticidas, metais e resíduos industriais) demonstra que atividade da enzima desidrogenase pode ser inibida nos solos contendo substâncias tóxicas para os micro-organismos (WOLIŃSKA; STĘPNIEWSKA, 2012).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são micro-organismos simbiontes obrigatórios que vivem em associação com a grande maioria das espécies de plantas superiores proporcionando, principalmente, o aumento da oferta de P para as plantas, em troca de fotossimilados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entretanto, também é reconhecido o seu papel na atenuação das toxicidades de resíduos industriais sobre as plantas colonizadas (CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2003; MEIER et al., 2011; BRITO et al., 2014), bem como os parâmetros: taxa de colonização das raízes, número esporos e diversidade de espécies, têm sido empregados como bioindicadores de solos contaminados (IPSILANTIS et al., 2009; HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012; WU et al., 2014).

As mudanças observadas sobre os perfis genéticos (ex. DNA e RNA) das comunidades microbianas dos solos, embora sejam eminentemente empregadas em estudos ecológicos e de biogeografia ambiental, também podem ser utilizadas como indicadoras das perturbações provocadas por poluentes nos solos. Este tipo de análise permite verificar se a aplicação de resíduos potencialmente poluentes no solo interfere na composição das espécies das comunidades microbianas do solo e, inclusivamente, identificar os grupos funcionais mais afetados (RASTOGI; SANI, 2011). Deste modo, é possível tirar conclusões sobre os serviços do ecossistema que estão sendo afetados na presença dos resíduos. O número de ensaios ecotoxicológicos que utilizam este tipo de abordagem para determinar o risco ecológico dos resíduos sobre os micro-organismos do solo tem aumentado nos últimos anos (TATTI et al., 2012; BROSZAT et al., 2014; KIM et al., 2014; MATTANA et al., 2014; SHAH et al., 2014; SILES et al., 2014).

2.8 Justificativa

Uma vez que grandes volumes de vinhaça de cana-de-açúcar têm sido aplicados em solos agrícolas, justificados principalmente pelos aumentos promovidos na produtividade da cultura da cana, há necessidade de se avaliar os possíveis impactos deste tipo de efluente sobre os organismos do solo, de modo a proteger os serviços por eles prestados neste ecossistema. As informações a respeito das consequências deste tipo de efluente na fauna e nos micro-organismos do solo são insuficientes para determinar o risco ecológico deste manejo no solo. Neste sentido, este estudo buscou avaliar os efeitos de vinhaças de cana-de-açúcar

sobre diferentes espécies da fauna e parâmetros microbianos do solo, de modo a identificar limites seguros de aplicação destes efluentes nos solos.

2.6 Objetivos gerais

Verificar se a fertirrigação de solos agrícolas com vinhaça de cana-de-açúcar causa impactos em organismos da macro e mesofauna do solo, bem como sobre os micro-organismos do solo.

2.7 Objetivos específicos

1. Verificar os impactos da aplicação no solo de três vinhaças de diferentes origens e em concentrações crescentes sobre a reprodução de minhocas, enquitreídeos, ácaros e colêmbolos, bem como sobre o comportamento de minhocas e colêmbolos, em testes ecotoxicológicos laboratoriais, em dois tipos de solos naturais e em solo artificial.
2. Avaliar a influência das três vinhaças sobre os parâmetros microbianos relacionados ao crescimento e metabolismo, bem como as influências dos efluentes na colonização de raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares e na estrutura da comunidade de bactérias do solo, em dois tipos de solos naturais.

Referências

- ALMEIDA, J.R. **O problema da vinhaça em São Paulo**, Piracicaba, 1952. p. 1-21. (Boletim Técnico COPERSUCAR, 3).
- ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONÇALVES, A.P.; FERNANDES, R.M.; CUNHA-QUEDA, A.C.; DUARTE, E.; VALLINI, G. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. **Environment International**, New York, v. 33, p. 505–513, 2007.
- ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; MARTINES, A.M.; SOUSA, J.P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 90, p. 2674–2682, 2013.
- _____. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 105, p. 65–71, 2014.
- BADIANE, N.N.Y.; CHOTTE, J.L.; PATE, E.; MASSE, D.; ROULAND, C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 18, p. 229-238, 2001.
- BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.31, p. 1472-1479, 1999.
- BLAISE, C. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 6, p. 145-155, 1991.
- BRITO, I.; CARVALHO, M.; ALHO, L.; GOSS, M.J. Managing arbuscular mycorrhizal fungi for bioprotection: Mn toxicity. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 68, p. 78–84, 2014.
- BROSZAT, M.; NACKE, H.; BLASI, R.; SIEBE, C.; HUEBNER, J.; DANIEL, R.; GROHMANN, E. Wastewater irrigation increases the abundance of potentially harmful gammaproteobacteria in soils in Mezquital Valley, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, V. 80, p. 5282-5291, 2014.
- BUCH, A.C.; BROWN, G.G.; NIVA, C.C.; SAUTTER, K.D.; SOUSA, J.P. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 69, p. 32–38, 2013.
- CAIXETA, L.B.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; BARROS, P.A.; ROLIM, M.M. Changes in soil and nematode community after sugarcane harvest and vinasse application. **Nematropica**, Bradenton, v. 41, p. 271-280, 2011.
- CARDOSO, E.J.B.N., NAVARRO, R.B., NOGUEIRA, M.A. Changes in manganese uptake and translocation by mycorrhizal soybean under increasing Mn doses. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, MG, v. 27, p. 415-423, 2003.

CARDOSO, E.J.B.N.; ALVES, P.R.L. Soil Ecotoxicology. In: Dr. Ghousia Begum (Ed.). **Ecotoxicology**. Rijeka: InTech - Open Access Publisher, 2012. cap. 2, p. 27-50.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB.
Norma técnica P4.231: Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola., São Paulo, 2006. 12 p.

_____. Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, v.124, n. 36, p. 53, 2014.

CHELINHO, S.; SAUTTER, K.D.; CACHADA, A.; ABRANTES, I.; BROWN, G.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J.P. Carbofuran effects in soil nematode communities: using trait and taxonomic based approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 74, p. 2002-2012, 2011.

CHELINHO, S.; LOPES, I.; NATAL-DA-LUZ, T.; DOMENE, X.; NUNES, M.E.T.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 31, p. 437- 445, 2012.

CHRISTOFOLETTI, 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.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, n. 1523, p. 1-14, 2013.

CONNELL, D.W.; LAM, P.; RICHARDSON, B.; WU, R. **Introduction to Ecotoxicology**: An introduction to electronic and ionic materials. Hoboken, New Jersey: Blackwell Publishing, 1999. v.4. 170p.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução 420: Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30, Dez. 2009. nº 249, p. 81-84.

COPERSUCAR. Aproveitamento da vinhaça: viabilidade técnico-econômica. **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, 1978. p.1-66.

CORTET, J; GOMOT-DE VAUFLERY, A.; POINSOT-BALAGUER, N.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 35, p. 115-134, 1999.

CULIK, M.P.; ZEPPELINI, D. Diversity and distribution of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 12, p. 1119-1143, 2003.

EUROPEAN COMMUNITY - EC. Directive 2008/98/EC: Directive of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. **Official Journal of the European Union**, Brussels, n. 312, p. 3-30, 2008.

ESPAÑA-GAMBOA, E; MIJANGOS-CORTES, J; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, London, v. 2, p.1235-1250, 2011.

EVERTS, J.W.; AUKEMA, B., HENGVELD, R.; KOEMAN, J.H. Side-effects of pesticides on ground-dwelling predatory arthropods in arable ecosystems. **Environmental Pollution**, Barking, v. 59, p. 203-225, 1989.

FERREIRA, E.S.; MONTEIRO, A.O. Efeitos da aplicação da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. **Boletim Técnico Copersucar**, v. 37, p. 3-7, 1987.

FERREIRA, L.F.R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. 2009. 134p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; LOPEZ, A.M. Q.; SILVA, D.P.; Monteiro, R.T. Evaluation of sugarcane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 74, p. 132-137, 2011.

FOUNTAIN, M.T.; HOPKIN, S.P. *Folsomia candida* (Collembola): A "Standard" Soil Arthropod. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 50, p. 201–222, 2005.

FREIRE, W.J; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

GARBISU, C.; ALKORTA, I.; EPELDE, L. Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 1-4, 2011.

GARCIA, M.V.B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283p. Ph.D. Thesis - University of Bonn. Bonn: Germany, 2004.

GOMEZ-EYLES, J.L.; SVENDSEN, C.; LISTER, L.; MARTIN, H.; HODSON, M.E.; SPURGEON, D.J. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.72, p. 71–79, 2009.

GRANATO, E.F. **Geração de energia através da biodigestão anaeróbica da vinhaça**. 2003. 124p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Faculdade de Engenharia da UNESP, Bauru, 2003.

HASSUDA, S. **Impactos da infiltração da vinhaça de cana no aquífero de Bauru**. 1989. 163p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, H.A.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ZAVALA-MANCERA, H.A.; LÓPEZ-DELGADO, H.A.; MENDOZA-LÓPEZ, M.R. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 95 Suppl., S319–324, 2012.

HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS J. **Handbook of Ecotoxicology**. Dordrecht, v. 2. London, UK: Blackwell Scientific Publications, 2003. 1290p.

IPSILANTIS, I.; KARPOUZAS, D.G.; PAPADOPOULOU, K.K.; EHALIOTIS, C. Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 2466-2476, 2009.

JÄNSCH, S.; GARCIA, M.V.B.; RÖMBKE, J. Acute and chronic isopod testing using tropical *Porcellionides pruinosus* and three model pesticides. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 41, p. 143-152, 2005.

KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 49, p. 1-16, 2001.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 42, p. 1-13, 2010.

KIM, J.; JUNG, H.; LEE, C. Shifts in bacterial and archaeal community structures during the batch bimethanation of *Ulva* biomass under mesophilic conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 169, p.502–509, 2014.

KROGH, P.H. **Microarthropods as bioindicators. A study of disturbed populations**. 1994. 143p. PhD thesis - University of Aarhus. Aarhus, Denmark. 1994.

LAGOMARSINO, A.; MOSCATELLI, M.; DITIZIO, A.; MANCINELLI, R.; GREGO, S.; MARINARI, S. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 9, p. 518-527, 2009.

LAIME, E.M.; FERNANDES, P.D.O.; SOUZA, D.C.D. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, p. 16-29, 2011.

LEAL, R.M.P.; HERPIN, U.; FONSECA, A.F.; FIRME, L.P.; MONTES, C.R.; MELFI, A.J. Sodicity and salinity in a Brazilian Oxisol cultivated with sugarcane irrigated with wastewater. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 96, p. 307–316, 2009.

LIU, W.; XU, W.; HAN, Y.; WANG, C.; WAN, S. Responses of microbial biomass and respiration of soil of topography, burning, and nitrogen fertilization in a temperate steppe. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 259-268, 2007.

LØKKE, H.; VAN GESTEL, C.A.M. **Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests**. Chichester, UK: John Wiley, 1998. 304p.

MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. **Bioindicators & Biomonitoring**: Principles, Concepts and Applications. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. v. 6. Ann Arbor, Michigan: Elsevier Science,, 2003. 997p.

MATOS, D.S.S.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; RODRIGUES, C.V.M.A.; BARBOSA, N.M.R. Relations between nematode communities and chemical attributes of soil with vinasse. **Nematropica**, Bradenton, v. 41, p. 23-38, 2011.

MATTANA, S.; ORTIZ, O.; ALCÁÑIZ, J.M. Substrate-Induced Respiration of a Sandy Soil Treated with Different Types of Organic Waste. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 41, p. 408-423, 2010.

MATTANA, S.; PETROVIČOVÁ, B.; LANDI, L.; GELSOMINO, A.; CORTÉS, P.; ORTIZ, O.; RENELLA, G. Sewage sludge processing determines its impact on soil microbial community structure and function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 75, p. 150-161, 2014.

MÉHU, J.; BAZIN, C.; GRELLIER-VOLATIER, L. Classification réglementaire et éocompatibilité des déchets. **Techniques de l'ingénieur**, Paris, no. G 2-030, p. 1-10, 2004.

MEIER, S.; AZCÓN, R.; CARTES, P.; BORIE, F.; CORNEJO, P. Alleviation of Cu toxicity in *Oenothera picensis* by copper-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 48, p.117–124, 2011.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. Etanol - produção e consumo. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**, Nº 72, 2014. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>>. Acesso em: 11, Set. 2014.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOSER, H.; RÖMBKE, J. **Ecotoxicological characterization of waste**: Results and experiences of an international ring test. New York, USA: Springer, 2009. 308p.

NAIK, N.M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spentwash: a review. **Indian Journal of Microbiology**, New York, v.48, p.41–48, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; OJEDA, G.; PRATAS, J.; VAN GESTEL, C.A.M.; SOUSA, J.P. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 74, p.1715-1720, 2011.

NAYAK, D.R.; BABU, Y.J.; ADHYA, T.K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aerobic Endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 1897-1906, 2007.

NIEMEYER, J.C.; MOREIRA-SANTOS, M.; RIBEIRO, R.; DA SILVA, E.M.; SOUSA, J.P. Environmental risk assessment of a metal contaminated area in the Tropics. Tier I: screening phase. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 10, p. 1557-1571, 2010.

NIEMEYER, J.C.; BORTOTI, G.; CARVALHO, G.M.; DA SILVA, E.M.; SOUSA, J.P.; NOGUEIRA, M.A. Microbial indicators of soil health as tools for ecological risk assessment of a metal contaminated site in Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 96-105, 2012a.

NIEMEYER, J.C.; NOGUEIRA, M.A.; CARVALHO, G.M.; COHIN-DE-PINHO, S.J.; OUTEIRO, E.S.; RODRIGUES, G.G.; DA SILVA, E.M.; SOUSA, J.P. Functional and structural parameters to assess the ecological status of a metal contaminated area in the tropics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 86, p. 188-197, 2012b.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JÚNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M. F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPIO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J. M.; RAIMAN, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 115, p. 237-247, 2006.

NUNES, M.E.T.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 21, p. 1063–1071, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guideline for Testing of Chemicals No. 207**: Earthworm Acute Toxicity Test. Paris, 1984a. 9p.

_____. **Guideline for Testing of Chemicals No. 208**: Terrestrial Plants, Growth Test. Paris, 1984b. 11p.

OLIVEIRA, E.L.D.; ANDRADE, L.A.D.B.; FARIA, M.A.D.; EVANGELISTA, A.W.P.; MORAIS, A.R.D. Uso de vinhaça de alambique e nitrogênio em cana-de-açúcar irrigada e não irrigada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1398-1403, 2009.

PANKHURST, C.D.B.M.; GUPTA, V.V.S.R. **Biological Indicators of Soil Health**. Cambridge: CAB International, 1997. 451p.

PARISI, V.; MENTA, C.; GARDI, C.; JACOMINI, C.; MOZZANICA, E. Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: a new approach in Italy. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 105, p. 323-333, 2005.

PASQUALIN, L.A. **Influência da vinhaça e do método de colheita sobre a macrofauna edáfica na cultura da cana-de-açúcar**. 2009. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; ALBUQUERQUE, P.H.S.; CUNHA, A.C. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, p. 197-201, 2005.

RASTOGI, G; SANI, R.K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and Microbial Technology**: Agricultural and Environmental Applications. New York: Springer, 2011, chap. 2, p. 29-57.

RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.D.; ROBERTO, L.; GUILHERME, G.; GUSTAVO, L.; JULIÃO, F. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 67, p. 441-447, 2010.

RÖMBKE, J.; BAUER, C.; MARSCHNER, A. Hazard assessment of chemicals in soil. Proposed ecotoxicological test strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 3, p. 78-82, 1996.

RÖMBKE, J.; FÖRSTER, B.; JAENSCH, S.; SCHEFFCZYK, A.; GARCIA, M.V.B. Terrestrische ökotoxikologische testmethoden für die tropen. Teil 1: Labortests mit Regenwürmern und Arthropoden. **Environmental Sciences Europe**, Heidelberg, v. 17, p. 20-27, 2005.

RONDAY, R.; HOUX, N.W.H. Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. **Pedobiologia**, Jena, v. 40, p.106-112, 1996.

ROSA, E.V.C.; GIURADELLI, T.M.; CORRÊA, A.X.R.; RÖRIG, L.R.; SCHWINGEL, P.R.; RESGALLA, C.; RADETSKI, C.M. Ecotoxicological evaluation of the short term effects and stabilized textile sludges before application in forest soil restoration. **Environmental Pollution**, Barking, v. 146, p. 463–469, 2007.

SHAH, V.; JONES, J.; DICKMAN, J.; GREENMAN, S. Response of soil bacterial community to metal nanoparticles in biosolids. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 274, p. 399–403, 2014.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 86, p. 481–497, 2008.

SILES, J.A.; RACHID, C.T.C.C.; SAMPEDRO, I.; GARCÍA-ROMERA, I.; TIEDJE, J. M. Microbial diversity of a Mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. **PloS One**, San Francisco, v. 9, p. 1-13, 2014.

SCHUURMANN, G., MARKERT, B. **Ecotoxicology**: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects. New York: J. Wiley, 1997. 900p.

SILVA, G.N.; ORLANDO FILHO, J. Concentração da Composição Química dos Diferentes Tipos de Vinhaça do Brasil. **Boletim Técnico PLANALSUCAR**, v. 8, p. 5-22, 1981.

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. 62, p. 108-114, 2007.

TATTI, E.; DECOROSI, F.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L. Despite long-term compost amendment seasonal changes are main drivers of soil fungal and bacterial population dynamics in a Tuscan vineyard. **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 29, p. 506–519, 2012.

TEJADA, M.; MORENO, J.L.; HERNANDEZ, M.T.; GARCIA, C. Application of two beet vinasse forms in soil restoration: Effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 119, p. 289-298, 2007.

TREVORS, J.T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 16, p. 673–674, 1984.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 1, p. 151-173, 1977.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. Álcool combustível, o etanol. **Setor Sucroenergético**, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/FAQ/>>. Acesso em: 20 Ago. 2012.

VAN GESTEL, C.A.M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, Sofia, v. 176, p. 275-296, 2012.

VAN STRAALLEN, N.M. Assessment of soil contamination – a functional perspective. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13 p. 41–52, 2002.

WILKE, B.M.; RIEPERT, F.; KOCH, C.; KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 70, p. 283-293, 2008.

WOLIŃSKA, A.; STEPNIIEWSKA, Z. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment, In: Canuto R. A. (Ed.). **Dehydrogenases**. Rijeka: InTech, 2012. chap. 8, p. 196-276.

WU, S.-L.; CHEN, B.-D.; SUN, Y.-Q.; REN, B.-H.; ZHANG, X.; WANG, Y.-S. Chromium resistance of dandelion (*Taraxacum platyepidum* Diels.) and bermudagrass (*Cynodon dactylon* [Linn.] Pers.) is enhanced by arbuscular mycorrhiza in Cr(VI)-contaminated soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 33, p. 2105–2113, 2014.

3 EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE A FAUNA DO SOLO

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol de cana de açúcar, com produção estimada em 23,64 bilhões de litros em 2012/13. Entretanto, para cada 1 L de etanol produzido são gerados em média 13 L de vinhaça, e quase todo esse resíduo é aplicado em solos agrícolas na forma de fertirrigação. Neste estudo, o impacto da disposição de três vinhaças de cana-de-açúcar sobre os invertebrados padrão do solo foi avaliado através de ensaios ecotoxicológicos de fuga e de reprodução. Vários experimentos foram realizados, utilizando concentrações crescentes de duas vinhaças obtidas em diferentes usinas destiladoras (VA e VB), e de uma terceira vinhaça (VC), obtida a partir de uma produção laboratorial. Para caracterizar os efeitos das vinhaças sobre minhocas (*Eisenia andrei*), enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*), ácaros predadores (*Hypoaspis aculeifer*) e colêmbolos (*Folsomia candida*), os efluentes foram aplicados em dois Latossolos (LV e LVA) e em um Solo Artificial Tropical (SAT). Nos testes de fuga, as concentrações mais elevadas de VA e VB foram evitadas por *E. andrei* em todos os solos testados e por *F. candida* especialmente nos solos naturais (LV e LVA). No solo artificial (SAT), os colêmbolos evitaram apenas as maiores concentrações da vinhaça VB. A presença de VC em todos os solos testados não causou fuga nas minhocas, nem nos colêmbolos. Nos testes de reprodução, os números médios de juvenis de minhocas, enquitreídeos e colêmbolos foram reduzidos nas concentrações mais elevadas de VA e VB nos solos naturais. Em SAT, VB reduziu a reprodução de todas as quatro espécies, enquanto que a vinhaça VA somente afetou os oligoquetas *E. andrei* e *E. crypticus*. A vinhaça VC apenas reduziu o número de *E. andrei* e *E. crypticus* em SAT e LVA, respectivamente. A biomassa das minhocas foi reduzida apenas na maior concentração de VA em LV e SAT. Exceto para as concentrações mais elevadas de VB em SAT, as vinhaças não reduziram a reprodução dos ácaros. As vinhaças provenientes das usinas destilatórias (VA e VB) foram mais tóxicas do que a vinhaça produzida em laboratório (VC). As toxicidades das vinhaças também foram influenciadas pelo tipo de solo, embora este resultado tenha sido muito provavelmente ligado à via pela qual cada espécie é exposta aos contaminantes nos solos. As toxicidades das vinhaças foram atribuídas, principalmente, ao alto teor de sais, especialmente ao conteúdo de potássio nos efluentes. Estes resultados indicam que critérios de proteção para os invertebrados do solo devem ser considerados quando a vinhaça de cana-de-açúcar é aplicada sobre solos tropicais.

Palavras-chave: Invertebrados do solo; Oligochaeta; Solos Tropicais; Efluente

Abstract

Brazil is one of the world's largest producers of sugarcane-derived ethanol, and the estimated production in 2012/13 was 23.64 billion liters. However, an average of 13 L of vinasse is generated for each 1 L of ethanol produced, and almost all of this waste is applied to agricultural soils as ferti-irrigation. In this study, the impact of the disposal of three sugarcane vinasses on standard soil invertebrates was evaluated by using ecotoxicological avoidance and reproduction assays. Multiple experiments were run with increasing concentrations of two vinasses collected from different distillery plants (VA and VB), and a vinasse obtained from a laboratory production (VC). The vinasses were applied to two natural tropical Oxisols (LV and LVA) and a tropical artificial soil (TAS) to characterize their effects on earthworms (*Eisenia andrei*), enchytraeids (*Enchytraeus crypticus*), mites (*Hypoaspis aculeifer*) and collembolans (*Folsomia candida*). In the avoidance tests, higher concentrations of VA and VB were avoided by *E. andrei* in any of the tested soils and by *F. candida* especially in the natural soils. In the TAS, collembolans only avoided VB concentrations. The presence of VC in all of the tested soils did not cause avoidance behavior in the earthworms or collembolans. In the reproduction tests, the average numbers of juveniles of the earthworms, enchytraeids and collembolans were reduced in the higher concentrations of VA and VB in the natural soils. In the TAS, VB reduced the reproduction of all four species, whereas VA was only toxic to the oligochaetes *E. andrei* and *E. crypticus*. The vinasse VC only reduced the number of *E. andrei* in TAS and *E. crypticus* in LVA. The earthworm's biomass was reduced by the highest concentrations of VA in LV and TAS. Except for the highest concentration of VB in TAS, the vinasses did not reduce the reproduction of mites. In general, the vinasses from distillery plants (VA and VB) were more toxic than the vinasse produced in the laboratory (VC). The vinasses toxicities were also influenced by soil type, although this result was most likely because of the manner in which the organisms were exposed to contaminants in the soils. We attribute the toxicity of the vinasses to their high salt content, especially to the high potassium concentrations. These results indicate that a criterion to protect soil invertebrates must be considered when vinasse is disposed on tropical soils.

Keywords: Soil invertebrates; Oligochaeta; Tropical soil; Wastewater

3.1 Introdução

As buscas por tecnologias energéticas de fontes renováveis e de menor impacto ambiental, tal como a produção de biocombustíveis, são de grande interesse mundial. O Brasil é o único país a utilizar o etanol em larga escala como combustível de fonte renovável alternativo ao petróleo (LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011). Atualmente, o este país é o segundo maior produtor mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar, com produção de cerca de 23,64 bilhões de litros em 2013 (MME, 2014). Durante a produção deste biocombustível são gerados

grandes volumes de vinhaça: um resíduo líquido de coloração marrom escura, natureza ácida, com quantidades apreciáveis de matéria orgânica e potássio, valores médios de cálcio e magnésio, entre outros (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Estima-se que para cada litro de etanol produzido são gerados 8 – 15 litros de vinhaça (FREIRE; CORTEZ, 2000), os quais têm como principal destino a fertirrigação de solos agrícolas (LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Embora a fertirrigação com vinhaça de cana-de-açúcar tenha reconhecido papel no aumento da produtividade das culturas (como fonte de água e nutrientes para as plantas) e na melhoria de algumas propriedades do solo (OLIVEIRA et al., 2009; LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011; JIANG et al., 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2013), suas implicações ambientais têm sido motivo de preocupação, em virtude da presença de contaminantes (ex. metais pesados, compostos alcoólicos e fenólicos, substâncias antibióticas entre outros) neste tipo de resíduo (ALMEIDA, 1952; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Sabe-se que, se aplicada sem critérios, a vinhaça pode causar desequilíbrio de nutrientes e induzir saturação de sais no solo, ocasionando ainda problemas de lixiviação de íons para águas subterrâneas (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007; RIBEIRO et al., 2010). Além disso, alguns estudos indicam que o efluente também causa efeitos negativos nas na condutividade hidráulica e potencial redox do solo (LEAL et al., 1983; UYEDA et al., 2013). No Brasil, a Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) estabelece critérios e procedimentos para a aplicação de vinhaça de cana-de-açúcar em solos agrícolas. Com o principal objetivo de prevenir alterações nos parâmetros químicos do solo (ex. saturação de sais), esta norma determina que o volume máximo de aplicação de vinhaça deva ser calculado de acordo com a capacidade de troca catiônica (CTC) do solo em questão, considerando ainda as concentrações de potássio no solo e na vinhaça, e a quantidade de K_2O extraída pela cultura de cana-de-açúcar, por hectare, em cada ciclo da cultura (CETESB, 2006). Embora estes critérios sejam considerados suficientes para cumprir o objetivo da norma, eles não consideram o risco ecológico do efluente no solo, nomeadamente os efeitos da vinhaça sobre a fauna edáfica e serviços ecológicos relacionados.

O estabelecimento de estratégias para a aplicação dos resíduos sem comprometer a permanência de comunidades funcionalmente estáveis destes organismos no solo é de primordial importância, uma vez que a atividade dos

invertebrados do solo afeta infiltração de água e a estrutura do solo, e tem um papel crucial nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, por meio da fragmentação e decomposição da matéria orgânica e regulação da atividade microbiana (CORTET et al., 1999; BRUSSAARD et al., 2007; CARDOSO et al., 2013). Na União Europeia, o risco ecotoxicológico de resíduos deve ser avaliado de acordo com o critério H14 - "Ecotoxic", recentemente renomeado HP 14 (PANDARD; RÖMBKE, 2013), da Diretiva 2008/98/EC (EC, 2008; que substituiu a Diretiva 91/689/EEC; EC, 1991). Este critério recomenda o uso de ensaios ecotoxicológicos em laboratório com espécies padrão para avaliar o risco ecotoxicológico de resíduos no solo. Estes tipos de ensaios têm se destacado como ferramentas fundamentais na avaliação do risco potencial de resíduos para o ambiente, pois possibilitam avaliar a toxicidade de maneira integrada, levando em conta os efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos dos contaminantes presentes no resíduo. Além disso, os resultados obtidos em ensaios ecotoxicológicos resultam do efeito da fração biodisponível dos contaminantes nos resíduos e, portanto, complementam as análises químicas tradicionais (PANDARD et al., 2006; DOMENE et al., 2007; WILKE, et al., 2008; NATAL-DA-LUZ, et al., 2009a, b; MOSER; RÖMBKE, 2009; CESAR et al., 2014).

A toxicidade de vinhaça de cana-de-açúcar para organismos aquáticos é conhecida (CHRISTOFOLETTI et al., 2013), contudo, o número de estudos em ambientes terrestres, que avaliam o impacto destes resíduos em espécies da fauna do solo, ainda é limitado. Segundo Pasqualin et al., (2012), a fertirrigação com vinhaça pode favorecer a macrofauna do solo, entretanto, a presença de este efluente no solo é conhecida por suprimir certas espécies de nematoides (PEDROSA et al., 2005; CAIXETA et al., 2011; MATOS et al., 2011) e pode causar a morte de diplópodes (CHRISTOFOLETTI; ESCHER; FONTANETTI, 2013). Deste modo, para preencher parcialmente essa lacuna e contribuir para a avaliação do risco ecotoxicológico deste tipo de resíduo, o qual se estima que é aplicado em solos tropicais em volumes superiores a 200 de bilhões litros por ano (LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011; MME, 2014), este estudo teve como objetivo caracterizar o potencial ecotoxicológico da vinhaça de cana-de-açúcar para as espécies de invertebrados *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Folsomia candida*, comumente usadas em avaliações ecotoxicológicas. Vinhaças de diferentes origens foram avaliadas para determinar os seus efeitos sobre estas espécies, em diferentes tipos de solos tropicais.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Solos e vinhaças utilizados

Um Latossolo Vermelho (LV) com 33,6 % de argila, e um Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA) com 17,6 % de argila, coletados na camada de 0-20 cm dos solos de áreas de cultivo de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo, foram usados como solos testes nos ensaios ecotoxicológicos. As áreas de coleta estavam livres de aplicação de vinhaça de cana-de-açúcar por mais de 10 anos. Os solos foram secos ao ar e peneirados a 5 mm. Por fim, foram submetidos a um processo de desfauna (três ciclos de 48h de congelamento a -20°C e descongelamento à temperatura ambiente) para eliminar organismos da fauna originais dos solos (PESARO et al., 2003). Adicionalmente, foram realizados ensaios ecotoxicológicos em Solo Artificial Tropical (SAT; GARCIA, 2004). Este solo é uma adaptação do solo artificial OECD (OECD, 1984) e é frequentemente utilizado para testes ecotoxicológicos laboratoriais em análises de risco em regiões de clima tropical (RÖMBKE; GARCIA; SCHEFFCZYK, 2007; DE SILVA; VAN GESTEL, 2009; ALVES et al., 2013; 2014). O solo SAT é constituído por 70% de areia (com mais de 50% das partículas com tamanho entre 0,05 e 0,2 mm), 20% de caulim e 10% de fibra de casca de coco em pó. Quando necessário, foi também adicionado CaCO_3 à mistura de modo a obter um solo SAT com pH de 6 ± 0.5 .

A caracterização física e química dos solos naturais (LV e LVA) e artificial (SAT) foi feita através da medição de vários parâmetros em amostras de solo secas ao ar, seguindo as metodologias de Raij et al. (2001). Foram determinados os teores de P, Ca, Mg e K disponíveis, pelo método da resina trocadora de íons. O enxofre disponível no solo (S-SO_4) foi extraído em solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ e avaliado pelo método de turbidimetria. Os elementos Cu, Fe, Mn e Zn foram extraídos em dietilenotriaminopentacético ácido-trietanolamina (DTPA – TEA; pH 7,3), e o B extraído em água quente/micro-ondas. O Alumínio trocável foi determinado por titulometria (1 mol L^{-1}) e a acidez potencial ($\text{H} + \text{Al}$) pelo método tampão de Shoemaker-McLean-Pratt (SMP). O carbono orgânico (CO) foi determinado por colorimetria, via oxidação da matéria orgânica (MO), com $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e H_2SO_4 (RAIJ et al., 2001). Entretanto, para estimar um valor de MO do solo, multiplicou-se o teor de CO por 1,72. A capacidade máxima de retenção de

água dos solos (CRA) foi determinada de acordo com ISO (2012), e os valores de pH via solução de KCl a 1M (1:5, p/v). As frações de areia, silte e argila dos solos foram avaliadas pelo método da pipeta, o teor de argila determinado por densímetro de Bouyoucos, e os sedimentos pela diferença entre o total da amostra e os volumes estimados de areia e argila (DANE; TOPP, 2002).

Nos testes ecotoxicológicos foram utilizadas 3 vinhaças de cana-de-açúcar com diferentes origens. Duas vinhaças foram coletadas diretamente nos tanques de diferentes usinas destiladoras (VA e VB). Por medida de controle, uma terceira vinhaça (VC) foi produzida em escala laboratorial, sem a adição de aditivos (ex. compostos antibióticos), normalmente empregados durante o processo de fermentação e produção do álcool (COMPART et al., 2013). A caracterização física e química das vinhaças foi feita de acordo com os métodos descritos em Kiehl (1985), através da medição dos seguintes parâmetros: pH, densidade, condutividade elétrica (CE), conteúdo em matéria orgânica (perda por ignição a 550°C por 6h), concentrações de totais de K (K₂O), Ca, Mg, S, carbono (CT), N, P (P₂O₅), Cu, Mn, Zn, Fe e a relação C:N.

Os teores totais dos elementos potencialmente tóxicos (EPT): As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb e Zn, foram determinados nos solos e nas vinhaças. Para tal, realizaram-se extrações por meio de digestão ácida, assistida por forno micro-ondas (CEM MARS Xpress™). As metodologias EPA 3051A (0,5 g de solo + 9 mL HNO₃ + 3 mL HCl) e EPA 3015A (45 mL de vinhaça + 4 mL HNO₃ + 1 mL HCl) foram utilizadas para a digestão dos solos e das vinhaças, respectivamente (USEPA, 1998; 1999). As medições dos EPT nos extratos de solo/vinhaça foram realizadas pela técnica multielementar de espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Os limites de quantificação (LQ) foram de 0,01, 0,002, 0,005, 0,005, 0,002, 0,01, 0,005, 0,001, 0,01, 0,002 (mg L⁻¹) para As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb e Zn, respectivamente. A recuperação da extração com o método EPA 3051A foi verificada por meio da inclusão de amostras de solo certificadas (Montana Soil, NIST, SRM 2711).

3.2.2 Organismos avaliados e condições de criação

As espécies *Eisenia andrei* (Lumbricidae), *Echytraeus crypticus* (Enchytraeidae), *Hypoaspis aculeifer* (Laelapidae) e *Folsomia candida* (Isotomidae),

foram utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos laboratoriais. Estas espécies são frequentemente usadas em ensaios ecotoxicológicos de laboratório para avaliação do risco potencial de substâncias químicas no solo (NATAL-DA-LUZ et al., 2012; OWOJORI; WASZAK; RÖMBKE, 2014).

As minhocas *E. andrei* foram mantidas em culturas de laboratório em um substrato composto pela mistura de esterco de cavalo (previamente submetido ao mesmo processo de desfauna descrito para os solos), fibra da casca de coco em pó e areia fina numa proporção de 2:1:0,15 (p:p:p), respectivamente, conforme descrito em Alves et al. (2013). A cultura de *E. crypticus* foi mantida em placas de Petri contendo agar composto por uma mistura, na proporção de 1:1 (v:v), de uma solução dos sais de cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, água deionizada e uma solução constituída por bacto-agar (Oxoid, Agar No. 1). Ambas as soluções foram previamente autoclavadas a 121° C durante 30 minutos e, em seguida, armazenadas a 4° C. As placas de Petri com agar foram mantidas à temperatura ambiente durante pelo menos duas horas antes de serem utilizadas como substrato para culturas de enquitreídeos. Cerca de 50 mg de flocos de aveia, previamente granulados, foram oferecidas como alimento uma vez por semana. A cada dois meses, os organismos foram transferidos para um novo substrato.

Para a criação do ácaro *H. aculeifer* em laboratório, utilizaram-se recipientes de plástico (10,5 cm diâmetro e 3,5 cm altura) com o fundo coberto por uma mistura de carvão ativado e gesso na proporção de 1:9 (p:p). Simultaneamente, foram mantidos cultivos de *Tyrophagus putrescentiae* (cheese mites), os quais serviram de alimento (presa) para *H. aculeifer* (predador), duas vezes por semana, em pequenas quantidades (ponta de uma espátula). Os cheese mites foram alimentados com levedura de cerveja seca, semanalmente. A espécie *F. candida* foi cultivada em laboratório em caixas de plástico com o fundo coberto por uma mistura de carvão ativado e gesso na proporção de 1:11 (p:p), como descrito em Natal-da-Luz et al. (2009a).

Os recipientes de criação de ácaros foram mantidos a 20 ± 2 °C, e os demais a 24 ± 3 °C; todas as culturas foram mantidas em fotoperíodo de 12 h.

3.2.3 Testes ecotoxicológicos padronizados

3.2.3.1 Procedimentos experimentais

Foram realizados ensaios de fuga com minhocas e colêmbolos e testes de reprodução com as 4 espécies padrão. Para cada espécie foi testado um gradiente de concentrações de cada vinhaça (Tabela 3.1). As concentrações testadas foram definidas com base em ensaios preliminares. Além disso, os gradientes de concentração testados levaram em consideração valores limites de aplicação de vinhaça em solos agrícolas, calculados com base na Norma Técnica P4.231 (Tabela 3.1; CETESB, 2006), pela equação:

$$V = \frac{[(0,05 \times CTC - ks) \times 3744 + 185]}{kvi}$$

Onde: V é a dosagem máxima de vinhaça permitida no tratamento de solos agrícolas sob cultivo de cana-de-açúcar ($\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$, transformados para mL kg^{-1} , considerando a camada de 0-20 cm do perfil do solo); CTC é a capacidade de troca catiônica do solo ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$); ks e kvi se referem às concentrações de potássio no solo ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) e na vinhaça ($\text{kg de K}_2\text{O m}^{-3}$), respectivamente. Embora o cálculo recomendado pela norma utilize o teor de K presente nos primeiros 80 cm do perfil do solo (CETESB, 2006), neste estudo foi realizada uma adaptação na estimativa dos valores limites, de modo a considerar os valores de potássio dos primeiros 20 cm do perfil do solo, pois é a camada do solo onde se considera que exista maior atividade biológica.

Os gradientes testados foram preparados imediatamente antes do início de cada teste. Para cada concentração foi preparada uma mistura de vinhaça e água deionizada, na proporção adequada, de modo a ser obtida a concentração desejada de vinhaça no solo. As diferentes diluições das vinhaças foram adicionadas ao solo em volume necessário para que este atingisse 60 % da sua CRA. Assim, os volumes de aplicação para cada concentração variaram entre os solos ($\text{mL de vinhaça por quilograma de solo seco} - \text{mL kg}^{-1}$), dependendo da sua CRA.

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados a $24 \pm 3^\circ \text{C}$ e 12:12h luz:escuro (exceto os testes de fuga com minhocas, que foram realizados no escuro).

Adicionalmente, foi preparada uma réplica extra, sem organismos, de cada tratamento para cada teste a fim de permitir a medição da umidade e os valores de pH finais nos ensaios com enquitreídeos, colêmbolos e ácaros.

Tabela 3.1 - Concentrações de duas vinhaças provenientes de usinas destiladoras (VA e VB) e uma vinhaça produzida em laboratório (VC), utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos com as espécies *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Folsomia candida*, em dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em solo artificial tropical (SAT); os cálculos com base nos limites legais para a aplicação das vinhaças (V) em cada solo também estão incluídos. Os valores apresentados estão expressos em mL de vinhaça kg⁻¹ de solo seco

Espécie	Vinhaça	Solo	C1	C2	C3	C4	C5	Limites - V
<i>E. andrei</i> ; e <i>E. crypticus</i>	VA	LV	13	25	50	100	200	67
		LVA	8	15	30	60	120	56
		SAT	18	37	74	147	294	46
	VB	LV	13	25	50	100	200	74
		LVA	8	15	30	60	120	62
		SAT	18	37	74	147	294	51
	VC	LV	13	25	50	100	200	184
		LVA	8	15	30	60	120	154
		SAT	18	37	74	147	294	126
<i>H. aculeifer</i>	VA	LV	19	34	62	111	200	67
		LVA	11	21	37	67	120	56
		SAT	28	50	91	163	294	46
	VB	LV	19	34	62	111	200	74
		LVA	11	21	37	67	120	62
		SAT	28	50	91	163	294	51
	VC	LV	19	34	62	111	200	184
		LVA	11	21	37	67	120	154
		SAT	28	50	91	163	294	126
<i>F. candida</i>	VA	LV	6	13	25	50	100	67
		LVA	4	8	15	30	60	56
		SAT	9	18	37	74	147	46
	VB	LV	2	3	6	13	25	74
		LVA	1	2	4	8	15	62
		SAT	5	9	18	37	74	51
	VC	LV	6	13	25	50	100	184
		LVA	8	15	30	60	120	154
		SAT	18	37	74	147	294	126

V - Valores calculados com base em CETESB (2006), para os primeiros 20 cm do perfil do solo

3.2.3.2 Testes de fuga com *Eisenia andrei*

Os ensaios de fuga com *E. andrei* foram realizados de acordo com o protocolo da ISO:17512-1 (ISO, 2008a). As réplicas consistiram em caixas plásticas retangulares (23,3 cm de comprimento, 16,7 cm de largura, 7,7 cm de altura), divididas em dois compartimentos iguais, por meio de um anteparo plástico introduzido verticalmente. Em um dos compartimentos, adicionaram-se 900 g de solo (peso fresco de LV, LVA ou SAT) tratado com vinhaça (Tabela 3.1) e no outro a mesma quantia do respectivo solo controle. Foram usadas cinco repetições por cada combinação. Dez espécimes adultos de *E. andrei* (com clitelo desenvolvido) foram inseridas sobre a linha de separação dos dois compartimentos, depois de remover o anteparo de plástico. Os recipientes foram então fechados com tampas perfuradas para permitir a circulação de ar. Os animais não foram alimentados durante o teste e, após 48 h, o número de indivíduos presentes em cada compartimento foi registrado. Também se realizou um duplo controle, em que o solo controle foi inserido em ambos os compartimentos da caixa, para verificar se na ausência de contaminante era encontrada uma distribuição aleatória dos organismos ao longo dos dois compartimentos.

3.2.3.3 Testes de fuga com *Folsomia candida*

Foram realizados testes de fuga com a espécie *F. candida* seguindo os procedimentos descritos no protocolo ISO:17512-2 (ISO, 2008b). Seguiu-se o mesmo princípio dos testes de fuga com minhocas. No caso dos colêmbolos os recipientes consistiram em caixas de plástico circulares (9 cm de diâmetro e 6 cm de altura) com 30 g de solo (peso de LV, LVA ou SAT fresco) em cada compartimento (contaminado ou controle). Tal como para as minhocas, foram testadas combinações entre os solos tratados com vinhaça (Tabela 3.1) e os respectivos controles. Cinco repetições foram utilizadas para cada combinação. Após a adição dos solos nos compartimentos, o anteparo de plástico foi removido e foram introduzidos 20 colêmbolos com 10 a 12 dias de idade (provenientes de culturas sincronizadas) sobre a linha de separação entre os dois lados. Os recipientes foram fechados com tampas transparentes perfuradas. Os animais não foram alimentados durante o teste. Ao fim de 48h, o conteúdo de cada compartimento foi transferido

cuidadosamente para outro recipiente o qual foi submerso em água e foram adicionadas algumas gotas de tinta azul para aumentar o contraste entre a superfície da água e os colêmbolos que flutuaram. Em seguida, o número de indivíduos presente em cada compartimento foi contabilizado. Tal como para as minhocas, adicionalmente foram realizados duplos-controles para todos os solos testados.

3.2.3.4 Testes de reprodução com *Eisenia andrei*

Os ensaios de reprodução com *E. andrei* seguiram os procedimentos descritos na ISO:11268-2 (ISO, 2012). Foram utilizados recipientes de plástico circulares (12,5 cm de diâmetro e 9,5 cm de altura) nos quais se adicionaram 500 g dos solos (peso de LV, LVA e SAT seco) tratados com cinco concentrações das três vinhaças (Tabela 3.1), ou o respectivo solo controle. Minhocas adultas (com clitelo aparente) foram previamente incubadas em solo controle durante 24 h e 10 indivíduos foram selecionados, lavados com água, pesados e inseridos em cada unidade experimental. Cada indivíduo tinha em média $343,8 \pm 32,1$ mg (média $\pm$ desvio padrão; $n = 2100$) de massa corporal fresca. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas e as minhocas alimentadas com esterco de cavalo (≈ 5 g por réplica), semanalmente. Utilizaram-se quatro réplicas por concentração e o ensaio teve duração total de 56 d. Após 28 d do início dos ensaios, as minhocas adultas foram removidas, lavadas com água e pesadas. A percentagem de biomassa corporal final (após 28 d), em relação ao peso inicial, foi calculada. Após 56 d, os recipientes foram colocados em banho Maria a 60 ± 5 °C por 1h para forçar o deslocamento dos juvenis para a superfície do solo, possibilitando assim a sua contagem.

3.2.3.5 Testes de reprodução com *Enchytraeus crypticus*

Os ensaios de reprodução com *E. crypticus* foram baseados no protocolo ISO:16387 (ISO, 2004). Dez indivíduos clitelados e de tamanho semelhante foram inseridos em recipientes cilíndricos de vidro (9 cm diâmetro e 6 cm altura) contendo 20 g dos solos (peso de LV, LVA ou SAT seco) tratados com as vinhaças (Tabela 3.1), ou do respectivo controle. Flocos de aveia finamente moídos foram fornecidos

como alimento (≈ 2 mg por réplica) e os recipientes foram fechados hermeticamente. Semanalmente, os frascos foram abertos, de modo a permitir trocas gasosas e, sempre que necessário, foi realizada a reposição do alimento e da umidade do solo (nas réplicas em que a perda de peso foi superior a 2%). Utilizaram-se quatro réplicas para cada concentração de vinhaça e oito réplicas para os controles. Após 28 dias, o número total de enquitreídeos foi contado sob microscópio estereoscópico, após fixação em etanol 80%, coloração com Rosa Bengala (1% em etanol) e peneiramento úmido dos organismos, como descrito por Chelinho et al. (2014).

3.2.3.6 Testes de reprodução com *Hypoaspis aculeifer*

Os efeitos das vinhaças sobre a reprodução de *H. aculeifer* foram avaliados com base nos procedimentos da norma OECD:226 (OECD, 2008). Em cada recipiente (9 cm de diâmetro e 6 cm de altura) contendo 20 g de solo (peso de LV, LVA ou SAT fresco), tratados com vinhaças (Tabela 3.1) ou solo controle, foram introduzidas dez fêmeas com idades entre 28 e 35 d (provenientes de culturas sincronizadas). Os animais receberam pequenas quantidades (uma ponta de espátula) de alimento (*cheese mites*), no início do teste e duas vezes por semana, durante os ensaios. Semanalmente, os recipientes de fechamento hermético foram abertos para arejamento e ajuste da umidade do solo (quando a perda de peso foi superior a 2%). Os ensaios contaram com quatro réplicas por concentração de cada vinhaça e oito réplicas para os controles. Após 14 dias do início, os ácaros foram extraídos do solo por meio de um extrator MacFadyen utilizando um ciclo crescente de temperaturas, durante 48 h (12h a 25°C, 12h a 35°C e 24h a 45°C). Os adultos e juvenis recém-gerados em cada réplica foram fixados em etanol 70% e contados sob microscópio estereoscópico.

3.2.3.7 Testes de reprodução com *Folsomia candida*

Os ensaios de reprodução com colêmbolos seguiram os métodos descritos na norma ISO:11267 (ISO, 1999). Foram utilizados recipientes cilíndricos de vidro (3,5 cm de diâmetro e 11,5 cm de altura), os quais foram preenchidos com 30 g dos solos (peso de LV, LVA ou SAT fresco) tratados com vinhaças (Tabela 3.1), ou solo

controle. A seguir, dez colêmbolos adultos, com idades entre 10 - 12 d (provenientes de culturas sincronizadas), foram introduzidos em cada unidade experimental e os recipientes foram fechados hermeticamente. No início, e após 14 d, foi fornecida levedura granulada seca (≈ 2 mg por réplica) como alimento. Semanalmente, os recipientes foram abertos para permitir trocas gasosas. Utilizaram-se cinco réplicas por tratamento. Após 28 d, o solo de cada réplica foi submerso em água para forçar a flutuação dos sobreviventes. Foram adicionadas algumas gotas de tinta azul para aumentar o contraste e assim facilitar a contagem dos juvenis. As réplicas foram fotografadas, como descrito por Alves et al. (2014), e o número de *F. candida* juvenis gerados foi contabilizado nas imagens digitais, por meio de um software computacional (UTHSCSA Image Tool 3.0).

3.2.4 Análise de dados

Correlações lineares entre as concentrações de vinhaças e o pH do solo foram testadas utilizando o r de Pearson ($p \leq 0,01$).

Nos ensaios de fuga, a significância das respostas de fuga (valores positivos) foi testada por meio do *Fisher's exact test*, utilizando o teste de duas caudas para o duplo controle, e o teste de uma cauda para as combinações com solos contaminados com vinhaça (ZAR, 1999). Além disso, os valores de AC_{50} (concentração que causa 50 % de fuga) foram estimados por meio do software PriProbit[®] 1.63 (SAKUMA, 1998).

A significância das respostas médias sobre alterações na biomassa corporal das minhocas e número de juvenis das minhocas, enquitreídeos, ácaros e colêmbolos, gerados em solos tratados com vinhaça, foi testada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Quando detectadas diferenças ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas com seus respectivos controles pelo teste post-hoc de Dunnett, utilizando o pacote de software R[®] (versão 2.5.1.). A partir destes resultados, foram determinados os valores de NOEC (maior concentração testada sem efeito observado) e LOEC (menor concentração testada com efeito observado) dos ensaios de toxicidade crônica. Os valores de EC_{20} e EC_{50} (concentrações que reduzem reprodução dos organismos em 20 e 50 % em relação ao controle, respectivamente) foram estimados por meio de regressões não lineares, utilizando os modelos: Exponencial, Logístico, Gompertz ou Hormesis

(ENVIROMENT CANADA, 2007), no software Statistica 7.0[®]. Nas ANOVAs, a normalidade e a homogeneidade dos resultados foram testadas antes da análise estatística através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente.

3.3 Resultados

3.3.1 Análises químicas e físicas

Entre os três solos, o artificial (SAT) apresentou os maiores valores de pH, MO, saturação por bases (V%), P, S e K. O solo LV apresentou teor de MO, V% e CTC superiores e pH menor, comparado ao solo LVA. A textura mais arenosa e o maior teor em Fe e Al foram encontrados no solo LVA (Tabela 3.2).

Entre as vinhaças provindas das usinas destilatórias (VA e VB), destacam-se diferenças no teor de MO/CT, relação C:N e teores de P, S, Mg e Fe (Tabela 3.2). A vinhaça produzida em laboratório (VC) apresentou menores teores de MO/CT, S e K, em relação às demais. A concentração dos demais macro e micronutrientes foi similar em todas as vinhaças (Tabela 3.2).

Com excessão para o Cu, em que os teores do elemento no solo LV foram naturalmente superiores ao VP (ANEXO A; CETESB, 2014), os teores dos EPT nas concentrações mais altas de cada vinhaça, somados aos níveis de EPT dos solos, estiveram abaixo do VP para solos agrícolas (Tabela 3.3). Observou-se ainda que a contribuição dos solos foi muito maior do que a das vinhaças para o aumento dos teores dos EPT na soma (ANEXO A; Tabela 3.3).

A vinhaça aumentou o pH do solo, existindo forte correlação linear positiva entre as concentrações e os valores de pH do solo ($r = 0,901$; $p < 0,01$). Os valores médios mais elevados de pH do solo foram vistos em SAT (6,28; 6,82; 5,68), seguidos por LVA (5,83; 6,07; 5,83) e LV (5,65; 5,85; 5,58), na presença da concentração de C5 de VA, VB e VC (Tabela 3.1), respectivamente. Exceto para a maior concentração de VB em SAT, todos os valores máximos de pH do solo estiveram na faixa adequada para os organismos ($6 \pm 0,5$), conforme indicado pelas normas padrão.

Tabela 3.2 - Caracterização física e química dos solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e do solo artificial tropical (SAT), bem como das vinhaças (VA, VB e VC), utilizados nos ensaios ecotoxicológicos laboratoriais

Parâmetro	Solo			Vinhaça		
	LV	LVA	SAT	VA	VB	VC
pH (1M KCl)	4,4 ± 0,1	4,9 ± 0,4	6,02 ± 0,49	4,6	4,9	5,2
MO (g dm ⁻³)	25	18	75	28,03	17,39	13,74
CT (g dm ⁻³)	-	-	-	15,57	9,66	7,63
NT (g dm ⁻³)	-	-	-	0,56	0,74	0,35
Relação C:N	-	-	-	28	13	22
P (mg dm ⁻³)	15	12	16	420	100	90
S (mg dm ⁻³)	10	5	18	2000	1000	<4
K (mg dm ⁻³)	52	80	720	9200	8300	3350
Ca (mg dm ⁻³)	560	340	550	980	1270	650
Mg (mg dm ⁻³)	120	84	90	1000	480	520
Al (mg dm ⁻³)	<9	9	<9	-	-	-
H+Al (mmol _c dm ⁻³)	25	28	8	-	-	-
B (mg dm ⁻³)	0,13	0,14	0,2	-	-	-
Cu (mg dm ⁻³)	0,8	1	<0,4	1	1	1
Fe (mg dm ⁻³)	55	116	2,5	8	33	28
Mn (mg dm ⁻³)	15,4	4,3	3,1	2	7	4
Zn (mg dm ⁻³)	4,9	2,4	0,95	1	1	1
CTC (mmol _c dm ⁻³)	63,9	54,3	58,5	-	-	-
V%	61	49	86	-	-	-
Areia (g kg ⁻¹)	502	800	725	-	-	-
Silte (g kg ⁻¹)	172	24	38	-	-	-
Argila (g kg ⁻¹)	326	176	237	-	-	-
Densidade (g cm ⁻³)	-	-	-	0,95	0,87	0,96
CRA (%)	33	20	49	-	-	-
CE (mS cm ⁻¹)	-	-	-	20,7	20,18	10,63
Etanol (%)	-	-	-	0,23	0	0,02

- Parâmetro não foi determinado no solo/vinhaça

Tabela 3.3 - Concentrações totais dos Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) nos solos (LV, LVA e SAT) tratados com a maior concentração de cada vinhaça, e valores-limites de prevenção (VP) e intervenção agrícola em Área Agrícola de Proteção Máxima (VI - APM_{Max}) destes elementos nos solos, de acordo com CETESB (2014)

EPT (mg kg ⁻¹)	LV ^{C5}			LVA ^{C5}			SAT ^{C5}			Limites Legais ^a	
	VA	VB	VC	VA	VB	VC	VA	VB	VC	VP	VI - APM _{Max}
As	0,011	0,002	<0,01	0,007	0,001	<0,01	0,016	0,003	<0,01	15	35
Cd	1,025	1,025	1,025	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	1,3	3,6
Co	8,446	8,434	8,428	1,562	1,555	1,552	0,031	0,013	0,005	25	35
Cr	51,657	51,664	51,664	18,629	18,633	18,633	6,185	6,195	6,196	75	150
Cu	75,938	76,066	75,917	13,038	13,114	13,025	4,343	4,530	4,312	60	760
Hg	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,5	1,2
Mo	0,004	0,005	0,003	0,002	0,003	0,002	0,006	0,007	0,004	5	11
Ni	11,584	11,588	11,584	3,855	3,858	3,856	1,338	1,344	1,339	30	190
Pb	14,555	14,556	14,553	4,578	4,578	4,577	8,057	8,058	8,054	72	150
Zn	43,054	42,994	43,017	15,312	15,277	15,290	3,728	3,640	3,674	86	1900

^{C5} - Indica a concentração mais elevada testada em LV, LVA e SAT (200, 120 e 294 mL kg⁻¹ de solo seco, respectivamente)

3.3.2 Testes de fuga

Nos ensaios de fuga com minhocas, a mortalidade foi inferior a 10%, e a distribuição média de indivíduos nas seções dos duplos-controles se manteve entre 40-60% (ISO, 2008a). Também não foram observadas diferenças no teste de controle duplo, baseado no “*Fischer’s exact test*”. Assim, os critérios de validade foram cumpridos. Os solos naturais (LV e LVA) foram evitados pelas minhocas apenas nas mais altas concentrações de VA e VB testadas (Figura 3.1). A partir de 37 mL kg⁻¹ da vinhaça VA e de 74 mL kg⁻¹ da vinhaça VB em solo artificial (SAT), houve fuga das minhocas. A presença de VC não provocou nenhum comportamento de fuga nos oligoquetas nos solos testados (Figura 3.1). O valor mais baixo de AC₅₀ estimado foi nos ensaios com tratamentos da vinhaça VA em solo SAT (AC₅₀ = 56,72 mL kg⁻¹; Tabela 3.4).

O número de indivíduos mortos/desaparecidos nas réplicas do ensaio de fuga com colêmbolos foi <20% em todas as combinações testadas e houve distribuição média de 40-60% dos organismos em cada compartimento do recipiente nos duplos-controles (ISO, 2008b). Também não houve diferença no teste de controle duplo, de acordo com o *Fischer’s exact test*. Portanto, os ensaios cumpriram os critérios de validade. Os colêmbolos evitaram os solos naturais (LV e LVA) contendo as concentrações mais altas de VA e VB e, em SAT, houve fuga significativa apenas na concentração mais alta de VB (Figura 3.2). As concentrações de VC não provocaram comportamento de fuga por parte dos colêmbolos em nenhum dos solos testados (Figura 3.2). Os tratamentos da vinhaça VB em solo LVA geraram o valor de AC₅₀ mais baixo entre os testados (AC₅₀ = 14,7 mL kg⁻¹; Tabela 3.4).

Figura 3.1 - Comportamento de fuga de *E. andrei* em dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 48h. Os valores estão expressos em média de percentagem de fuga $[(N. \text{ no controle} - N. \text{ no tratamento}) / (N. \text{ total da réplica}) \times 100] \pm$ desvio padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam fuga significativa das minhocas dos solos contaminados (*Fisher's exact test*, $p \leq 0.05$)

Figura 3.2 - Comportamento de fuga de *F. candida* em dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 48h. Os valores estão expressos em média de percentagem de fuga $[(N. \text{ no controle} - N. \text{ no tratamento}) / (N. \text{ total da réplica}) \times 100] \pm \text{desvio padrão}$ ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam fuga significativa dos colêmbolos dos solos contaminados (*Fisher's exact test*, $p \leq 0.05$)

3.3.3 Testes de reprodução

Nos ensaios de reprodução com *E. andrei* e *E. crypticus*, as mortalidades médias nos solos controles foram inferiores a 10 e 20 %, respectivamente. Além disto, o número de juvenis gerados por réplica foi sempre ≥ 30 (minhocas) e ≥ 25 (enquitreídeos) indivíduos. Os coeficientes de variação (CV) nos controles dos ensaios de *E. andrei* e *E. crypticus* foram ≤ 30 e $\leq 50\%$, respectivamente. Foram assim cumpridos todos os critérios de validade recomendados pela ISO (ISO, 2004; 2012).

Reduções sobre a massa corporal dos adultos sobreviventes de *E. andrei* foram observadas apenas na presença das maiores concentrações de VA em solo LV e SAT (LOEC = 200 e 294 mL kg⁻¹, respectivamente; Tabela 3.4). Com exceção da vinhaça VC nos solos LV e LVA, as concentrações mais altas das vinhaças afetaram a reprodução das minhocas *E. andrei* em todos os solos testados (Tabela 3.4). A toxicidade sobre a espécie variou de acordo com a origem (vinhaças provenientes de usinas foram mais tóxicas) e concentração das vinhaças (foi observada relação dose-resposta), bem como com o tipo de solo (Figura 3.3, primeira linha de gráficos). Em todos os solos, as vinhaças VA e VB foram mais tóxicas (menores valores de EC₅₀ e EC₂₀) do que a vinhaça VC (Tabela 3.4). Além disso, independentemente da amostra de vinhaça, a intensidade dos efeitos sobre a reprodução das minhocas foi maior no SAT, seguida dos solos LVA e LV.

A reprodução dos enquitreídeos *E. crypticus* foi reduzida em todos os solos pelas maiores concentrações das vinhaças VA e VB (Figura 3.3, segunda linha de gráficos). Estas vinhaças provenientes de usinas de destilação provocaram maior toxicidade do que a vinhaça VC, que não teve toxicidade sobre a espécie em SAT. Para esta espécie, o solo onde as vinhaças foram mais tóxicas foi o LVA, seguido do solo LV e SAT (Figura 3.3, segunda linha de gráficos e Tabela 3.4).

Os ensaios de reprodução com ácaros *H. aculeifer* cumpriram os critérios de validação (mortalidade de adultos < 20%; CV ≤ 30%; número de juvenis ≥ 50, por réplica do controle), estabelecidos pela norma OECD (OECD, 2008). Com exceção das maiores concentrações da vinhaça VB em SAT (LOEC = 163 e 294 mL kg⁻¹), nenhuma vinhaça causou impacto significativo sobre a reprodução dos ácaros nos solos testados (Figura 3.3, terceira linha de gráficos e Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), menor concentração testada com efeito observado (LOEC), e concentrações de efeito em 20% (EC₂₀) e 50% (AC₅₀, EC₅₀), calculadas com base nos resultados dos ensaios de fuga e reprodução com as espécies *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Folsomia candida*, expostas às concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em solo artificial tropical (SAT). Os valores estão expressos em mL de vinhaça kg⁻¹ de solo seco

(Continua)										
Espécie/ Teste	Parâmetro	Solo LV			Solo LVA			SAT		
		VA	VB	VC	VA	VB	VC	VA	VB	VC
<i>E. andrei</i>	NOEC	100	100	200	60	60	120	18,5	37	294
	LOEC	200	200	>200	120	120	>120	37	74	>294
	AC ₅₀	208,89a	201,17a	>200	129,14a	114,16	>120	56,72	121,81	>294
	Limites (95%)	(222-203)	(207-196)	(-)*	(134-125)	(117-111)	(-)*	(104-27)	(190-83)	(-)*
Fuga	NOEC	100	200	200	120	120	120	147	294	294
	LOEC	200	>200	>200	>120	>120	>120	294	>294	>294
	EC ₅₀	303,5a	>200	>200	>120	>120	>120	>294	>294	>294
	Limites (95%)	(320-287)	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*
	EC ₂₀	298,8a	>200	>200	>120	>120	>120	>294	>294	>294
	Limites (95%)	(324-273)	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*
Biomassa	NOEC	100	100	200	60	60	120	74	74	147
	LOEC	200	200	>200	120	120	>120	147	147	294
	EC ₅₀	150	186,77	>200	126,48a	119,96	>120	100,37	115,43	252,84
	Limites (95%)	(187-113)	(223-151)	(-)*	(150-118)	(122-118)	(-)*	(125-76)	(137-94)	(344-162)
	EC ₂₀	96,46	123,31	>200	96,68	90,07	>120	85,31	89,43	121,11
	Limites (95%)	(133-60)	(167-90)	(-)*	(113-80)	(113-67)	(-)*	(107-64)	(113-66)	(191-51)
Reprodução	NOEC	100	100	200	60	60	120	74	74	147
	LOEC	200	200	>200	120	120	>120	147	147	294
	EC ₅₀	150	186,77	>200	126,48a	119,96	>120	100,37	115,43	252,84
	Limites (95%)	(187-113)	(223-151)	(-)*	(150-118)	(122-118)	(-)*	(125-76)	(137-94)	(344-162)
	EC ₂₀	96,46	123,31	>200	96,68	90,07	>120	85,31	89,43	121,11
	Limites (95%)	(133-60)	(167-90)	(-)*	(113-80)	(113-67)	(-)*	(107-64)	(113-66)	(191-51)

Tabela 3.4 - Maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), menor concentração testada com efeito observado (LOEC), e concentrações de efeito em 20% (EC₂₀), 50% (AC₅₀, EC₅₀), calculadas com base nos resultados dos ensaios de fuga e reprodução com as espécies *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Folsomia candida*, expostas às concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos solos naturais (Latossolo Vermelho, LV, Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em solo artificial tropical (SAT). Os valores estão expressos em mL de vinhaça kg⁻¹ de solo seco

Espécie/ Teste	Parâmetro	(Conclusão)								
		Solo LV			Solo LVA			SAT		
		VA	VB	VC	VA	VB	VC	VA	VB	VC
<i>E. crypticus</i>	NOEC	50	50	100	15	7,5	30	74	74	294
	LOEC	100	100	200	30	15	60	147	147	>294
	Reprodução EC ₅₀	110,54	64,82	>200	40,44	14,59	63,12	199,02	>294	>294
	Limites (95%)	(144-77)	(84-46)	(-)*	(67-13)	(21-8)	(78-48)	(233-165)	(-)*	(-)*
	EC ₂₀	51,88	35,72	101,70	13,02	4,70	32,67	143,48	134,45	>294
	Limites (95%)	(83-20)	(56-15)	(149-54)	(22-4)	(7-3)	(48-18)	(177-110)	(253-15)	(-)*
<i>H. aculeifer</i>	NOEC	200	200	200	120	120	120	294	91	294
	LOEC	>200	>200	>200	>120	>120	>120	>294	163	>294
	Reprodução EC ₅₀	>200	>200	>200	>120	>120	>120	>294	237,70	>294
	Limites (95%)	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(312-164)	(-)*
	EC ₂₀	>200	>200	>200	>120	>120	>120	>294	123,20	>294
	Limites (95%)	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(185-61)	(-)*
<i>F. candida</i>	NOEC	50	12,5	100	30	7,5	120	147	37	294
	LOEC	100	25	>100	60	15	>120	>147	74	>294
	Fuga AC ₅₀	107,67a	25,94a	>100	63,41a	14,72	>120	>147	84,54a	>294
	Limites (95%)	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*
	NOEC	50	12,5	100	30	7,5	120	147	37	294
	LOEC	100	25	>100	>60	15	>120	>147	74	>294
	Reprodução EC ₅₀	63,57	20,64	>100	>60	>15	>120	>147	77,20	>294
	Limites (95%)	(78-50)	(27-14)	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(-)*	(102-52)	(-)*
	EC ₂₀	42,91	11,62	>100	29,75	10,45	>120	>147	39,38	>294
	Limites (95%)	(57-29)	(18-5)	(-)*	(40-19)	(23-2)	(-)*	(-)*	(64-15)	(-)*

* - Os dados obtidos não permitem o cálculo dos intervalos de confiança (superior e inferior) de 95%; a - Os valores estimados, acima da concentração máxima testada, foram mostrados de modo a destacar as diferenças entre as vinhaças das destilarias (VA e VB) e a produzida de laboratório (VC)

Figura 3.3 - Número de juvenis de *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus* e *Hypoaspis aculeifer* (média $\pm$ SD) nos dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 56, 28 e 14 dias, respectivamente. Asteriscos (*) indicam redução significativa do número de juvenis, quando comparado ao respectivo controle (one-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test - $p \leq 0.05$)

Os critérios de validação (mortalidade de adultos $< 20\%$; CV $\leq 30\%$; número de juvenis ≥ 100 , por réplica do controle) dos ensaios de reprodução com *F. candida* foram cumpridos de acordo com ISO (ISO, 1999). As vinhaças VA e VB reduziram a reprodução dos colêmbolos no solo natural LV (Figura 3.4). Entretanto, em LVA e em SAT, apenas VB teve impacto significativo sobre a reprodução da espécie. Além disso, VB apresentou menores valores de EC₅₀ e EC₂₀ (maior toxicidade para a espécie) entre as vinhaças testadas (Tabela 3.4). A vinhaça VC não causou nenhum

impacto significativo sobre a reprodução de *F. candida*, em nenhum dos solos testados (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Número de juvenis de *Folsomia candida* (média ± SD) nos dois solos naturais (Latossolo Vermelho, LV; Latossolo Vermelho-Amarelo, LVA) e em um solo artificial tropical (SAT), na presença de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, após 28 dias. Asteriscos (*) indicam redução significativa do número de juvenis, comparado ao controle (one-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test - $p \leq 0.05$)

3.4 Discussão

De um modo geral a toxicidade observada sobre a fauna variou de acordo com a amostra de vinhaça, tipo de solo e sensibilidade das espécies testadas (Tabela 3.4). As minhocas, enquitreídeos e colêmbolos tiveram a reprodução reduzida pelas vinhaças provenientes das usinas destilatórias (VA e VB), em todos os solos testados, exceto para *F. candida* em LVA e em SAT, onde apenas as

maiores concentrações da vinhaça VB alteraram a reprodução ($LOEC = 15$ e 74 mL kg^{-1} , respectivamente). Além disso, apenas VB em TAS foi tóxica para *H. aculeifer*. Por outro lado, a vinhaça produzida em laboratório (VC) apresentou a menor toxicidade entre as 3 vinhaças, em todos os testes, sendo significativamente tóxica apenas para reprodução das minhocas em SAT ($LOEC = 294 \text{ mL kg}^{-1}$) e enquitreídeos em LV e LVA ($LOEC = 200$ e 60 mL kg^{-1} , respectivamente). Portanto, como também observado através dos valores estimados de EC_{20} e EC_{50} , confirmou-se que as vinhaças das usinas destilatórias foram mais tóxicas do que a amostra preparada em laboratório (VC), independentemente do solo utilizado. Entre as vinhaças provenientes de usinas destilatórias (VA e VB), a vinhaça VB foi a que apresentou maior impacto, em grande parte dos ensaios. Estas diferenças foram observadas especialmente nos ensaios de fuga, com exceção para aqueles com *E. andrei* em SAT. Nos ensaios de reprodução, VB foi mais tóxica do que VA, em todos os solos, apenas para *F. candida*, enquanto que para *E. crypticus* esta diferença ocorreu apenas nos solos naturais (LV e LVA). Estes resultados também sugerem que a sensibilidade dos ensaios de fuga à toxicidade das vinhaças no solo foi similar à observada nos ensaios de reprodução com as mesmas espécies. Este fato corrobora o estudo de Hund-Rinke et al. (2003) que, ao avaliar o efeito de fuga das minhocas na presença de solos com diferentes níveis de contaminação (i.e. metais, óleo mineral, HPAs, TNT, entre outros), verificaram que este tipo de ensaio pode ter sensibilidade igual ou superior ao ensaio de reprodução com Oligochaetas. De acordo com Natal-da-Luz, Ribeiro e Sousa (2004), os ensaios de fuga com *E. andrei* e *F. candida* podem ser utilizados como uma triagem inicial nos esquemas de avaliação de risco de áreas contaminadas.

As diferenças de toxicidade entre vinhaças são atribuídas, principalmente, às distintas composições e à origem dos efluentes. As diferentes toxicidades observadas entre as vinhaças VA e VB são muito provavelmente devidas às distintas composições dos vinhos produzidos nas destilarias que, por sua vez, dependem da origem e composição da matéria-prima (SILVA; ORLANDO FILHO, 1981). Além disso, o sistema usado no preparo do mosto, método de fermentação, tipo de aparelho destilatório, técnica de destilação, tipo de separador de flegma, entre outros, são fatores que tornam a composição (ex. teores de metais/sais) das vinhaças das usinas destilatórias diferentes entre si (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

Christofolletti et al. (2013) descrevem que, em ambientes aquáticos e terrestres, a potencial ecotoxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar está relacionada à presença de compostos alcoólicos, altas concentrações de matéria orgânica, K, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu e metais pesados, tais como Cd, Cr, Ni, Pb. Kannan e Upreti (2008) também sugerem que a toxicidade da vinhaça no solo esteja relacionada à alta carga orgânica, presença de metais pesados e ao baixo pH do resíduo. Entretanto, neste estudo, os teores totais dos metais potencialmente tóxicos (As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb e Zn) presentes nos solos com as maiores concentrações testadas das vinhaças foram baixos (Tabela 3.3). Além disso, os teores de compostos alcoólicos nas vinhaças (etanol) também foram baixos (Tabela 3.2). Isto indica pouca ou nenhuma influência destes elementos/substâncias na toxicidade observada. Sabe-se também que, a presença de compostos antibióticos utilizados no processo de fermentação (COMPART et al., 2013), substâncias fitotóxicas, compostos recalcitrantes, tais como fenóis, polifenóis, entre outros, encontrados na vinhaça, podem contribuir para a toxicidade deste efluente sobre os micro-organismos e as plantas que habitam os locais de disposição (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Além disso, é conhecido que a adição de resíduos no solo é a principal fonte de nonilfenóis (SOARES et al., 2008), os quais são compostos orgânicos com impactos significativos na comunidade de invertebrados do solo (DOMENE; CHELINHO; SOUSA, 2010). Contudo, a presença destas substâncias não foi avaliada, nas vinhaças usadas no presente trabalho e, portanto, não é possível afirmar se a toxicidade observada foi provocada por elas. Sobretudo, é suposto que as reduções na reprodução das espécies, observadas em maior intensidade em solos contendo VA e VB, estejam relacionadas a compostos que estiveram em menores concentrações (ex. K e S; Tabela 3.2), ou ausentes (ex. compostos antibióticos) na amostra da vinhaça VC (menor toxicidade). Sabe-se que os cátions K e Na, provenientes de vinhaças de usinas destilatórias, são considerados elementos de risco ambiental para a biota aquática, uma vez que há relatos de sua toxicidade sobre espécies padrões em ensaios ecotoxicológicos deste ambiente (FREITAS; ROCHA, 2011). O excesso de K na hemolinfa pode interromper a função cardíaca e promover desordens celulares em invertebrados aquáticos (ROMANO; ZENG, 2007). Estes fatos sugerem que o K também possa ser um fator determinante na toxicidade observada sobre a fauna do solo. Além disso, a maior

toxicidade de VA e VB em relação aos solos tratados com VC pode também ser decorrente de efeitos de aditivos/sinérgicos de misturas de substâncias.

Efeitos de redução de biomassa corporal das minhocas adultas *E. andrei* só foram observados nas maiores concentrações da vinhaça VA, em LV e SAT (Tabela 3.4). Cesar et al. (2014) também observaram que altas doses de sedimentos dragados, aplicados em solos tropicais, reduziram a biomassa desta espécie. Entretanto, estes autores reportam que, em baixas doses do resíduo no solo, a biomassa das minhocas foi maior do que no solo controle, e atribuíram o aumento ao aporte de matéria orgânica do sedimento (19,1 %) no solo. Neste estudo, embora a vinhaça VA tenha apresentado um teor de MO relativamente alto (28,03 g dm⁻³; Tabela 3.2), este efluente não promoveu nenhum aumento de biomassa das minhocas, mesmo nas concentrações mais baixas, em todos os solos testados. Além disso, uma vez que a vinhaça VA foi, em geral, a mais tóxica (menores valores de ECs) sobre a reprodução de *E. andrei* (Tabela 3.4), é possível que os efeitos dos compostos tóxicos deste efluente tenham sido mais expressivos do que os benefícios da MO adicional. Alguns estudos indicam que as reduções sobre a biomassa corporal de minhocas em solos tratados com resíduos industriais (com alta carga orgânica) normalmente ocorrem na presença das altas concentrações do resíduo, quando os benefícios energéticos do material são superados pelos impactos do aumento da concentração de compostos tóxicos no solo. Caso contrário, o material orgânico energético resulta em aumento, ou pelo menos na manutenção da biomassa inicial (ROSA et al., 2007; NATAL-DA-LUZ et al., 2009b; MATOS-MOREIRA et al., 2012; CESAR et al., 2014).

A toxicidade das vinhaças nos diferentes solos variou de acordo com o organismo teste. Considerando os valores de LOEC, EC₅₀ ou EC₂₀ de todas as vinhaças, em todos os ensaios realizados no estudo (Tabela 3.4), a espécie *E. andrei* foi mais afetada pelas vinhaças em SAT e, em seguida, nos solos LVA e LV (ensaios de reprodução e testes de fuga). Por outro lado, as espécies *E. crypticus* e *F. candida* sofreram maiores impactos na presença das vinhaças (no caso dos colêmbolos em ambos os testes: fuga e reprodução) em solo LVA, seguido dos solos LV e SAT. Somente em SAT houve toxicidade para os ácaros (vinhaça VB). A influência dos diferentes solos na toxicidade das vinhaças está provavelmente ligada às vias de exposição dos organismos aos contaminantes nos solos. As espécies *E. andrei* e *E. crypticus* são organismos *soft-bodied* (PEIJNENBURG et al., 2012), e

têm como principais vias de exposição aos contaminantes a absorção direta pela pele (por meio do contato com a solução do solo) e através da ingestão de partículas do solo (especialmente as minhocas). Entretanto, considerando que os poluentes da vinhaça estão (pelo menos em parte) associados ao material orgânico do solo (MO), o qual em SAT foi três vezes superior ao teor nos demais solos (Tabela 3.2), era suposto que as minhocas fossem mais prejudicadas neste solo, pois estes oligoquetas, além da exposição ao contato, obtêm grandes quantidades dos contaminantes por meio da ingestão do solo. Além disso, é reconhecido que os enquitreídeos são extremamente sensíveis à acidez dos solos (AMORIM et al., 2005a; CHELINHO et al., 2014). Em alguns casos, a toxicidade para estes organismos pode ser mais influenciada pelos baixos valores de pH do solo do que pelas altas concentrações dos contaminantes (LUO; VERWEIJ; VAN GESTEL, 2014). Considerando que os solos LVA e LV possuem menores valores iniciais de pH do que o SAT (Tabela 3.2), isto pode ter aumentado a toxicidade das vinhaças sobre a espécie *E. crypticus* nos solos naturais.

A toxicidade sobre os ácaros e colêmbolos (organismos “hard-bodied”, que possuem um exoesqueleto e têm absorção de água através de órgãos especializados) é principalmente dependente da presença de contaminantes na solução do solo, devido às vias de absorção de água (PEIJNENBURG et al., 2012). Portanto, era suposto que a reprodução das espécies *H. aculeifer* e *F. candida* fosse mais afetada nos solos naturais, onde os menores teores de MO, em relação aos do SAT, implicariam uma maior disponibilidade das substâncias tóxicas em solução do solo. Contudo, provavelmente devido à menor sensibilidade dos ácaros, quando comparados com outros invertebrados do solo (HUGUIER et al., 2014), isto foi verificado apenas para a espécie *F. candida*. Domene et al. (2012) também observaram que a sobrevivência desta espécie de colêmbolos na presença do herbicida phenmedipham foi menor nos solos naturais do que em artificial (solo OECD), e atribuíram esta diferença aos conteúdos de matéria orgânica e silte dos solos. Além disto, outros estudos mostram que nos solos naturais os contaminantes apresentam maior toxicidade para *F. candida*, quando comparados ao solo artificial (PHILLIPS; KUPERMAN; CHECKAI, 2002; AMORIM et al., 2005b; CROUAU; TAN TCHIAM, 2006).

Considerando apenas os solos naturais, a toxicidade das vinhaças foi maior em LVA do que em LV. Para esta diferença de toxicidade poderá ter contribuído o

fato de o solo LVA possuir menores teores de argila, MO, e menor CTC do que LV (Tabela 3.2). A CTC pode ser considerada uma variável determinante na toxicidade nos solos (LOCK; JANSSEN, 2001), pois é uma medida relativa dos sítios de ligação entre os contaminantes (principalmente cátions metálicos e substâncias eletropositivas) e o solo. Em solos com menor CTC (como é o caso do LVA) existe menor capacidade de adsorção dos contaminantes e, conseqüentemente, maior disponibilidade das substâncias tóxicas na solução. Além disso, também é conhecido que os menores teores de MO (BELFROID; SIJM, 1998; ZHANG et al., 2010) e argila (CESAR et al., 2012; 2014) permitem que a toxicidade das substâncias seja evidenciada nos solos.

Embora todas as espécies tenham sido afetadas nos ensaios de toxicidade crônica, por pelo menos uma das combinações testadas (vinhaças vs solos), as sensibilidades dos organismos foram diferentes entre si, independentemente das amostras de vinhaças e solos. Segundo Van Gestel (2012), não há espécies que sejam sempre mais sensíveis em todas as situações e, portanto, as baterias de testes de toxicidade com várias espécies são necessárias para se estimar adequadamente o risco potencial de cada contaminante para o ecossistema terrestre. Neste sentido, diversos estudos são direcionados à seleção de bioindicadores para avaliar o risco específico dos contaminantes no solo (PANDARD et al., 2006; DAAM et al., 2011; KHAN et al., 2013).

E. crypticus e *F. candida* foram as únicas espécies em que a concentração de vinhaças estimada para um efeito de 20% na população (EC_{20}) foi menor do que as concentrações limites das vinhaças nos solos LVA e LV (ver valores limites na Tabela 3.1), calculadas com base nos limites legais estabelecidos pela CETESB (2006). Embora os demais organismos (*E. andrei* e *H. aculeifer*) também tenham sido afetados, na maior parte dos casos os efeitos foram observados em concentrações acima do limite permitido por lei (Tabelas 3.1 e 3.4). Portanto, é possível afirmar que os Valores Limites, estabelecidos com base na norma P4.231 da CETESB (2006), protegeram mais 80% por cento da população das espécies padrões de minhocas e ácaros, mas não evitaram que pelo menos 20% das populações das espécies de enquitreídeos e colêmbolos fossem consideravelmente afetadas pelas vinhaças de cana-de-açúcar nos solos tropicais testados. Christofolletti, Escher e Fontanetti, (2013) também observaram que a concentração máxima de vinhaça no solo, calculada de com base na mesma norma, pode causar

mortalidade em diplópodes e genotoxicidade em plantas. Além disso, tendo em conta a estratégia de Pandard e Römbke (2013) para a avaliação da propriedade HP 14 (ecotoxicidade dos resíduos), utilizando o princípio de $EC_{50} \leq 10\%$ (a percentagem de resíduos misturados com o substrato que resulta em 50% de inibição da reprodução é menor do que 10%), as vinhaças podem ser classificadas como perigosas, especialmente por causa dos efeitos observados sobre *E. crypticus* (EC_{50} : 1,46% a > 29,4%) e *F. candida* (EC_{50} : 2,06% a > 29,4%). Dado que os limites para a aplicação das vinhaças em solos agrícolas foram estabelecidos com objetivo de proteger os parâmetros químicos dos solos e, portanto, são baseados exclusivamente em análises químicas (CETESB, 2006), é compreensível que alguns parâmetros biológicos não estejam igualmente protegidos. Isto sugere que estes limites não são adequados para preservar todas as funcionalidades do solo como ecossistema (parâmetros químicos, físicos e biológicos). Considerando que o volume de efluente gerado pelas usinas destiladoras é extremamente elevado, e que seu principal destino são os solos agrícolas (CHRISTOFOLETTI et al., 2013), deve-se destacar a importância da adoção de critérios protetores para a fauna do solo e serviços do ecossistema relacionados.

Os efeitos prejudiciais da vinhaça têm sido reportados sobre certas espécies de nematoides e diplópodes (PEDROSA et al., 2005; CAIXETA et al., 2011; MATOS et al., 2011; CHRISTOFOLETTI; ESCHER; FONTANETTI, 2013). Entretanto, até onde chega o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se demonstram os efeitos da aplicação de vinhaça de cana-de-açúcar em solos tropicais sobre espécies padrões de minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e ácaros (representantes da macro e mesofauna do solo). Este estudo considerou os efeitos dos efluentes sobre as principais espécies padronizadas para ensaios ecotoxicológicos no solo, entretanto, é reconhecido que outros parâmetros também devem ser avaliados (ex. parâmetros microbiológicos e plantas) para derivar valores orientadores consistentes sobre o risco ecológico da vinhaça nos ecossistemas de solos tropicais.

3.5 Conclusões

1. A composição e os efeitos tóxicos das vinhaças sobre os indivíduos da macro e mesofauna do solo variaram de acordo com a sua origem. As vinhaças originadas nas usinas destilatórias comerciais mostraram-se mais tóxicas do que a vinhaça obtida no processo de destilação laboratorial.

2. Apenas as concentrações mais elevadas de VA e VB causaram a fuga de minhocas e colêmbolos e reduziram o número de juvenis de minhocas em solos naturais. A biomassa das minhocas foi reduzida apenas na presença da vinhaça VA.

3. Reduções na reprodução dos enquitreídeos e colêmbolos foram observadas em concentrações de VA e VB inferiores aos limites estimados.

4. Os ácaros predadores foram os organismos menos afetados na presença das vinhaças no solo.

5. A interação entre as diferentes vinhaças e os tipos de solo implicou em valores de toxicidade específicos para cada organismo.

Referências

ALMEIDA, J.R. O problema da vinhaça em São Paulo. **Boletim Técnico**, Piracicaba, 3, p.1-21, 1952.

ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; MARTINES, A.M.; SOUSA, J.P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 90, p. 2674–2682, 2013.

_____. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 105, p. 65–71, 2014.

AMORIM, M.J.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SOARES, A.M.V.M. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide phenmedipham. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, p. 1102–1114, 2005a.

AMORIM, M.J.B.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYL, A.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. Effects of different soil types on the collembolans *Folsomia candida* and *Hypogastrura assimilis* using the herbicide phenmedipham. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 49, p. 343–352, 2005b.

BELFROID, A.; SIJM, D.T.H.M. Influence of soil organic matter content on elimination rates of hydrophobic compounds in the earthworm: possible causes and consequences. **Chemosphere**, Oxford, v. 37, p. 1221–1234, 1998.

BRUSSAARD, L.; PULLEMAN, M.M.; OUÉDRAOGO, E.; MANDO, A.; SIX, J. Soil fauna and soil function in the fabric of the food web. **Pedobiologia**, Jena, v. 50, p. 447-462, 2007.

CARDOSO, E.J.B.N.; VASCONCELLOS, R.L.F.; BINI, D.; MIYAUCHI M.Y.H.; SANTOS, A.C.; ALVES, P.R.L.A.; DE PAULA A.M.; NAKATANI, A.S.; PEREIRA, J.M.; NOGUEIRA, M.A. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 274-289, 2013.

CAIXETA, L.B.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; BARROS, P.A.; ROLIM, M.M. Changes in soil and nematode community after sugarcane harvest and vinasse application. **Nematropica**, Bradenton, v. 41, p. 271-280, 2011.

Decisão de Diretoria no. 195/2005. São Paulo, 2005.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB.
Norma técnica P4.231: Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006. 12p.

_____. Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, v.124, n. 36, p. 53. 2014.

CESAR, R.G.; SILVA, M.B.; COLONESE, J.P., BIDONE, E.D.; EGLER, S.G.; CASTILHOS, Z.C.; POLIVANOV, H. Influence of the properties of tropical soils in the toxicity and bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended lands. **Environmental Earth Sciences**, Heidelberg, v. 66, p. 2281-229, 2012.

CESAR, R. G.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J.P.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; EGLER, S.; POLIVANOV, H. Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological effects on earthworms. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 186, p. 1487–1497, 2014.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 14, p. 584–599, 2014.

CHRISTOFOLETTI, 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.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, n. 1523, p. 1-14, 2013.

COMPART, D.M.P.; CARLSON, A.M.; CRAWFORD, G.I.; FINK, R.C.; DIEZ-GONZALEZ, F.; DICOSTANZO, A.; SHURSON, G.C. Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 2395–2404, 2013.

CORTET, J.; GOMOT-DE VAUFLERY, A.; POINSOT-BALAGUER, N.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 35, p. 115-134, 1999.

CROUAU, Y.; TAN TCHIAM, S. Importance of the nature of the dilution soils for the evaluation of toxicity of a polluted soil by a collembolan reproduction assay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 280-283, 2006.

DAAM, M.A.; LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; SOUSA, J.P. Comparing the sensitivity of soil invertebrates to pesticides with that of *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, Oxford, v. 85, p. 1040–1047, 2011.

DANE, J.H.; TOPP, G.C (Ed.). **Methods of Soil Analysis**. Pt 4. Physical Methods. Madison: Soil Science Society of America, 2002. 1692p. (Series, 5)

DE SILVA, P.M.C.S.; VAN GESTEL, C.A.M. Development of an alternative artificial soil for earthworm toxicity testing in tropical countries. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 170-174, 2009.

DOMENE, X.; ALCANIZ, J.M.; ANDRÉS, P. Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan *Folsomia candida*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 461–472, 2007.

DOMENE, X.; CHELINHO, S.; SOUSA, J.P. Effects of nonylphenol on a soil community using microcosms. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 10, p. 556-567, 2010.

DOMENE, X.; CHELINHO, S.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; ALCANIZ, J.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Applying a GLM-based approach to model the influence of soil properties on the toxicity of phenmedipham to *Folsomia candida*. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 12, p. 888-899, 2012.

ENVIRONMENT CANADA. Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests. Environmental Protection Series, EPS 1/RM/46, 2005 with 2007 updates. Ottawa: Environment Canada, 2007.

ESPAÑA-GAMBOA, E; MIJANGOS-CORTES, J; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, London, v. 2, p.1235-1250, 2011.

EUROPEAN COMMUNITY - EC. Council Directive 91/689/EC of 12 December 1991 on hazardous waste. **Official Journal of the European Union**, Brussels, n. 377, p. 20–27, 1991.

_____. Directive 2008/98/EC: Directive of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. 549. **Official Journal of the European Union**, Brussels, n. 312, p. 3-30, 2008.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

FREITAS, E.C.; ROCHA, O. Acute and chronic effects of sodium and potassium on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 20, p. 88–96, 2011.

GARCIA, M.V.B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283p. Ph.D. Thesis - University of Bonn. Bonn: Germany, 2004.

HUGUIER, P.; MANIER, N.; OWOJORI, O.J.; BAUDA, P.; PANDARD, P.; RÖMBKE, J. The use of soil mites in ecotoxicology: a review. **Ecotoxicology**, Dordrecht, *in press*, 2014.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance Test with *Eisenia fetida* as Indicator for the Habitat Function of Soils: Results of a Laboratory Comparison Test. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 3, p. 7-12, 2003.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11267**: Soil quality - Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. Geneva, 1999. 16p.

_____. **ISO 16387**: Soil quality - effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of effects on reproduction and survival. Geneva, 2004. 26p.

_____. **ISO 17512-1**: Soil quality - avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior. pt 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva, 2008a. 26p.

_____. **ISO 17512-2**: Soil quality: avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior. pt 2: test with collembolans (*Folsomia candida*). Geneva, 2008b. 20p.

_____. **ISO 11268-2**: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Pt 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. Geneva, 2012. 21p.

JIANG, Z.P.; LI, Y.R.; WEI, G.P.; LIAO, Q.; SU, T.M.; MENG, Y.C.; ZHANG, H.Y.; LU, C.Y. Effect of long-term vinasse application on physico-chemical properties of sugarcane field soils. **Sugar Tech**, Barakhamba Road, v. 14, p. 412–417, 2012.

KANNAN, A.; UPRETI, R.K. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 153, p. 609–615, 2008.

KHAN, M.I.; CHEEMA, S.A.; TANG, X.; HASHMI, M.Z.; SHEN, C.; PARK, J.; CHEN, Y. A battery of bioassays for the evaluation of phenanthrene biotoxicity in soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, p. 47–55, 2013.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985. 492p.

LAIME, E.M.; FERNANDES, P.D.O.; SOUZA, D.C.D. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, p. 16-29, 2011.

LEAL, J.R.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X.; ROSSIELO, R.O.P. Potencial redox e pH: variação em um solo tratado com vinhaça. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, MG, v. 7, p. 257–261, 1983.

LOCK, K.; JANSSEN, C.R. Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p. 1669-1672, 2001.

LUO, W.; VERWEIJ, R.A.; VAN GESTEL, C.A.M. Contribution of soil properties of shooting fields to lead bioavailability and toxicity to *Enchytraeus crypticus*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 76, p. 235-241, 2014.

MATOS, D.S.S.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; RODRIGUES, C.V.M.A.; BARBOSA, N.M.R. Relations between nematode communities and chemical attributes of soil with vinasse. **Nematropica**, Bradenton, v. 41, p. 23-38, 2011.

MATOS-MOREIRA, M.; CARRAL, E.; RODRIGUEZ, M.T.; LOPEZ-MOSQUERA, M.E.; CUNHA, M. Survival, body mass change and metal bioaccumulation in *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) incubated in soil amended with organic wastes. **Fresenius Environmental Bulletin**, Freising, v. 21, p. 441-449, 2012.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. Etanol - produção e consumo. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**, Nº 72, 2014. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>>. Acesso em: 11, Set. 2014.

MOSER, H.; RÖMBKE, J. **Ecotoxicological characterization of waste**: Results and experiences of an international ring test. New York, USA: Springer, 2009. 308p.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology**, New York, v. 23, p. 2188–2193, 2004.

NATAL-DA-LUZ, T.; TIDONA, S.; JESUS, B.; MORAIS, P.V.; SOUSA, J.P. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 9, p. 246-260, 2009a.

NATAL-DA-LUZ, T.; TIDONA, S.; VAN GESTEL, C.A.M.; MORAIS, P.V.; SOUSA, J. P. The use of Collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. **Chemosphere**, Oxford, v. 77, p. 1526-33, 2009b.

NATAL-DA-LUZ, T.; MOREIRA-SANTOS, M.; CLEMENS, R.; CASTILLO, L.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon spraying. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 21, p. 2163-2176, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 207**: Earthworm Acute Toxicity Test. Paris, 1984. 9p.

_____. **OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 226**: Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil. Paris, 2008. 24p.

OLIVEIRA, E.L.D.; ANDRADE, L.A.D.B.; FARIA, M.A.D.; EVANGELISTA, A.W.P.; MORAIS, A.R.D. Uso de vinhaça de alambique e nitrogênio em cana-de-açúcar irrigada e não irrigada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1398-1403, 2009.

OWOJORI, O.J.; WASZAK, K.; RÖMBKE, J. Avoidance and reproduction tests with the predatory mite *Hypoaspis aculeifer*: effects of different chemical substances. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 33, p. 230-237, 2014.

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSON, A.M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M.J.; FÉRARD, J.F.; GRAND, C.; BISPOI, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 363, p. 114-125, 2006.

PANDARD, P.; RÖMBKE, J. Proposal for a “Harmonized” strategy for the assessment of the HP 14 property. **Integrated Environmental Assessment and Management**, Pensacola, v. 9, p. 665–672, 2013.

PASQUALIN, L.A.; DIONISIO, J.A.; ZAWADNEAK, M.A.C.; MARCAL, C.T. Macrofauna edáfica em lavouras de cana-de-açúcar e mata no noroeste do Paraná - Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, p. 7–18, 2012.

PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; ALBUQUERQUE, P.H.S.; CUNHA, A.C. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, p. 197-201, 2005.

PEIJNENBURG, W.; CAPRI, E.; KULA, C.; LIESS, M.; LUTTIK, R.; MONTFORTS, M.; NIENSTEDT, K.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P.; JENSEN, J. Evaluation of exposure metrics for effect assessment of soil invertebrates. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 42, p. 1862-1893, 2012.

PESARO, M.; WIDMER, F.; NICOLLIER, G.; ZEYER, J.; Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, 35, 1049–1061, 2003.

PHILLIPS, C.T.; KUPERMAN, R.G.; CHECKAI, R.T. Toxicity of chemical-warfare agent HD to *Folsomia candida* in different soil types. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 38, p. 281-285, 2002.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Editora IAC, 2001. 285 p.

RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.D.; ROBERTO, L.; GUILHERME, G.; GUSTAVO, L.; JULIÃO, F. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 441-447, 2010.

ROMANO, N.; ZENG, C. Acute toxicity of sodium nitrate, potassium nitrate, and potassium chloride and their effects on the hemolymph composition and gill structure of early juvenile blue swimmer crabs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 26, p. 1955-1962, 2007.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M.V.B.; SCHEFFCZYK, A. Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 53, p. 590-598, 2007.

ROSA, E.V.C.; GIURADELLI, T.M.; CORRÊA, A.X.R.; RÖRIG, L.R.; SCHWINGEL, P.R.; RESGALLA, C.; RADETSKI, C.M. Ecotoxicological evaluation of the short term effects and stabilized textile sludges before application in forest soil restoration. **Environmental Pollution**, Barking, v. 146, p. 463-469, 2007.

SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 33, p. 339-347, 1998.

SILVA, G.N.; ORLANDO FILHO, J. Concentração da Composição Química dos Diferentes Tipos de Vinhaça do Brasil. Boletim Técnico PLANALSUCAR – Piracicaba, n. 8 p. 5-22, 1981.

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. 62, p. 108-114, 2007.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J.N. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, New York, v. 34, p. 1033-1049, 2008.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Method 3051A**: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, DC, 1998. 30p.

_____. **Method 3015A**, Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts. Washington, DC, US, 1999. 25p.

UYEDA, C.A.; MIRANDA, J.H.; DUARTE, S.N.; DE MEDEIROS, P.R.F.; DIAS, C.T.S. Influence of vinasse application in hydraulic conductivity of three soils. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 33, p. 689-698, 2013.

VAN GESTEL, C.A.M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, Sofia, v. 176, p. 275-296, 2012.

WILKE, B.M.; RIEPERT, F.; KOCH, C.; KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 70, p. 283-293, 2008.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. London: Prentice Hall International, 1999. 663p.

ZHANG, R.; CUI, J.; ZHU, H.M.; YANG, H. Effect of dissolved organic matters on napropamide availability and ecotoxicity in rapeseed (*Brassica napus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 3232-3240, 2010.

4 USO DE INDICADORES MICROBIANOS PARA AVALIAR O POTENCIAL POLUIDOR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS EM SOLOS TROPICAIS

Resumo

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol derivado de cana-de-açúcar do mundo. Uma média de 13 L de vinhaça é gerada para cada 1 L de etanol produzido, e quase todo este resíduo é aplicado no solo, na forma de fertirrigação. Em geral, este manejo pode ser considerado benéfico para o crescimento e metabolismo dos micro-organismos do solo, embora não exista nenhuma informação sobre os efeitos da vinhaça sobre as simbioses fungo-planta (ex. micorrizas), nem sobre suas influências na estrutura da comunidade bacteriana do solo. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da vinhaça de cana-de-açúcar sobre indicadores do crescimento e metabolismo microbianos, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e sobre a “impressão digital genética” das comunidades bacterianas dos solos, para determinar o potencial poluidor em solos tropicais. Para isto, concentrações crescentes de duas vinhaças de diferentes usinas destilatórias, e de uma terceira vinhaça proveniente da destilação em laboratório (VC), foram aplicadas em dois distintos Latossolos (LV e LVA), em um experimento em microcosmo com plantas de cana. Após 10, 30 e 60 dias da aplicação, foram avaliados os efeitos das vinhaças sobre os parâmetros microbianos de crescimento (biomassa microbiana de carbono) e metabolismo (respiração basal do solo e atividade da enzima desidrogenase), sobre a colonização das raízes de cana por FMA e nos perfis de DNAr de comunidade de bactérias dos solos, através da análise do polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP). Na presença de concentrações das vinhaças, foram verificados aumentos na biomassa microbiana, respiração do solo, bem como na atividade da enzima desidrogenase, comparados aos controles, em ambos os solos. A colonização das raízes de cana-de-açúcar por FMA em solo LVA também foi maior na presença das vinhaças. A presença dos efluentes alterou a estrutura da comunidade bacteriana, existindo uma clara separação entre os grupos presentes nos tratamentos com vinhaça e os do controle, independentemente do tempo após a aplicação. Além disso, as concentrações das vinhaças reduziram a riqueza e diversidade dos grupos de bactérias no solo LV, assim como favoreceu a dominância de grupos bacterianos. Os aumentos verificados nos parâmetros metabólicos microbianos foram atribuídos à adição de fontes de carbono (C) da vinhaça nos solos, a qual favorece a atividade biológica em geral, e é normalmente considerada benéfica para os micro-organismos do solo. Este maior conteúdo de C também pode ter alterado a comunidade bacteriana. Entretanto, é possível que alguns grupos de bactérias possam ter sido suprimidos pela adição de elementos/substâncias potencialmente tóxicas no solo, após aplicação das vinhaças. Estes resultados alertam para a importância de se considerar vários indicadores microbiológicos na avaliação dos riscos dos efluentes sobre os micro-organismos em solos tropicais, especialmente quando os parâmetros microbiológicos tradicionais não são capazes de detectar a poluição nestes solos.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano; Micorrizas; Impressão digital genética; Fertirrigação

Abstract

Brazil is the second largest sugarcane-derived ethanol producer. However, an average of 13 L of vinasse is generated for each 1 L of ethanol produced, and almost all of this waste is applied to soil as ferti-irrigation. In general, this management is considered beneficial for the growth and metabolism of soil microorganisms, though there is no information about the effects of the sugarcane vinasse on the AMF-fungi-plant symbioses (e.g. mycorrhizas) and on soil bacterial communities. In this study, we assessed the effects of vinasse on microbial indicators of growth and metabolism, as well as on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and on genetic fingerprinting of soil bacterial communities for identifying vinasse pollution in tropical soils. For this purpose, we applied increasing concentrations of two vinasses from different distillery plants, and a third from a laboratory production (VC), onto two Oxisols (LV and LVA), in a microcosm experiment with sugarcane. 10, 30, and 60 days after the application, we assessed the effects of the vinasses on the microbial growth (microbial biomass) and metabolism (basal soil respiration and dehydrogenase activity), on AMF fungi and on the rDNA profiles of the bacterial community of the soils by means of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). We found an increase in microbial biomass and respiration, as well as in dehydrogenase activity with increasing vinasse concentrations in both soils, compared to the control. The AMF colonization in LVA soil increased due to the vinasses. The vinasse application also changed significantly the structure of the bacterial community, showing a clear separation between the groups with and without vinasse treatments (control), regardless of the time elapsed after application, up to 60 days. In addition, the vinasses reduced the richness and the diversity of the bacterial groups in the LV soil, as well as induced a higher dominance by some bacterial groups in the treated soil. The verified increases in microbial metabolic parameters may be attributed to the addition of carbon sources (C) of the vinasses in the soils, which improves the general biological activity and is usually considered advantageous for soil organisms. This C content can also have changed the bacterial community. However, some bacterial groups may have been suppressed by the addition of some potentially toxic substances in the soil by the vinasses. These results alert for the importance of considering several microbial indicators when assessing the environmental risks of waste disposal on tropical soils, especially when the traditional microbial parameters are not able to detect pollution of some substances in soil.

Keywords: Microbial metabolism; Mycorrhiza; Genetic fingerprinting; Ferti-irrigation

4.1 Introdução

Atualmente, um dos desafios das indústrias está na busca por destinos adequados para os consideráveis volumes de resíduos gerados durante a produção. Boa parte destes resíduos tem potencial para a geração de subprodutos, e estes são utilizados como matéria prima na produção de energia, entre outros fins que

maximizam seu aproveitamento. Entretanto, a disposição em solos agrícolas, seja na forma *in natura*, como produto da compostagem, ou via fertirrigação dos efluentes, tem sido uma prática comum para o descarte dos resíduos agroindustriais (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; PRAZERES et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; KILLI et al., 2014; SHAHEEN et al., 2014). Recentemente, esta prática tem aumentado em razão da maior parte desses materiais conterem elevados teores de nutrientes minerais e matéria orgânica (MO), os quais podem ser convertidos em benefícios para as plantas e solos (DIACONO; MONTEMURRO, 2010).

A vinhaça de cana-de-açúcar é um efluente líquido de coloração marrom escura, natureza ácida, e com quantidades apreciáveis de matéria orgânica, potássio, cálcio e magnésio, entre outros (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Este é um dos mais volumosos resíduos da produção agroindustrial de etanol de cana-de-açúcar, sendo derivado da destilação do vinho, após a fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou melaço. Estima-se que para cada litro de etanol produzido são gerados 8 – 15 litros de vinhaça (FREIRE; CORTEZ, 2000), os quais têm como principal destino a fertirrigação de solos agrícolas (LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Diversos estudos comprovam os benefícios deste efluente para as plantas (YANG et al., 2013; CHRISTOFOLETTI et al., 2013) e para as características químicas e físicas dos solos (OLIVEIRA et al., 2009; LAIME; FERNANDES; SOUZA, 2011; JIANG et al., 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Entretanto, de modo a evitar, principalmente, a saturação de sais no solo e a lixiviação de cátions para as águas subterrâneas, a disposição da vinhaça de cana-de-açúcar em solos agrícolas do Estado de São Paulo deve seguir os critérios e procedimentos estabelecidos na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006).

Em ecossistemas terrestres os micro-organismos são os principais responsáveis pelos diversos processos biológicos e bioquímicos, subjacentes a diversos serviços do ecossistema, nomeadamente ao nível da regulação do ciclo de nutrientes e da regulação da qualidade da água, via processos de filtração. Estes organismos participam diretamente dos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, por meio da decomposição da matéria orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MATTANA; ORTIZ; ALCANIZ, 2010). Estas transformações, principalmente a mineralização, têm fundamental importância para os sistemas agrícolas e florestais, pois a ciclagem dos elementos químicos tem o papel de suprir boa parte da demanda nutricional das plantas (CORTET et al., 1999). Considerando que os micro-

organismos interagem diretamente com os resíduos no solo, é fundamental determinar os riscos ecotoxicológicos da vinhaça sobre a comunidade microbiana. Deste modo, torna-se possível prevenir desequilíbrios ecológicos no sistema edáfico e, conseqüentemente, preservar os serviços por eles prestados neste ecossistema (CARDOSO et al., 2013).

Entre as avaliações ecotoxicológicas sobre a microbiota terrestre, destacam-se os ensaios de letalidade e crescimento microbiano, atividade de degradação e metabolismo de energia, por meio da respiração basal e enzimas específicas do solo, assim como avaliações da diversidade genética e funcional das comunidades microbianas do solo (KAPANEN; ITÄVAARA, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RASTOGI; SANI, 2011). Os ensaios de crescimento e atividade microbiana em solos podem ser rápidos, simples e baratos (ex. Biomassa microbiana e respiração basal do solo), além de demandar pequenas amostras de solo (NOGUEIRA et al., 2006; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA; 2010). Por este motivo estão presentes na maior parte das avaliações de risco ecotoxicológico de resíduos (WILKE et al., 2008). Por outro lado, as análises em nível molecular (baseadas no DNA, RNA, entre outros), embora sejam mais complexas e com maior custo associado, podem identificar mudanças que as análises tradicionais não detectam na comunidade microbiana, nomeadamente, os impactos dos resíduos sobre a estrutura e funcionalidade das comunidades microbianas do solo (RASTOGI; SANI, 2011). O número de ensaios que utilizam este tipo de técnica para determinar o potencial poluidor de resíduos industriais sobre a microbiota do solo tem crescido nos últimos anos (TATTI et al., 2012; BROSZAT et al., 2014; KIM et al., 2014; MATTANA et al., 2014; SHAH et al., 2014; SILES et al., 2014).

Há evidências de que a aplicação de vinhaça de cana-de-açúcar no solo favorece os micro-organismos (SANTOS et al., 2009a; YANG et al., 2013). Entretanto, em maioria, estes benefícios são baseados em análises generalistas da microbiota, tal como o crescimento das populações via biomassa microbiana (GÓMEZ et al., 2009; SANTOS et al., 2009a; PRAMANIK; CHUNG, 2011; YANG et al., 2013; ALEIXO et al., 2014), contagem de colônias em meios de cultura (SANTOS et al., 2009a; YANG et al., 2013), bem como nos aumentos na atividade microbiana, via respiração basal (LOPES et al., 1986; PRATA et al., 2001; GÓMEZ et al., 2009; PRAMANIK; CHUNG, 2011; YANG et al., 2013) e atividade enzimática do solo (YANG et al., 2013). Tais resultados são atribuídos aos altos teores de

matéria orgânica (MO) e de nutrientes introduzidos no solo pelo efluente (SANTOS et al., 2009b; PRAMANIK; CHUNG, 2011; ALEIXO et al., 2014).

Entretanto, quando analisados individualmente, estes resultados não permitem identificar os efeitos específicos da vinhaça sobre as inter-relações micro-organismos-plantas (ex. simbioses com fungos micorrízicos e rizóbios), nem revelam as influências do efluente na composição e funcionalidade da comunidade microbiana do solo. Até o momento, pouco se sabe sobre os efeitos da vinhaça sobre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e sobre a estrutura das comunidades microbianas do solo (ALEIXO et al., 2014), especialmente na comunidade de bactérias, consideradas sensíveis indicadoras da poluição (KOZDRÓJ; ELSAS, 2001; CARUSO et al., 2004; STEFANOWICZ; NIKLIŃSKA; LASKOWSKI, 2008; ZHANG et al., 2009; SUN et al., 2012). Sabe-se apenas que, na presença deste efluente, as populações de bactérias (SANTOS et al., 2009a) e fungos (*Culture-based*) podem aumentar no solo (YANG et al., 2013), e que algumas reduções na diversidade genética de grupos fúngicos em solos agrícolas também podem ser decorrentes deste manejo (GUMIERE, 2012).

Uma vez que os critérios de aplicação de vinhaça de cana-de-açúcar em solos agrícolas baseiam-se apenas nos parâmetros químicos das vinhaças/solos (CETESB, 2006), e que as implicações ambientais deste efluente sobre as comunidades microbianas do solo ainda são pouco conhecidas (CHRISTOFOLETTI et al., 2013), este estudo teve o objetivo de avaliar o risco ecotoxicológico da vinhaça sobre o crescimento, atividade e estrutura da comunidade microbiana do solo, assim como os efeitos do efluente sobre a simbiose FMA-planta. Para tal, em um experimento em microcosmos, três diferentes vinhaças foram aplicadas em dois solos tropicais, na presença de plantas de cana-de-açúcar. As alterações sobre a biomassa microbiana de carbono (BMC), respiração basal do solo ($C-CO_2$), atividade da enzima desidrogenase (DHA), colonização das raízes de cana por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e estrutura da comunidade bacteriana foram avaliadas ao longo do tempo (aos 10, 30 e 60 dias após o plantio).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta e preparo dos solos e vinhaças

Foram coletadas amostras de um Latossolo Vermelho (LV) e um Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), em diferentes áreas de cultivo de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo, as quais estiveram livres da aplicação de vinhaça por mais de 10 anos. Os solos foram retirados da camada de 0-20 cm do perfil, secos ao ar, peneirados a 2 mm. Até o momento dos ensaios, os solos foram mantidos em temperatura ambiente.

Duas vinhaças foram coletadas diretamente nos tanques de armazenamento em diferentes usinas destiladoras (VA e VB) e uma terceira vinhaça foi derivada da produção de etanol em escala laboratorial (VC), sem a adição dos compostos antibióticos/aditivos. As vinhaças foram armazenadas em câmara fria (4°C).

Os solos e as vinhaças foram caracterizados física e quimicamente, de acordo com Raij et al. (2001) e Kiehl (1985), respectivamente, conforme descrito no item 3.2.1 (Solos e vinhaças utilizados) deste documento. As concentrações totais dos elementos potencialmente tóxicos (EPT) As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb e Zn, foram determinadas nos solos e nas vinhaças de acordo com as metodologias EPA 3051A (USEPA, 1998; 1999), conforme descrito no item 3.2.1 deste documento.

4.2.2 Procedimentos dos experimentos em microcosmos

Para avaliar os efeitos das vinhaças sobre os micro-organismos do solo ao longo do tempo, foram realizados experimentos em microcosmos com a perspectiva de semi-campo. Utilizou-se um delineamento experimental completamente aleatorizado (2x4x3), no qual cada tratamento foi derivado da combinação entre 2 solos e 4 concentrações de 3 vinhaças. Para cada tratamento foram realizadas 4 repetições. Em vasos com capacidade de 4 L foram adicionados aproximadamente 3,5 kg de solo seco e peneirado. No primeiro dia do experimento, em cada vaso foi inserida uma muda de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, variedade CTC2), proveniente de cultura de meristema (APÊNDICE A-1). Em seguida, foram aplicadas as vinhaças em concentrações crescentes (Tabela 4.1), em volumes suficientes para

atingir valores de 60 % da CRA de cada solo (APÊNDICE A-2). O mesmo volume em água deionizada foi aplicado nos controles negativos. Os gradientes de concentração testados foram preparados imediatamente antes do início dos testes. As concentrações das vinhaças foram baseadas nos Valores Limites adaptados da Norma Técnica P4.231, que regula a disposição de vinhaça em solos agrícolas (CETESB, 2006), conforme descrito no item.2.3.1 (Procedimentos experimentais) deste documento. Estes valores consideram os teores de K das vinhaças e dos solos, bem como a CTC dos solos e a extração de K a cada ciclo da cultura de cana.

Tabela 4.1 - Concentrações das vinhaças VA, VB e VC aplicadas no Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos

Solo	Vinhaça	Concentrações (mL kg ⁻¹ de solo seco)				
		Controle	C1	C2 ^a	C3	C4 ^b
LV	VA	0	33,5	67	134	200
	VB	0	37	74	148	200
	VC ^c	0	36	72	144	200
LVA	VA	0	19	38	76	120
	VB	0	21	42	84	120
	VC ^c	0	30	60	90	120

^a - representa os Valores Limites de aplicação, específicos para os solos e vinhaças em questão, calculados de maneira adaptada de CETESB (2006) para os primeiros 20 cm do perfil do solo; ^b - representa as concentrações máximas possíveis, isto é: 60% da CRA do solo com vinhaça pura; ^c - Vinhaça teve adição de K (K₂SO₄) para permitir doses equivalentes de K às demais nos solos

Os ensaios em microcosmos foram mantidos em casa de vegetação durante o período de fevereiro a abril de 2013, em que a média das temperaturas máximas e mínimas foi 30,26 ± 1,67 e 18,48 ± 1,94 °C, respectivamente, e a média de insolação foi de 6,8 ± 0,49 h d⁻¹. A umidade dos solos nos vasos foi corrigida com água deionizada a cada dois dias através da diferença de peso. Após 10, 30 e 60 dias do início dos ensaios, foram retiradas amostras de solo (aproximadamente 200 g de solo fresco) de cada vaso para realização das seguintes análises: pH, umidade, biomassa microbiana de carbono, respiração do solo, atividade da enzima desidrogenase e análise do perfil da comunidade bacteriana do solo. As amostras de solo para as análises dos parâmetros metabólicos da microbiota foram mantidas em 4 °C e o solo para a avaliação do perfil da comunidade bacteriana foi mantida em ultra freezer em -80 °C.

4.2.3 Análise do crescimento e metabolismo microbianos

A biomassa microbiana de carbono (BMC) foi estimada pelo método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987), sendo o carbono total dos extratos determinado pelo método de Walkley-Black (NELSON; SOMMERS, 1982). Amostras de 10 g de solo fresco (umidade corrigida para 60% da CRA) foram submetidas ao processo de fumigação com clorofórmio (P.A.), por 24 horas. Em seguida, foi realizada a extração do carbono solúvel das amostras através da adição de K_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), agitação por 30 minutos e filtragem. Os extratos sofreram oxidação por $K_2Cr_2O_7$ (66 mM) e foram titulados com sulfato ferroso amoniacal, em presença do indicador difenilamina. A BMC foi calculada com base na diferença entre o carbono total (CT) da amostra fumigada e o CT da amostra não fumigada, utilizando-se um fator de mineralização do C ($KC = 0,33$).

Para avaliar a respiração do solo, 100 g de solo foram incubados em frascos hermeticamente fechados. No interior dos frascos foi inserido também um béquer com 10 mL de hidróxido de sódio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) para a captura do CO_2 liberado (ALEF, 1995). A quantificação do CO_2 capturado foi feita pela titulação do hidróxido de sódio remanescente, com ácido clorídrico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), na presença de fenolftaleína, diariamente, durante 21 dias. A partir destes resultados, foram estabelecidos os valores do quociente metabólico microbiano do solo (qCO_2) (ANDERSON; DOMSCH, 1993), o qual foi calculado pela razão entre a média diária de CO_2 desprendido e o valor de BMC obtido na amostra.

A atividade da enzima desidrogenase foi medida de acordo com Casida, Klein e Santoro (1964). Para tal, em amostra de 5 g de solo fresco foram adicionados 5 mL da solução 1% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC). Após agitação e incubação a 37°C por 24 h foi realizada a extração do trifetil tetrazólio formazan (TTF) com metanol (10 mL). Por fim, o sobrenadante foi retirado e centrifugado (3400 RPM). Em alíquotas de 200 μL do sobrenadante realizou-se a leitura colorimétrica em espectrofotômetro a 485 nm. Os resultados obtidos foram ajustados de acordo com uma curva padrão, produzida com o mesmo substrato da enzima no dia da avaliação.

4.2.4 Análise da colonização das raízes de cana por FMA

Após 60 dias do início do experimento, amostraram-se raízes de cana-de-açúcar de todos os tratamentos para avaliar a colonização micorrízica. Nesta etapa, a percentagem de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi observada em raízes finas das plantas, as quais foram coloridas artificialmente de acordo com Vierheilig et al. (1998). Para tal, cerca de 5 g de raízes finas de cana-de-açúcar foram imersas em solução 10% de KOH por 48 horas. Após este período, as raízes na solução de KOH contendo foram incubadas em banho-maria (90 °C) por 30 minutos. A seguir, as raízes foram transferidas para uma solução de H₂O₂ (10%), onde permaneceram por cerca de 20 segundos e, então, foram colocadas em solução de tinta de caneta dissolvida em ácido acético para a coloração. Após a etapa de coloração, as raízes foram mantidas em solução de lactoglicerol. Para a avaliação em microscópio, selecionaram-se cinco lâminas para cada tratamento (concentração de vinhaça/controle), contendo em cada uma destas dez segmentos de raízes ($\approx$ 1 cm de comprimento). Atribuiu-se uma nota de 0 a 100 para cada segmento, conforme a intensidade de colonização radicular observada (MOREIRA et al., 2006).

4.2.5 Análise da estrutura da comunidade bacteriana do solo

Para avaliar os efeitos das concentrações das diferentes vinhaças sobre o perfil da comunidade bacteriana do solo, foram utilizadas técnicas de biologia molecular baseadas na extração de DNA do solo, amplificação de fragmentos específicos do DNA bacteriano por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e restrição enzimática destes fragmentos através da técnica de T-RFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*). O DNA das amostras dos solos LV e LVA (4,5 g de solo fresco), provenientes dos tratamentos com as concentrações C2 e C4 de cada vinhaça (VA, VB e VC), ou controle, em cada época de amostragem (10, 30 e 60 d), foi extraído de acordo com a metodologia do kit de extração comercial *PowerSoil DNA Isolation* (MoBio, Carlsbad, EUA). A integridade do DNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA), onde em cada poço do gel, junto à aplicação de 5 μ L da amostra de DNA extraído, foram aplicados 2 μ L de “Low mass DNA

Ladder” (Invitrogen Technology). Os géis foram submetidos a uma solução de brometo de etídeo para obter a coloração das bandas de DNA extraído.

Alíquotas do DNA extraído foram submetidas a PCR para a amplificação do gene 16S DNAr de bactérias. Para tal utilizaram-se *primers* específicos (“FAM-8fm – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG” e “926r – CCGTCAATTCCTTTRAGTTT”), como indicado por Schütte et al. (2009). A amplificação ocorreu em solução contendo: 33,6 µl de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, 5 µl de tampão PCR 1x, 6 µl de MgCl₂ (3 mM), 4 µl de dNTP (0,2 mM), 0,10 µl de cada primer (0,20 pmol µl⁻¹), 0,2 µl de Taq polimerase (0,02 U µl⁻¹) e 1 µl de amostra DNA do solo (aprox. 50 ng). As condições de amplificação foram: 95°C por 4 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 s; 57 °C por 30 s; 72 °C por 45 s; e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após a amplificação, realizou-se a purificação dos produtos da PCR com *QuiaQuick PCR purification kit* (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante. O produto purificado foi verificado em gel de agarose 2% e, em seguida, alíquotas de aproximadamente 100 ng foram submetidas às reações de clivagens com 5 U da endonuclease HhaI (GCG⁺C), de acordo com as instruções dos fabricantes (ANGEL et al., 2010). O produto final da restrição dos fragmentos de DNAr amplificados foi então analisado em sequenciador automático ABI Life 3500 (AppliedBiosystems). As leituras dos perfis de T-RFLP gerados foram transformadas em picos (software GeneMapper versão 4.1 - Applied BioSystems, Foster City, CA). Os perfis eletroforéticos da comunidade bacteriana de todos os tratamentos/controles analisados, gerados a partir da análise do T-RFLP, foram transformados em uma matriz de abundância relativa de cada UTO (unidade taxonômica operacional) formado, por meio do software GeneMapper versão 4.1 (Applied Biosystem). Os valores calculados dos dados relativos, referentes às UTOs formadas, foram transformados em matriz de distância de *Bray-Curtis*.

4.2.6 Análise de dados

As diferenças médias entre biomassa microbiana de carbono, respiração do solo, quociente metabólico microbiano do solo, atividade da enzima desidrogenase e colonização por FMA em solos tratados com vinhaça/controle foram testadas por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Quando detectadas diferenças ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas com seus

respectivos controles pelo teste de Dunnett, utilizando o pacote de software R[®] (versão 2.5.1.).

Correlações lineares entre os resultados obtidos para os parâmetros microbianos (BMC, C-CO₂, qCO₂ e DHA) e do solo (umidade), na presença dos tratamentos/controles, em ambos os solos, foram testadas utilizando o *r* de Pearson ($p \leq 0,01$).

Para identificar mudanças na estrutura da comunidade bacteriana dos solos após aplicação das vinhaças nos solos foram realizadas análises estatísticas não paramétricas. Uma matriz de similaridade, formada a partir das UTOs presentes nos tratamentos testados/controles, baseada no algoritmo *Bray-Curtis*, foi submetida à Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para estabelecer os agrupamentos entre as amostras. Além disso, a mesma matriz foi utilizada para testar a significância ($p \leq 0,05$) da separação dos grupamentos de UTOs presentes nos solos tratados com vinhaça (concentrações), em relação aos grupamentos dos solos controles, através da análise de similaridade (ANOSIM). Foram ainda calculados os índices de riqueza (número de UTOs), diversidade (Shannon) e Dominância para todas as amostras submetidas ao T-RFLP. Todos os resultados das análises da estrutura da comunidade bacteriana foram analisados por meio do software PAST 3.0. (HAMMER; HARPER; ABBADIE, 2001).

4.3 Resultados

4.3.1 Parâmetros químicos e físicos dos solos e vinhaças

O solo LV apresentou maiores teores de argila, MO, P, S, Ca, Mg, Mn, e Zn, bem como maior CTC, saturação por bases e teor de argila, comparado ao solo LVA. O Solo LVA, entretanto, apresentou maior valor de pH, e maiores teores de K e Fe (Tabela 4.2).

Os valores de pH dos solos aumentaram após adição das vinhaças (Figura 4.1), sendo este efeito maior com o aumento da concentração de vinhaça no solo. Em geral, a umidade dos solos também foi maior conforme o aumento da concentração de vinhaça aplicada (dose-resposta). Entretanto, estas diferenças se tornaram menores, ou nulas, ao longo do tempo (Figura 4.2).

Tabela 4.2 - Caracterização química e física do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), utilizados nos ensaios ecotoxicológicos nos microcosmos

Parâmetro	Solo	
	LV	LVA
pH (1 mol L ⁻¹ KCl)	4,4 ± 0,1	4,9 ± 0,4
MO (g dm ⁻³)	25	18
P (mg dm ⁻³)	15	12
S (mg dm ⁻³)	10	5
K (mg dm ⁻³)	52	80
Ca (mg dm ⁻³)	560	340
Mg (mg dm ⁻³)	120	84
Al (mg dm ⁻³)	<9	9
H+Al (mmol _c dm ⁻³)	25	28
B (mg dm ⁻³)	0,13	0,14
Cu (mg dm ⁻³)	0,8	1
Fe (mg dm ⁻³)	55	116
Mn (mg dm ⁻³)	15,4	4,3
Zn (mg dm ⁻³)	4,9	2,4
CTC (mmol _c dm ⁻³)	63,9	54,3
Saturação por bases (%)	61	49
Areias (g kg ⁻¹)	502	800
Silte (g kg ⁻¹)	172	24
Argilas (g kg ⁻¹)	326	176
CRA (%)	33	20

Em ambas as vinhaças provenientes de usinas destilatórias (VA e VB) destacam-se os maiores teores de MO/CT, NT, P, S e Ca, maior CE e menores valores de pH, quando comparadas à vinhaça produzida em laboratório (VC; Tabela 4.3). A vinhaça VC originalmente também apresentava menor teor de K (3350 mg dm⁻³), comparada às demais, entretanto, para se obter dosagens de aplicação semelhantes, baseando-se nas recomendações da CETESB (2006), adicionou-se K (K₂SO₄) de modo a elevar o teor do elemento para 8500 mg dm⁻³. Todas as vinhaças apresentaram teores de micronutrientes similares (Tabela 4.3), ou com diferenças independentes da origem do resíduo (usinas/laboratório).

Tabela 4.3 - Caracterização química e física das vinhaças provenientes de usinas destilatórias (VA e VB) e da vinhaça produzida em laboratório (VC), aplicadas no Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos

Parâmetro	Vinhaça		
	VA	VB	VC
pH (1M KCl)	4,6	4,9	5,2
MO (g dm ⁻³)	28,03	17,39	13,74
CT (g dm ⁻³)	15,57	9,66	7,63
NT (g dm ⁻³)	0,56	0,74	0,35
Relação C:N	28	13	22
P (mg dm ⁻³)	420	100	90
S (mg dm ⁻³)	2000	1000	<4
K (mg dm ⁻³)	9200	8300	8500
Ca (mg dm ⁻³)	980	1270	650
Mg (mg dm ⁻³)	1000	480	520
Cu (mg dm ⁻³)	1	1	1
Fe (mg dm ⁻³)	8	33	28
Mn (mg dm ⁻³)	2	7	4
Zn (mg dm ⁻³)	1	1	1
CE (mS cm ⁻¹)	20,7	20,18	10,63
Densidade (mg cm ⁻³)	0,95	0,87	0,96

Com exceção para o Cu, em que os teores do elemento no solo LV foram naturalmente superiores ao VP (ANEXO A; CETESB, 2014), os teores dos EPT, nas concentrações mais altas de cada vinhaça, somados com os teores de EPT dos solos, foram abaixo dos valores de prevenção (VP) para solos de áreas agrícolas de preservação máxima (CETESB, 2014), inclusive, alguns elementos apresentaram teores inferiores aos LQ (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Concentrações totais dos Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) nos solos (LV, LVA) tratados com a maior concentração de cada vinhaça, e valores-limites de prevenção (VP) e intervenção agrícola em Área Agrícola de Proteção Máxima (VI - APM_{Max}) destes elementos nos solos, de acordo com CETESB (2014)

EPT (mg kg ⁻¹)	LV ^{C4}			LVA ^{C4}			Limites Legais	
	VA	VB	VC	VA	VB	VC	VP	VI - APM _{Max}
As	0,011	0,002	<0,01	0,007	0,001	<0,01	15	35
Cd	1,025	1,025	1,025	<0,002	<0,002	<0,002	1,3	3,6
Co	8,446	8,434	8,428	1,562	1,555	1,552	25	35
Cr	51,657	51,664	51,664	18,629	18,633	18,633	75	150
Cu	75,938	76,066	75,917	13,038	13,114	13,025	60	760
Hg	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,5	1,2
Mo	0,004	0,005	0,003	0,002	0,003	0,002	5	11
Ni	11,584	11,588	11,584	3,855	3,858	3,856	30	190
Pb	14,555	14,556	14,553	4,578	4,578	4,577	72	150
Zn	43,054	42,994	43,017	15,312	15,277	15,290	86	1900

^{C4} - Indica a concentração mais elevada testada em LV e LVA (200 e 120 mL kg⁻¹ de solo seco, respectivamente)

Figura 4.1 - pH (média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação das concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$). Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle

Figura 4.2 – Umidade (média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação das concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$). Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle

4.3.2 Efeitos sobre o crescimento e metabolismo microbianos

Após 10 dias da aplicação das vinhaças em solo LV, a biomassa microbiana de carbono aumentou nas maiores concentrações de VA, VB e VC, quando comparada ao controle. Entretanto, ao longo do tempo (após 30 e 60 d), o incremento da BMC, em relação ao controle, somente se manteve na presença das mais altas concentrações de VA (Tabela 4.5). No solo LVA, o aumento da BMC ocorreu apenas na presença das maiores concentrações da vinhaça VA, após 30 dias da aplicação. Nos demais tempos de amostragem deste solo (10 e 60 d), a

BMC deste solo foi semelhante entre todos os tratamentos e o controle (Tabela 4.5). Além disso, na presença da maior concentração de VC em solo LVA, a BMC foi reduzida após 30 d. Em geral, ao longo do tempo, a BMC dos solos controles aumentou (solo LV) ou não diferiu (solo LVA). Os aumentos da BMC promovidos pelas vinhaças no início (10 e/ou 30 d) diminuíram após 60 d, quando comparados com os teores iniciais do próprio tratamento.

Tabela 4.5 - Biomassa microbiana de carbono (BMC; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias após da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$)

Solo	Tratamento	BMC ($\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco)		
		10 d	30 d	60 d
LV	Controle	387,37 $\pm$ 32,80	515,44 $\pm$ 55,24	538,97 $\pm$ 30,88
	VA 1	457,42 $\pm$ 57,26	490,85 $\pm$ 112,20	505,51 $\pm$ 26,73
	VA 2	461,57 $\pm$ 98,12	598,62 $\pm$ 74,23	519,31 $\pm$ 37,39
	VA 3	698,77 $\pm$ 89,68*	496,57 $\pm$ 107,31	653,80 $\pm$ 61,53*
	VA 4	1021,52 $\pm$ 168,66*	790,01 $\pm$ 152,74*	690,00 $\pm$ 57,29*
	VB 1	467,19 $\pm$ 85,66	539,23 $\pm$ 81,61	538,15 $\pm$ 40,89
	VB 2	442,87 $\pm$ 49,43	525,61 $\pm$ 52,27	502,68 $\pm$ 47,38
	VB 3	622,97 $\pm$ 55,73*	476,43 $\pm$ 167,47	439,47 $\pm$ 52,48
	VB 4	635,78 $\pm$ 165,30*	504,78 $\pm$ 109,26	439,72 $\pm$ 94,54
	VC 1	372,97 $\pm$ 32,88	466,43 $\pm$ 7,90	439,34 $\pm$ 24,91
	VC 2	460,90 $\pm$ 29,55	509,77 $\pm$ 60,52	468,26 $\pm$ 35,66
	VC 3	522,54 $\pm$ 84,73	507,68 $\pm$ 28,81	510,80 $\pm$ 33,55
	VC 4	683,14 $\pm$ 69,25*	504,34 $\pm$ 50,86	441,16 $\pm$ 68,85
LVA	Controle	233,84 $\pm$ 13,48	152,37 $\pm$ 17,29	207,36 $\pm$ 65,12
	VA 1	269,55 $\pm$ 24,47	178,22 $\pm$ 21,68	167,61 $\pm$ 3,88
	VA 2	233,24 $\pm$ 30,11	218,65 $\pm$ 32,41*	198,53 $\pm$ 140,23
	VA 3	272,49 $\pm$ 27,19	219,95 $\pm$ 46,31*	218,20 $\pm$ 60,13
	VA 4	283,98 $\pm$ 58,12	243,94 $\pm$ 51,64*	200,20 $\pm$ 87,14
	VB 1	277,80 $\pm$ 21,70	154,37 $\pm$ 29,74	192,20 $\pm$ 92,92
	VB 2	242,63 $\pm$ 84,22	138,74 $\pm$ 24,86	210,85 $\pm$ 50,12
	VB 3	260,85 $\pm$ 101,32	113,96 $\pm$ 23,62	305,11 $\pm$ 125,82
	VB 4	212,17 $\pm$ 57,75	127,51 $\pm$ 43,84	203,30 $\pm$ 61,03
	VC 1	219,42 $\pm$ 20,62	115,57 $\pm$ 11,06	145,53 $\pm$ 41,45
	VC 2	247,04 $\pm$ 19,14	97,05 $\pm$ 31,69	181,37 $\pm$ 47,48
	VC 3	168,64 $\pm$ 37,52	108,69 $\pm$ 27,21	182,15 $\pm$ 41,86
	VC 4	196,62 $\pm$ 63,91	88,48 $\pm$ 6,69*	144,64 $\pm$ 41,21

Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o seu respectivo solo controle, dentro de cada tempo amostral

A respiração do solo LV (C-CO₂) aumentou após 10, 30 e 60 d da aplicação de todas as vinhaças, quando comparada à respiração do controle nos mesmos períodos. Este efeito foi observado na presença de todas as concentrações das três vinhaças após 10 e 60 d. Entretanto, após 30 d, apenas as maiores concentrações das vinhaças promoveram o aumento significativo da respiração do solo, em relação ao controle (Tabela 4.6). Em solo LVA também houve aumento significativo do C-CO₂ após aplicação das vinhaças. Neste caso, com exceção da amostragem de 10 d, em que as vinhaças VA e VB promoveram aumento da respiração em quase todas as concentrações testadas, o aumento ocorreu apenas na presença das maiores concentrações das vinhaças (Tabela 4.6). Em geral, os valores de respiração dos solos LV e LVA diminuíram ao longo do tempo, independentemente do tratamento.

O quociente metabólico microbiano ($q\text{CO}_2$) do solo LV aumentou na presença de todas as vinhaças. Inicialmente (10 d), com exceção à menor concentração de VC, este aumento foi observado em todas as concentrações das vinhaças VA, VB e VC, em LV. Ao longo do tempo (após 30 e 60 d), apenas as concentrações mais altas destas vinhaças promoveram o aumento do $q\text{CO}_2$ (Tabela 4.7). Em solo LVA, o quociente metabólico foi aumentado apenas na presença das altas concentrações das vinhaças VA, VB e VC, após 10 d, e de VB e VC após 30 d (Tabela 4.7). Independentemente dos tratamentos, o $q\text{CO}_2$ do solo LV diminuiu ao longo do tempo. Entretanto, em LVA, esta redução ao longo do tempo ocorreu principalmente nos tratamentos em que o quociente foi inicialmente aumentado pela presença das vinhaças (Tabela 4.7).

Tabela 4.6 - Respiração basal (C-CO₂; média ± SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos (n = 4)

Solo	Tratamento	C-CO ₂ (µg C-CO ₂ g ⁻¹ solo seco dia ⁻¹)		
		10 d	30 d	60 d
LV	Controle	2314,69 ± 544,99	428,80 ± 67,53	341,56 ± 59,41
	VA 1	8613,23 ± 1426,18*	541,28 ± 41,01	532,86 ± 117,70*
	VA 2	14653,63 ± 3547,39*	674,14 ± 87,55	654,52 ± 166,87*
	VA 3	22148,66 ± 2298,62*	930,51 ± 118,81*	786,39 ± 43,93*
	VA 4	30809,65 ± 991,38*	1097,17 ± 281,94*	1096,51 ± 122,84*
	VB 1	8399,96 ± 1079,57*	625,59 ± 83,16	603,80 ± 56,70*
	VB 2	12593,53 ± 5829,59*	813,02 ± 209,40*	621,10 ± 58,38*
	VB 3	18110,35 ± 3004,18*	1093,58 ± 327,85*	846,35 ± 111,97*
	VB 4	24126,94 ± 4616,13*	1019,55 ± 149,66*	1048,21 ± 123,41*
	VC 1	6224,51 ± 1052,83	626,80 ± 68,49	653,18 ± 51,18*
	VC 2	10725,65 ± 35,34*	637,91 ± 68,31	636,35 ± 62,03*
	VC 3	13596,01 ± 2301,04*	738,28 ± 111,22	707,50 ± 103,14*
	VC 4	15730,27 ± 2143,71*	872,43 ± 91,41*	889,81 ± 83,17*
LVA	Controle	413,10 ± 82,25	438,08 ± 53,37	350,40 ± 71,53
	VA 1	753,83 ± 84,09*	555,09 ± 112,26	308,64 ± 35,73
	VA 2	900,67 ± 142,77*	536,18 ± 139,97	365,60 ± 32,89
	VA 3	957,06 ± 103,49*	624,40 ± 154,35	415,60 ± 48,76
	VA 4	1989,39 ± 296,61*	918,06 ± 119,32*	580,80 ± 67,38*
	VB 1	480,11 ± 109,22	449,03 ± 93,06	478,82 ± 123,63
	VB 2	719,21 ± 84,08*	483,58 ± 138,42	487,46 ± 55,80
	VB 3	855,41 ± 113,13*	706,89 ± 171,18	507,11 ± 137,52
	VB 4	1261,33 ± 247,31*	734,17 ± 245,39*	624,00 ± 141,16*
	VC 1	486,05 ± 59,14	458,08 ± 74,89	443,62 ± 48,85
	VC 2	431,03 ± 44,64	443,28 ± 79,85	483,33 ± 69,99
	VC 3	636,67 ± 82,63	458,37 ± 35,74	500,88 ± 25,77
	VC 4	803,02 ± 148,31*	617,67 ± 76,96	558,90 ± 56,08*

Asterisco (*) indica que houve diferença significativa entre o tratamento e o seu respectivo solo controle, dentro de cada tempo amostral

Tabela 4.7 - Quociente metabólico microbiano (qCO_2 ; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$)

Solo	Tratamento	qCO_2 (μg C- CO_2 μg BMC ⁻¹ dia ⁻¹)		
		10 d	30 d	60 d
LV	Controle	6,03 $\pm$ 1,62	0,85 $\pm$ 0,21	0,64 $\pm$ 0,14
	VA 1	19,02 $\pm$ 3,71*	1,15 $\pm$ 0,30	1,06 $\pm$ 0,24
	VA 2	32,08 $\pm$ 6,40*	1,14 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,24
	VA 3	31,88 $\pm$ 2,98*	1,97 $\pm$ 0,66*	1,21 $\pm$ 0,06
	VA 4	30,76 $\pm$ 5,02*	1,39 $\pm$ 0,17	1,59 $\pm$ 0,19*
	VB 1	18,21 $\pm$ 2,62*	1,17 $\pm$ 0,10	1,13 $\pm$ 0,13
	VB 2	27,98 $\pm$ 11,28*	1,58 $\pm$ 0,49	1,25 $\pm$ 0,20
	VB 3	29,15 $\pm$ 4,78*	2,39 $\pm$ 0,81*	1,96 $\pm$ 0,44*
	VB 4	38,49 $\pm$ 3,10*	2,06 $\pm$ 0,27*	2,53 $\pm$ 0,93*
	VC 1	16,92 $\pm$ 3,83	1,34 $\pm$ 0,16	1,49 $\pm$ 0,15*
	VC 2	23,21 $\pm$ 7,22*	1,27 $\pm$ 0,24	1,37 $\pm$ 0,21*
	VC 3	26,49 $\pm$ 5,77*	1,46 $\pm$ 0,25	1,39 $\pm$ 0,26*
	VC 4	23,20 $\pm$ 3,85*	1,73 $\pm$ 0,12*	2,06 $\pm$ 0,42*
	Controle	1,78 $\pm$ 0,41	2,89 $\pm$ 0,30	1,78 $\pm$ 0,47
	VA 1	2,83 $\pm$ 0,52	3,10 $\pm$ 0,43	1,80 $\pm$ 0,14
	VA 2	3,89 $\pm$ 0,61*	2,45 $\pm$ 0,47	2,84 $\pm$ 3,11
	VA 3	3,56 $\pm$ 0,66	2,83 $\pm$ 0,34	2,02 $\pm$ 0,62
	VA 4	7,19 $\pm$ 1,54*	3,93 $\pm$ 1,10	3,68 $\pm$ 2,50
LVA	VB 1	1,73 $\pm$ 0,38	2,94 $\pm$ 0,52	3,45 $\pm$ 2,94
	VB 2	3,37 $\pm$ 1,71	3,49 $\pm$ 0,83	2,39 $\pm$ 0,48
	VB 3	3,63 $\pm$ 1,24	6,72 $\pm$ 3,39*	1,76 $\pm$ 0,47
	VB 4	6,11 $\pm$ 1,20*	6,43 $\pm$ 3,38*	3,13 $\pm$ 0,49
	VC 1	2,22 $\pm$ 0,21	3,99 $\pm$ 0,73	3,25 $\pm$ 0,99
	VC 2	1,75 $\pm$ 0,14	5,04 $\pm$ 2,09	2,82 $\pm$ 0,97
	VC 3	3,95 $\pm$ 1,13*	4,37 $\pm$ 0,85	2,91 $\pm$ 0,94
	VC 4	4,24 $\pm$ 0,76*	7,01 $\pm$ 0,95*	4,02 $\pm$ 0,75

Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle, dentro de cada tempo amostral

A atividade da enzima desidrogenase no solo LV aumentou na presença de todas as concentrações das vinhaças VA, VB e VC (efeito dose-resposta), durante todo o ensaio (10, 30 e 60 d), quando comparada aos respectivos controles (Tabela 4.8). Em solo LVA, também ocorreu incremento na atividade da enzima na presença de todas as vinhaças. Entretanto, neste caso, especialmente após 10 e 60 d ocorreram os maiores aumentos na atividade da DHA, em relação ao controle

(Tabela 4.8). Independentemente do tipo de solo e do tratamento, a atividade da enzima diminuiu naturalmente ao longo do tempo.

Tabela 4.8 - Atividade da enzima desidrogenase (DHA; média $\pm$ SD) do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10, 30 e 60 dias da aplicação de concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$)

Solo	Tratamento	Desidrogenase ($\mu\text{g TTF g}^{-1}$ solo seco dia^{-1})		
		10 d	30 d	60 d
LV	Controle	4,76 $\pm$ 1,04	0,59 $\pm$ 0,31	1,44 $\pm$ 0,37
	VA 1	10,58 $\pm$ 1,93*	6,15 $\pm$ 1,59*	4,68 $\pm$ 1,50*
	VA 2	13,24 $\pm$ 0,81*	9,87 $\pm$ 0,23*	7,79 $\pm$ 0,34*
	VA 3	12,62 $\pm$ 1,99*	13,77 $\pm$ 0,59*	10,38 $\pm$ 0,40*
	VA 4	12,64 $\pm$ 0,31*	13,43 $\pm$ 1,82*	12,10 $\pm$ 1,60*
	VB 1	11,37 $\pm$ 0,32*	4,77 $\pm$ 1,20*	4,65 $\pm$ 0,40*
	VB 2	15,27 $\pm$ 1,80*	9,76 $\pm$ 3,15*	7,29 $\pm$ 1,15 *
	VB 3	15,61 $\pm$ 0,97*	9,78 $\pm$ 1,48*	9,25 $\pm$ 1,20*
	VB 4	12,84 $\pm$ 2,35*	9,23 $\pm$ 0,89*	9,37 $\pm$ 2,05*
	VC 1	11,68 $\pm$ 0,70*	4,90 $\pm$ 0,65*	3,70 $\pm$ 0,16*
	VC 2	13,22 $\pm$ 1,19*	6,82 $\pm$ 0,71*	5,50 $\pm$ 0,51*
	VC 3	13,00 $\pm$ 0,31*	10,50 $\pm$ 1,07*	8,43 $\pm$ 0,40*
	VC 4	14,66 $\pm$ 0,96*	11,40 $\pm$ 1,41*	10,23 $\pm$ 0,89*
LVA	Controle	6,51 $\pm$ 0,41	5,01 $\pm$ 0,88	4,27 $\pm$ 0,84
	VA 1	12,07 $\pm$ 1,17*	7,71 $\pm$ 0,60	8,33 $\pm$ 1,86*
	VA 2	13,00 $\pm$ 1,46*	8,54 $\pm$ 0,90	6,75 $\pm$ 1,54*
	VA 3	13,92 $\pm$ 1,76*	11,29 $\pm$ 0,90*	8,44 $\pm$ 1,29*
	VA 4	16,26 $\pm$ 0,73*	12,58 $\pm$ 0,95*	8,96 $\pm$ 0,29*
	VB 1	8,91 $\pm$ 1,52	7,55 $\pm$ 0,53	5,97 $\pm$ 0,74
	VB 2	10,94 $\pm$ 0,59*	8,59 $\pm$ 1,09	7,28 $\pm$ 0,59*
	VB 3	9,60 $\pm$ 1,50*	8,69 $\pm$ 0,54*	6,49 $\pm$ 1,12
	VB 4	8,63 $\pm$ 1,11	6,36 $\pm$ 1,36*	5,94 $\pm$ 1,05
	VC 1	9,60 $\pm$ 1,13*	6,61 $\pm$ 0,96	6,77 $\pm$ 1,23
	VC 2	10,82 $\pm$ 0,87*	6,49 $\pm$ 0,78	7,53 $\pm$ 1,99*
	VC 3	10,27 $\pm$ 1,07*	7,59 $\pm$ 0,78	7,24 $\pm$ 0,47*
	VC 4	10,98 $\pm$ 1,15*	9,07 $\pm$ 0,61*	7,37 $\pm$ 2,05*

Asterisco (*) indica aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle, dentro de cada tempo amostral

Todos os atributos tiveram correlação linear positiva significativa entre si (Tabela 4.9). Entre estes, destacam-se as correlações da umidade com a BMC, C-CO₂, DHA e qCO₂; da BMC com o C-CO₂, DHA e qCO₂; do C-CO₂ com a DHA e qCO₂; da DHA com o qCO₂.

Tabela 4.9 - Matriz de coeficientes (r) de correlação linear (Pearson) entre os atributos químicos/físicos e parâmetros microbianos do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após aplicação das concentrações crescentes das vinhaças VA, VB e VC e controles

	Umidade	BMC	C-CO ₂	DHA
BMC	0,840*			
C-CO ₂	0,578*	0,559*		
DHA	0,504*	0,271*	0,513*	
qCO ₂	0,539*	0,390*	0,946*	0,560*

Asterisco (*) indica que houve correlação linear significativa entre os atributos ($p \leq 0,01$)

Em solo LV, as percentagens de colonização das raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) não sofreram influências das vinhaças VA, VB e VC após 60 d, quando comparadas ao controle (Figura 4.3). Entretanto, em solo LVA, a colonização das raízes por FMA aumentou na presença de todas as vinhaças, sendo este efeito observado, inclusive, em baixas concentrações dos efluentes (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Percentagem de colonização das raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares (FMA; média $\pm$ SD) no Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 60 dias da aplicação das vinhaças VA, VB e VC em concentrações crescentes, nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos ($n = 4$). Asterisco (*) indica que houve aumento significativo entre o tratamento e o seu respectivo solo controle. ^a – dados referentes a apenas uma planta, pois houve mortalidade das demais plantas

4.3.3 Efeitos sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos

Na análise das coordenadas principais, baseada no perfil da comunidade bacteriana (perfil de UTOs) obtido por T-RFLP, observou-se que os agrupamentos das UTOs provenientes de ambos os solos (LV e LVA) tratados com concentrações das vinhaças VA e VB foram separados espacialmente entre si e dos respectivos controles (Figura 4.5). Em ambos os solos, não houve separação evidente entre os agrupamentos de UTOs das concentrações da vinhaça VC, entre si. Entretanto, quando comparados o agrupamentos das UTOs das vinhaças (VA, VB e VC, independentemente da concentração) com os dos respectivos controles, verifica-se clara separação (Figura 4.4). Os tempos de amostragem (10, 30 e 60 d após a aplicação das vinhaças) não influenciaram na distribuição das UTOs intra-tratamentos (Figura 4.4). Através das análises de similaridade (ANOSIM), verificaram-se as diferenças significativas entre as distribuições dos perfis das UTOs observados na PCoA (Figura 4.4).

A distribuição dos perfis das UTOs em ambos os solos tratados com vinhaça foi diferente ($p \leq 0,01$) daquela vista para a distribuição dos respectivos controles (ANEXO B). Além disso, verificou-se que a distribuição das unidades taxonômicas não variou ao longo do tempo (10, 30 e 60 dias), dentro do mesmo tratamento ($p \geq 0,05$).

Figura 4.4 - Análise de coordenadas principais (PCoA) das UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) relativas às comunidades bacterianas do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após 10 (quadrados), 30 (triângulos) e 60 dias (losangos) da aplicação das concentrações C2 (azul) e C4 (vermelho) das vinhaças VA, VB e VC e controles (preto) nos ensaios ecotoxicológicos em microcosmos

Independentemente do tempo de amostragem, a riqueza (número de UTOs) e a diversidade (Shannon) de grupos bacterianos (UTOs) no controle do solo LV foram maiores do que nas amostras contendo as concentrações das vinhaças. Além disso, no controle do solo LV também houve menor dominância do que nos solos tratados com as vinhaças (Tabela 4.10). Por outro lado, a riqueza de grupos bacterianos (UTOs) no controle do solo LVA foi menor do que nos solos tratados com as concentrações de VB e VC (Tabela 4.10). O valor de diversidade do controle deste solo foi maior do que os valores encontrados na presença de VA e VB (C2), entretanto, quando comparado com os valores obtidos para o solo na presença das concentrações (C2 e C4) da vinhaça VC e de VB (C4), o valor do índice de Shannon do controle foi menor. Exceto quando comparada com VA (C2) e VC (C2 e C4), a dominância das UTOs no controle do solo LVA foi menor (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 - Índices de riqueza (número de UTOs), diversidade (Shannon) e dominância, calculados a partir dos perfis de UTOs (médias entre as repetições) referentes às comunidades bacterianas do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após aplicação das concentrações C2 e C4, das vinhaças VA, VB e VC, independentemente do tempo de amostragem

Solo	Tratamento	Riqueza	Shannon	Dominância
LV	Controle	157,89	4,28	0,023
	VA 2	117,78	3,90	0,038
	VA 4	130,44	3,89	0,042
	VB 2	131,10	3,80	0,049
	VB 4	103,13	3,65	0,057
	VC 2	129,89	4,09	0,028
	VC 4	113,50	3,80	0,067
LVA	Controle	79,67	3,68	0,047
	VA 2	69,78	3,63	0,041
	VA 4	74,00	3,38	0,072
	VB 2	100,60	3,52	0,091
	VB 4	99,50	3,70	0,046
	VC 2	103,38	3,74	0,041
	VC 4	127,33	3,98	0,032

4.3 Discussão

4.4.1 Efeitos sobre a biomassa microbiana

Exceto pela maior concentração da vinhaça VC em solo LVA (após 30 d), nenhuma vinhaça causou redução da biomassa microbiana de carbono (BMC) nos solos testados. Por outro lado, verificou-se aumento significativo da BMC nos solos tratados com os efluentes (Tabela 4.5). Este aumento, muito provavelmente, ocorreu devido ao incremento de MO e umidade nos solos (Figura 4.2), havendo forte correlação linear positiva da BMC com a umidade do solo (Tabela 4.9). Vários estudos corroboram estes resultados, sugerindo também que os incrementos na BMC são decorrentes do aumento dos teores de carbono orgânico e N no solo, promovidos pelas vinhaças (GÓMEZ et al., 2009; SANTOS et al., 2009a; PRAMANIK; CHUNG, 2011; YANG et al., 2013; ALEIXO et al., 2014). A biomassa microbiana do solo é considerada um sensível indicador do estado e das transformações da matéria orgânica do solo (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA; 2010). Além disso, este parâmetro também pode ser utilizado como medida de toxicidade de determinadas substâncias sobre os micro-organismos (KAPANEN; ITÄVAARA, 2001), uma vez que, em solos poluídos, a BMC do solo pode ser bastante reduzida (BARAJAS-ACEVES, 2005). Portanto, quando solos apresentam aumentos significativos na BMC após adição de resíduos com altos teores de MO e outros nutrientes, é possível inferir que os processos de decomposição (imobilização/mineralização) estão funcionando adequadamente, assim como isto também pode ser um indicativo de que o material adicionado oferece baixo ou nenhum potencial de toxicidade para o crescimento microbiano. Estudos com estas finalidades também têm sido realizados para avaliar a influência da adição de outros tipos de resíduos potencialmente poluidores no solo (SAVIOZZI et al., 1994; MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003; NWACHUKWU; PULFORD, 2011).

4.4.2 Efeitos sobre o metabolismo microbiano

Em geral, houve aumento da atividade microbiana dos solos, representada aqui pela respiração basal do solo ($C-CO_2$), atividade da enzima desidrogenase

(DHA) e quociente metabólico do solo (qCO_2). Os aumentos na emissão de $C-CO_2$ são reflexos tanto do incremento da BMC (maior número de células respirando), quanto da maior atividade metabólica das células microbianas, demandada para suprir as necessidades energéticas e de carbono da BMC ativa. Uma vez que a respiração basal do solo está diretamente relacionada à atuação dos micro-organismos na decomposição de resíduos orgânicos, sendo o $C-CO_2$ um dos produtos finais do metabolismo de carboidratos na via das pentoses-fosfato (COHEN, 2011), é compreensível que exista uma correlação positiva do $C-CO_2$ emitido com a BMC do solo, tal como foi observado (Tabela 4.9). Esta correlação permite sugerir que a presença das vinhaças nos solos potencializou o processo de mineralização do carbono no solo.

A elevação da respiração microbiana, após aplicação de vinhaça nos solos, é geralmente atribuída ao alto teor de C solúvel e de rápida assimilação, presente no efluente (PRAMANIK; CHUNG, 2011), o qual é fonte rápida de energia para os micro-organismos (PRATA et al., 2001). Por este motivo, imediatamente após a adição da vinhaça no solo, inicia-se intenso ciclo respiratório e consumo da MO lábil, o qual tende a se estabilizar devido às fontes de carbono remanescente serem mais complexas (GÓMEZ et al., 2009). Em nosso estudo, em geral, verificou-se que há redução da respiração ao longo do tempo, contudo, após 60 d da aplicação das vinhaças no solo, a respiração em alguns tratamentos com vinhaça ainda foi superior à do controle. Segundo Tótola e Chaer (2002), estas altas taxas de respiração podem ser desejáveis quando se considera que está ocorrendo rápida transferência de nutrientes dos resíduos orgânicos (fonte) para as plantas (dreno), o que torna o manejo da aplicação de vinhaça no solo benéfico para os micro-organismos e para as plantas (YANG et al., 2013). Por outro lado, se for considerado que o $C-CO_2$ liberado para a atmosfera foi muitas vezes superior ao somatório do carbono imobilizado pela BMC (Tabelas 4.5 e 4.6), verifica-se que, embora a vinhaça não tenha sido tóxica para o crescimento microbiano, o manejo deste efluente em solos agrícolas aumentou consideravelmente a emissão de CO_2 , um dos gases responsáveis pelo efeito estufa. A influência da vinhaça no aumento da liberação de CO_2 (CARMO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013), entre outros gases do efeito estufa (PAREDES et al., 2014), já foi comprovada em outros estudos e, portanto, indiretamente, esta interação entre micro-organismos e a vinhaça de cana-de-açúcar

em solos agrícolas se constitui em uma implicação ambiental negativa do manejo (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Os altos valores observados no quociente metabólico dos solos (qCO_2) podem ser indicadores de que as comunidades microbianas do solo estiveram sob algum tipo de estresse metabólico provocado pelos efluentes (ANDERSON; DOMSCH, 1993; WARDLE; GHANI, 1995). Sabe-se que o qCO_2 pode indicar um estado de dominância da comunidade microbiana (INSAM; HUTCHINSON; REBER, 1996), o qual pode ser um mecanismo dos micro-organismos de evitar/superar os impactos de poluentes no solo. Por outro lado, altos valores de qCO_2 também podem indicar estádios iniciais de desenvolvimento microbiano no solo, com maior proporção de organismos ativos em relação aos inativos (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Neste estudo, quando se observa a dinâmica do qCO_2 no controle do solo LV; o qual inicialmente aumentou (10 d) e, após 30 e 60 d, diminuiu naturalmente (Tabela 4.7), com tendência a um equilíbrio metabólico (estabilização), é possível sugerir que houve um reestabelecimento e crescimento da microbiota após a aplicação de água no solo seco (reativação da microbiota). Esta dinâmica também parece ter sido verdadeira para os solos tratados com as vinhaças, porém, nestes casos, o considerável aumento do qCO_2 dos solos, em relação aos controles, também pode ser decorrente de estresses causados pela presença de determinados contaminantes nas vinhaças (KANNAN; UPRETI 2008; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al. 2013); como, por exemplo, os altos teores de K (entre outros sais solúveis), que alteram a atividade microbiana do solo (RIETZ; HAYNES, 2003). Outros estudos também sugerem que o aumento do qCO_2 nos solos, na presença de vinhaça, pode ser fruto do rejuvenescimento da comunidade microbiana (PRAMANIK; CHUNG, 2011), e da menor eficiência da microbiota na utilização do carbono, causada por possíveis situações de estresse metabólico (GÓMEZ et al., 2009).

Considerando que a enzima desidrogenase tem papel significativo na oxidação biológica de matéria orgânica do solo (MOS), através da transferência do hidrogênio de substratos orgânicos para aceptores inorgânicos (TREVORS, 1984; ZHANG et al., 2010), e que, após a aplicação das concentrações de vinhaça no solo, comprovou-se o aumento dos processos metabólicos microbianos que envolvem a transferência de elétrons via hidrogênio nas células, como, por exemplo, o crescimento microbiano (BMC) e a respiração (C- CO_2), era suposto que também

ocorressem aumentos na atividade da enzima DHA (Tabela 4.8). Além disso, por se tratar de uma enzima intracelular (WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2012), a ausência de efeitos negativos diretos sobre a atividade (ex. inibição) é um indicativo de que a presença das vinhaças nos solos não promoveu toxicidade sobre o metabolismo oxidativo dos micro-organismos ativos. Vários estudos que utilizaram a atividade da enzima DHA como bioindicador do estresse e/ou toxicidade microbiana, decorrentes da aplicação de resíduos (ricos em MO) no solo, apontam que os aumentos na atividade da enzima ocorrem quando o material não causa toxicidade para os micro-organismos (KAPANEN; ITÄVAARA, 2001; MOESKOPS et al., 2010; MACCI et al., 2012; ROIG et al., 2012). Estes ainda atribuem os aumentos da atividade da enzima à entrada de carbono e de outros nutrientes no solo. Além disto, sabe-se que os solos com maior teor de umidade favorecem o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios obrigatórios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), os quais são naturalmente mais responsivos à atividade da enzima DHA (WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2011; 2012) e, portanto sugere-se que o aumento da umidade dos solos, causado pelas concentrações das vinhaças (Figura 4.2), também contribuiu para o aumento da atividade desta enzima. Este fato pode ainda ser confirmado pela correlação positiva entre a atividade da DHA a umidade do solo (Tabela 4.9).

4.4.3 Efeitos sobre a colonização por FMA

Em solo LV, a ausência de efeito significativo das vinhaças sobre a colonização nas raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) indica que os efluentes não influenciaram a simbiose (FMA-planta). Por outro lado, em solo LVA, o aumento da taxa de colonização na presença das vinhaças (Figura 4.3) indica que os efluentes promoveram um estímulo sobre a associação FMA-planta. Sabe-se que a incorporação de resíduos agrícolas no solo possibilita uma maior aquisição de nutrientes minerais pelas plantas e que, consequentemente, também pode beneficiar os FMA (BORIE et al., 2002). Portanto, o estímulo observado pode ser decorrente dos aumentos dos teores de matéria orgânica e nutrientes, bem como da umidade do solo, promovidos pelas vinhaças, os quais também são considerados fatores indiretos na manutenção das estruturas de propagação (hifas/esporos) dos FMA (REIS; DE PAULA; DÖBEREINER, 1999; CLAIR; LYNCH, 2005). Por outro lado, sabe-se que as percentagens de

micorrização podem ser aumentadas devido a condições de estresse para as plantas (SIQUEIRA et al., 2010) e, portanto, os FMA também podem ter atuado como um filtro nas raízes durante a absorção de nutrientes/contaminantes, atuando assim como uma barreira das plantas à entrada de elementos que, em excesso, podem ser tóxicos (ex. potássio; Tabela 4.3). Esta hipótese pode ser verdadeira se for considerado que estas maiores taxas de colonização são respostas dos fungos à toxicidade das vinhaças para as plantas em LVA, uma vez que apenas neste solo houve mortalidade das plantas (75 % das mudas de cana; APÊNDICE B), na concentração máxima da vinhaça VB. O solo LVA possui menor CTC, teor de argila e MO, comparado ao LV (Tabela 4.2) e, portanto, maiores quantidades dos contaminantes permanecem disponíveis em solução (menor adsorção de cátions e substâncias eletropositivas; LOCK; JANSSEN, 2001), o que pode causar maior toxicidade.

Alguns autores sugerem que o desenvolvimento da simbiose FMA-planta atenua a toxicidade de certos metais (ex. Cu e Mn) para as plantas, indicando ainda que, em determinados casos, o aumento da concentração do metal no solo pode, inclusive, aumentar a eficiência micorrízica (CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2003) e a taxa de colonização (MEIER et al., 2011; BRITO et al., 2014). Isto sugere também que os FMA podem desenvolver mecanismos diferenciados de tolerância em solos poluídos, os quais permitem que a simbiose não seja limitada. Outros estudos também demonstraram o aumento da colonização por FMA em solos contaminados (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012; WU et al., 2014), inclusive em situações em que foram aplicados efluentes industriais no solo (IPSILANTIS et al., 2009). Entretanto, relativamente à aplicação de vinhaça no solo, sabe-se apenas que o efluente não alterou a densidade de esporos de FMA, ou seja, não afetou a multiplicação desses fungos (ALEIXO et al., 2014).

4.4.4 Efeitos sobre a estrutura da comunidade bacteriana do solo

Ao contrário das respostas observadas sobre o crescimento (BMC) e metabolismo microbiano ($C-CO_2$, DHA e qCO_2), a estrutura da comunidade bacteriana nos solos LV e LVA não foi alterada ao longo do tempo (10, 30 e 60 d; Figura 4.4). Entretanto, a comunidade de bactérias no controle destes solos foi alterada pela aplicação das concentrações de todas as vinhaças (Figura 4.4 e

ANEXO B). Estes resultados indicam que as mudanças no perfil da comunidade bacteriana do solo (perfil de UTOs) ocorreram logo após a aplicação das vinhaças (nos primeiros 10 d), e se mativeram ao longo do tempo (30 e 60 d). Este tipo de alteração sobre o perfil da comunidade bacteriana normalmente é observado quando os resíduos depositados no solo modificam certas características do ambiente (GOMES, et al., 2010; ROUSK et al., 2010; MATTANA et al., 2014). Como consequência das alterações nas condições ambientais, alguns grupos de bactérias e fungos do solo aumentam/diminuem, de acordo com a abundância relativa das substâncias benéficas/tóxicas para os micro-organismos (SILES et al., 2014). Nestes casos, podem ocorrer mudanças temporárias ou permanentes (ex. exclusão) de determinados grupos microbianos do solo, dependendo da composição do resíduo.

No caso da vinhaça, a maior parte dos estudos demonstra que a aplicação do efluente no solo causa aumento das populações de bactérias e fungos (SANTOS et al. 2009a; YANG et al., 2013), assim como seu manejo em lavouras de cana-de-açúcar pode causar aumento da abundância e a diferenciação de grupos fúngicos no solo (GUMIERE, 2012). Em geral, estas mudanças são atribuídas às dinâmicas de consumo dos materiais orgânicos e nutrientes da vinhaça no solo. Neste estudo, as mudanças observadas na estrutura da comunidade bacteriana são, provavelmente, decorrentes de um conjunto de alterações promovidas pelas vinhaças nos solos (ex. aumento do pH, umidade, MO e teor de nutrientes), assim como também podem ser fruto da influência de outras substâncias potencialmente tóxicas sobre as bactérias do solo (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al. 2013), as quais não foram determinadas nos solos testados.

Embora as mudanças observadas na composição das comunidades bacterianas sejam uma sinalização das interferências antrópicas no ambiente, estas alterações não determinam diretamente a natureza dos efeitos (positiva ou negativa) das vinhaças sobre as comunidades microbianas do solo. Entretanto, ao analisar os índices de diversidade (i.e., riqueza, diversidade e dominância; Tabela 4.10), é possível inferir que os menores valores de riqueza e diversidade nos tratamentos com vinhaça, em solo LV, comparados ao controle, indicam que a presença dos efluentes reduziu a riqueza e a diversidade de grupos bacterianos neste solo (Tabela 4.10). Além disso, a presença das vinhaças neste solo favoreceu a dominância de alguns grupos bacterianos (maiores valores do índice nos tratamentos com vinhaça).

Estes efeitos foram ainda maiores com o aumento das concentrações (Tabela 4.10), sugerindo uma relação dose-resposta das vinhaças com a redução na riqueza e diversidade bacteriana do solo.

As alterações sobre a diversidade e riqueza podem estar associadas à sensibilidade de alguns grupos bacterianos às mudanças no ambiente (SHARMA et al., 1998; WAKELIN et al., 2008; ROUSK et al., 2010). Sabe-se que, na presença de resíduos com matéria orgânica de fácil assimilação, pode haver predomínio de micro-organismos estrategistas *r*, onde poucas espécies possuem altas taxas de crescimento (INSAM, 1990), o que favorece a redução da diversidade e o aumento de grupos bacterianos dominantes. Por outro lado, as reduções sobre a diversidade microbiana do solo também podem ser respostas à presença de compostos tóxicos, os quais podem eliminar (ou reduzir a um nível muito baixo) alguns grupos bacterianos do solo (GOMES, et al., 2010; PAN; YU, 2011). Diversos estudos demonstram a ocorrência de perturbações na estrutura da comunidade bacteriana após a aplicação de resíduos poluentes no solo (CARRERA et al., 2007; GU et al., 2009; TATTI et al., 2012; SILES et al., 2014).

No caso da vinhaça, as diminuições da diversidade de alguns grupos microbianos do solo têm sido atribuídas à seleção preferencial de determinados grupos (GUMIERE, 2012), possivelmente, em decorrência de estresse competitivo entre os micro-organismos pelos materiais orgânicos de fácil assimilação (SANTOS et al., 2009a). Entretanto, sabe-se que este efluente possui um potencial poluidor, relacionado ao seu baixo pH, presença de compostos alcoólicos, altas concentrações de K, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu e metais pesados (KANNAN; UPRETI 2008; CHRISTOFOLETTI et al. 2013), compostos recalcitrantes (ex. fenóis e polifenóis), substâncias fitotóxicas, entre outros (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Neste trabalho, os teores de metais pesados e compostos alcoólicos foram baixos (Tabela 4.4), sendo mais provável que o material orgânico das vinhaças tenha favorecido o aparecimento de grupos bacterianos dominantes (INSAM, 1990). Por outro lado, os aumentos no pH (ROUSK et al., 2010), bem como as altas concentrações de nutrientes minerais (GU et al., 2009), principalmente do K (RIETZ; HAYNES, 2003; CRECCHIO et al., 2004), certamente também contribuíram para as mudanças observadas na estrutura da comunidade bacteriana do solo, uma vez que estes são considerados fatores de estresse sobre micro-organismos.

Baseado nos índices de diversidade obtidos para o solo LVA, verificou-se que a estrutura da comunidade bacteriana deste solo foi alterada de maneira ligeiramente diferente do solo LV. Em LVA, surpreendentemente, a riqueza e a diversidade na presença das vinhaças VB e VC foi maior do que no controle (Tabela 4.10). Neste caso, se for considerado que as vinhaças possuem um microbioma nativo diverso (CAMPOS et al., 2014), e que o solo LVA (controle), naturalmente, possui menor riqueza e diversidade comparado ao LV (Tabela 4.10), é possível sugerir que os acréscimos de grupos bacterianos nos tratamentos com vinhaça são provenientes da microbiota nativa dos efluentes. Estes aumentos também podem ser atribuídos ao fato de que, sob certas mudanças nas condições ambientais proporcionadas pelas vinhaças, os grupos microbianos pouco abundantes no solo (raros) aumentaram em número e por isso foram detectados pela técnica de T-RFLP.

De maneira geral, pode-se afirmar que a estrutura da comunidade bacteriana do solo foi significativamente alterada, inclusive com reduções na riqueza, diversidade e aumento na dominância de grupos bacterianos no solo. Embora a redução da diversidade e riqueza seja reconhecidamente um prejuízo para o meio ambiente, as implicações práticas diretas (efeitos sobre os serviços no ecossistema) destas alterações na composição da comunidade bacteriana só podem ser esclarecidas por meio de análises complementares (análise de grupos funcionais/abordagem metagenômica). Portanto, estes resultados indicam que o manejo da vinhaça de cana-de-açúcar nos solos agrícolas pode não ter apenas características positivas, como sugerido por Yang et al. (2013), pois além das implicações ambientais aqui observadas, as vinhaças podem afetar outros organismos do solo (ver item 3 deste documento; PEDROSA et al., 2005; CAIXETA et al., 2011; MATOS et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; CHRISTOFOLETTI; ESCHER; FONTANETTI, 2013).

4.4 Conclusões

1. O crescimento e metabolismo microbianos foram maiores na presença das três vinhaças.
2. O metabolismo microbiano diminuiu ao longo do tempo, independentemente do tratamento.
3. Apenas em solo LVA as vinhaças aumentaram a percentagem da colonização das raízes de cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares.
4. A estrutura da comunidade bacteriana do solo foi significativamente alterada por todas as vinhaças nos solos.
5. As vinhaças reduziram a riqueza e a diversidade da comunidade bacteriana do solo LV, bem como causaram maior dominância de certos grupos bacterianos.
6. As alterações na comunidade bacteriana do solo ocorreram em concentrações iguais às calculadas com base nos limites legais de aplicação.
7. As mudanças sobre a comunidade bacteriana do solo não foram influenciadas pelos diferentes períodos de amostragem, em até 60 dias após a aplicação das vinhaças.

Referências

- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.
- ALEIXO, A.P.; KASCHUK, K.; ALBERTON, O. Soil fungal and bacterial biomass determined by epifluorescence microscopy and mycorrhizal spore density in different sugarcane managements. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 588-594, 2014.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient form CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 25, p. 393-395, 1993.
- ANGEL, R.; SOARES, M.I.M.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 553-563, 2010.
- BARAJAS-ACEVES, M. Comparison of different microbial biomass and activity measurement methods in metal-contaminated soils. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, 1405-1414, 2005.

BARBOSA, B.; COSTA, J.; FERNANDO, A.L.; PAPAZOGLU, E.G. Wastewater reuse for fiber crops cultivation as a strategy to mitigate desertification. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, In press, 2014.

BORIE, F.; REDEL, Y.; RUBIO, R.; ROUANET, J.L.; BAREA, J.M.B. Interactions between crop residues application and mycorrhizal developments and some soil-root interface properties and mineral acquisition by plants in an acidic soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, p. 151-160, 2002.

BRITO, I.; CARVALHO, M.; ALHO, L.; GOSS, M.J. Managing arbuscular mycorrhizal fungi for bioprotection: Mn toxicity. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 68, p. 78–84, 2014.

BROSZAT, M.; NACKE, H.; BLASI, R.; SIEBE, C.; HUEBNER, J.; DANIEL, R.; GROHMANN, E. Wastewater irrigation increases the abundance of potentially harmful gammaproteobacteria in soils in Mezquital Valley, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, p. 5282-5291, 2014.

CAIXETA, L.B.; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P.; BARROS, P.A.; ROLIM, M.M. Changes in soil and nematode community after sugarcane harvest and vinasse application. **Nematropica**, Bradenton, v. 41, p. 271-280, 2011.

CAMPOS, C.R.; MESQUITA, V.A.; SILVA C.F.; SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. **Waste Management**, Oxford, v. 34, p. 2036-2046, 2014.

CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO, R.B.; NOGUEIRA, M.A. Changes in manganese uptake and translocation by mycorrhizal soybean under increasing Mn doses. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, p. 415-423, 2003.

CARDOSO, E.J.B.N.; VASCONCELLOS, R.L.F.; BINI, D.; MIYAUCHI M.Y.H.; SANTOS, A.C.; ALVES, P.R.L.A.; DE PAULA A.M.; NAKATANI, A.S.; PEREIRA, J.M.; NOGUEIRA, M.A. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 274-289, 2013.

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. In field greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **Global Change Biology Bioenergy**, Hoboken, v. 5, p. 267–280, 2012.

CARRERA, L.M.; BUYER, J.S.; VINYARD, B.; ABDUL-BAKI A.A.; SIKORA L.J.; TEASDALE J.R. 2007. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 37, p. 247–255.

CARUSO, G.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; GIULIANO, L.; MANCUSO, M.; YAKIMOV, M. New methodological strategies for detecting bacterial indicators. **Chemistry and Ecology**, Abingdon v. 20, p. 167–181, 2004.

CASIDA, J.R.L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, Philadelphia, v. 98, p. 371-376, 1964.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB.
Norma técnica P4.231: Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006. 12p.

_____. Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, v.124, n. 36, p. 53. 2014.

CHRISTOFOLETTI, 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.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, n. 1523, p. 1-14, 2013.

CLAIR, S.B.S.; LYNCH, J.P. Base cation stimulation of mycorrhization and photosynthesis of sugar maple on acid soils are coupled by foliar nutrient dynamics. **New Phytologist**, Cambridge, v. 165, 581–590, 2005.

COHEN, G.N. **Microbial Biochemistry**. 2nd ed. Dordrecht: Springer, 2011. 557p.

CORTET, J.; GOMOT-DE VAUFLERY, A.; POINSOT-BALAGUER, N.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D.. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 35, p. 115-134, 1999.

CRECCHIO, C.; GELSOMINO, A.; AMBROSOLI, R.; MINATI, J.L.; RUGGIERO, P. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1873-1883, 2004.

DIACONO, M.; MONTEMURRO, F. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 401–422, 2010.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, London, v. 2, p. 1235-1250, 2011.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, p. 489-500, 1980.

GOMES, N.C.M.; LANDI, L.; SMALLA, K.; NANNIPIERI, P.; BROOKES, P.C.; RENELLA, G. Effects of Cd and Zn enriched sewage sludge on soil bacterial and fungal communities. **Ecotoxicology Environmental Safety**, New York, v. 73, p. 1255–1263, 2010.

GÓMEZ, S.P.M.; FLORES, J.C.M.; CORREA, C.R.B.; MOLINA, R.M. Influence of the vinasse application on activity and microbial biomass in an Entic dystropept and afluent haplustollsoil of Cauca Valley, Colombia. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 58, p. 41-45, 2009.

GU Y.F.; ZHANG X.P.; TU S.H.; LINDSTROM K. Soil microbial biomass, crop yields, and bacterial community structure as affected by long-term fertilizer treatments under wheat-rice cropping. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, p. 239–246, 2009.

GUMIERE, T. **Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar**. 2013. 75p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological Electronica**, California, v.4, p. 1-9, 2001.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, H. A.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ZAVALA-MANCERA, H. A.; LÓPEZ-DELGADO, H. A.; MENDOZA-LÓPEZ, M. R. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 95 Suppl., S319–324, 2012.

INSAM, H. Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 22, p. 525-532, 1990.

INSAM, H.; HUTCHINSON, T.C.; REBER, H.H. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 28, p. 691-694, 1996.

IPSILANTIS, I.; KARPOUZAS, D.G.; PAPADOPOULOU, K.K.; EHAIOTIS, C. Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 2466-2476, 2009.

JIANG, Z.P.; LI, Y.R.; WEI, G.P.; LIAO, Q., SU, T.M.; MENG, Y.C.; ZHANG, H.Y.; LU, C.Y. Effect of long-term vinasse application on physico-chemical properties of sugarcane field soils. **Sugar Tech**, Barakhamba Road, v. 14, p. 412–417, 2012.

KANNAN, A.; UPRETI, R.K. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 153, p. 609–615, 2008.

- KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 49, p. 1-16, 2001.
- KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 42, p. 1-13, 2010.
- KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985. 492p.
- KILLI, D.; ANLAUF, R.; KAVDIR, Y.; HAWORTH, M. Assessing the impact of agro-industrial olive wastes in soil water retention: Implications for remediation of degraded soils and water availability for plant growth. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 94, p. 48–56, 2014.
- KIM, J.; JUNG, H.; LEE, C. Shifts in bacterial and archaeal community structures during the batch biomethanation of Ulva biomass under mesophilic conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 169, p.502–509, 2014.
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J.D. van. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 197–212, 2001.
- LAIME, E.M.; FERNANDES, P.D.O.; SOUZA, D.C.D. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, p. 16-29, 2011.
- LOCK, K.; JANSSEN, C.R. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates : taking soil parameters affecting bioavailability into account. **Environmental Toxicology**, New York, v. 10, p. 315-322, 2001.
- LOPES, E.S.; PERÓN, S.C., PORTUGAL, E.P., CAMARGO, O.A.; FREITAS, S.D.S. Atividade respiratória de solo tratado com vinhaça e herbicida. **Bragantia**, Campinas, v. 45, p. 205-210, 1986.
- MACCI, C.; DONI, S.; PERUZZI, E.; MASCIANDRO, G.; MENNONE, C.; CECCANTI, B. Almond tree and organic fertilization for soil quality improvement in southern Italy. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 95, p. 215-222, 2012.
- MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 453–461, 2003.
- MATOS, D.S.S., PEDROSA, E.M.R., GUIMARÃES, L.M.P., RODRIGUES, C.V.M.A., BARBOSA, N.M.R. Relations between nematode communities and chemical attributes of soil with vinasse. **Nematropica**, Bradenton, v. 41, p. 23-38, 2011.
- MATTANA, S.; ORTIZ, O.; ALCÁÑIZ, J. M. Substrate-Induced Respiration of a Sandy Soil Treated with Different Types of Organic Waste. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 41, p. 408-423, 2010.

MATTANA, S.; PETROVIČOVÁ, B.; LANDI, L.; GELSOMINO, A.; CORTÉS, P.; ORTIZ, O.; RENELLA, G. Sewage sludge processing determines its impact on soil microbial community structure and function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 75, p. 150-161, 2014.

MEIER, S.; AZCÓN, R.; CARTES, P.; BORIE, F.; CORNEJO, P. Alleviation of Cu toxicity in *Oenothera picensis* by copper-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 48, p.117–124, 2011.

MOESKOPS, B.; BUCHAN, D.; SLEUTEL, S.; HERAWATY, L.; HUSEN, E.; SARASWATI, R.; SETYORINI, D.; DE NEVE, S. Soil Microbial Communities and Activities under Intensive Organic and Conventional Vegetable Farming in West Java, Indonesia. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 112-120, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis – chemical and microbiological properties**. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy e Soil Science Society of America, 1982. chap. 29, pt 2. p. 539-579.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JÚNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M. F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPIO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J. M.; RAIMAN, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 115, p. 237-247, 2006.

NWACHUKWU, O.I.; PULFORD, I.D. Microbial respiration as an indication of metal toxicity in contaminated organic materials and soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, p. 1140-1147, 2011.

OLIVEIRA, E.L.D.; ANDRADE, L.A.D.B.; FARIA, M.A.D.; EVANGELISTA, A.W.P.; MORAIS, A.R.D. Uso de vinhaça de alambique e nitrogênio em cana-de-açúcar irrigada e não irrigada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1398-1403, 2009.

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.

PAN, J.; YU, L. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 37, p.1889–1894, 2011.

PAREDES, D. SILVA.; LESSA, A.C.D.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**, Dordrecht, v. 98, p. 41–55, 2014.

PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; ALBUQUERQUE, P.H.S.; CUNHA, A.C. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, p. 197-201, 2005.

PRAMANIK, P.; CHUNG, Y.R. Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: documentation of cellulase isozymes in vermicompost. **Waste Management**, Oxford, v. 31, p. 1169–1175, 2011.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGINATO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 975–981, 2001.

PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J.; PATANITA, M.; DÔRES, J. Pretreated cheese whey wastewater management by agricultural reuse: chemical characterization and response of tomato plants *Lycopersicon esculentum* Mill. under salinity conditions. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 463-464, p. 943–951, 2013.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Editora IAC, 2001. 285p.

RASTOGI, G; SANI, R.K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and Microbial Technology**: Agricultural and Environmental Applications. New York: Springer, 2011. chap. 2, p. 29-57.

REIS, V.M.; DE PAULA, M.A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1933-1941, 1999.

RIETZ, D.N.; HAYNES, R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 845–854, 2003.

ROIG, N.; SIERRA, J.; MARTÍ, E.; NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J.L. Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 158, p. 41-48, 2012.

ROUSK, J.; BAATH, E.; BROOKES, P.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J.G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 1340–1351, 2010.

SANTOS, T.M.C.; SANTOS, M.A.L.; SANTOS, C.G.; SANTOS, V.R.; Pacheco, D.S. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, 2009, p. 155-160, 2009a.

_____. Fertilização com vinhaça e seus efeitos sobre evolução e liberação de CO₂ no solo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, p. 141-145, 2009b.

SAVIOZZI, A.; LEVI-MINZI, R.; RIFFALDI, R.; CARDELLI, R. Suitability of a winery-sludge as soil amendment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 49, p. 173–178, 1994.

SHAH, V.; JONES, J.; DICKMAN, J.; GREENMAN, S. Response of soil bacterial community to metal nanoparticles in biosolids. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 274, p. 399–403, 2014.

SHAHEEN, S.M.; SHAMS, M.S.; IBRAHIM, S.M.; ELBEHIRY, F. A.; ANTONIADIS, V.; HOODA, P. S. Stabilization of Sewage Sludge by Using Various By-products: Effects on Soil Properties, Biomass Production, and Bioavailability of Copper and Zinc. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 225, p. 1-13, 2014.

SHARMA, S.; RANGGER, A.; VON LUTZOW, M.; INSAM, H. Functional diversity of bacterial communities increases after litter amendment. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 34, p. 53–60, 1998.

SILES, J. A.; RACHID, C.T.C.C.; SAMPEDRO, I.; GARCÍA-ROMERA, I.; TIEDJE, J. M. Microbial diversity of a Mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. **PloS One**, San Francisco, v. 9, p. 1-13, 2014.

SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A. de; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. 716p.

STEFANOWICZ, A.M.; NIKLIŃSKA, M.; LASKOWSKI, R. Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 27, p. 591–598, 2008.

SUN, M.Y.; DAFFORN, K.A.; BROWN, M.V.; JOHNSTON, E.L. Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 64, p. 1029-1038, 2012.

TATTI, E.; DECOROSI, F.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L. Despite long-term compost amendment seasonal changes are main drivers of soil fungal and bacterial population dynamics in a Tuscan vineyard. **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 29, p. 506–519, 2012.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 196-276.

TREVORS, J.T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 16, p. 673–674, 1984.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Method 3051A**: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, DC, 1998. 30p.

_____. **Method 3015A**, Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts. Washington, DC, US, 1999. 25p.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHÈ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 5004-5007, 1998.

WAKELIN, S.A., MACDONALD, L.M., ROGERS, S.L., GREGG, A.L., BOLGER, T.P., BALDOCK, J.A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 803–813, 2008.

WARDLE, J.C.; GHANI, A. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 27, p. 1601–2161, 1995.

WILKE, B.M.; RIEPERT, F.; KOCH, C.; KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 70, p. 283-293, 2008.

WOLIŃSKA, A.; STĘPNIEWSKA, Z. Microorganisms Abundance and Dehydrogenase activity as a consequence of Soil Reoxidation Process, In: MIRANSARI, M. (Ed.). **Soil Tillage & Microbial Activities**. Kerala: Research Singpost, 2011. p. 111-143.

_____. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment, In: CANUTO R.A. (Ed.). **Dehydrogenases**. Rijeka: InTech, 2012. chap. 8, p. 196-276.

WU, S.-L.; CHEN, B.-D.; SUN, Y.-Q.; REN, B.-H.; ZHANG, X.; WANG, Y.-S. Chromium resistance of dandelion (*Taraxacum platyepidum* Diels.) and bermudagrass (*Cynodon dactylon* [Linn.] Pers.) is enhanced by arbuscular mycorrhiza in Cr(VI)-contaminated soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 33, p. 2105–2113, 2014.

YANG, S.-D.; LIU, J.-X.; WU, J.; TAN, H.-W.; LI, Y.-R. Effects of vinasse and press mud application on the biological properties of soils and productivity of sugarcane. **Sugar Tech**, Barakhamba Road, v. 15, p. 152–158, 2013.

ZHANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; HE, Q.; ZHOU, Q.; SU, Z.; ZHANG, C. Responses of soil bacteria to long-term and short-term cadmium stress as revealed by microbial community analysis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 82, p. 367–372, 2009.

ZHANG, N.; HE, X.; GAO, Y.; LI, Y.; WANG, H.; MA, D.; ZHANG, R.; YANG, S. Pedogenic carbonate and soil dehydrogenase activity in response to soil organic matter in *Artemisia ordosica* community. **Pedosphere**, Nanjing, v. 20, p. 229-235, 2010.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora bilhões de litros de vinhaça de cana-de-açúcar sejam aplicados nos solos agrícolas brasileiros todos os anos, pouco se conhecia a respeito dos efeitos deste tipo de efluente sobre os organismos do solo. Entre os membros da fauna, eram apenas conhecidos os impactos da vinhaça sobre certas espécies de nematoides e diplópodes. Sobre os micro-organismos, a maioria dos estudos destacava aumentos no crescimento e metabolismo microbianos após aplicação do efluente no solo, sendo raros ou inexistentes os estudos sobre os efeitos nos fungos micorrízicos e na estrutura da comunidade microbiana do solo.

A partir dos resultados deste trabalho, foi reconhecido que a vinhaça de cana-de-açúcar pode comprometer a função hábitat e a reprodução de algumas espécies essenciais da fauna no solo. A realização dos ensaios laboratoriais com as várias espécies padrões foi fundamental para obter limites de aplicação mais seguros para a fauna, uma vez que o risco associado a cada organismo foi variável. A origem dos efluentes foi determinante nos efeitos sobre as espécies, visto que houve distinção na toxicidade promovida pelas vinhaças das usinas destilatórias (as quais foram mais tóxicas) e da amostra gerada em laboratório (sem aditivos). Além disso, a variação dos efeitos sobre a fauna nos diferentes tipos de solo foi considerada um alerta para a importância das propriedades químicas e físicas dos solos tropicais, principalmente os conteúdos de argila e matéria orgânica, na derivação de valores de risco para a fertirrigação com vinhaça.

No que diz respeito aos efeitos das vinhaças sobre a microbiota do solo, parte dos ensaios microbianos aqui realizados corrobora os resultados existentes na literatura, nomeadamente os incrementos na biomassa microbiana, respiração basal do solo e atividade da enzima desidrogenase. Estas alterações foram normalmente atribuídas ao aumento de carbono orgânico e de outros nutrientes no solo que, em geral, categorizam a fertirrigação com vinhaça como um benefício para as plantas e micro-organismos do solo. Entretanto, os efeitos inéditos das vinhaças sobre os micro-organismos, aqui observados, tais como: os aumentos na colonização das raízes da cana-de-açúcar por fungos micorrízicos arbusculares e as mudanças na estrutura da comunidade bacteriana do solo, também indicaram uma potencial toxicidade destes efluentes para a microbiota do solo, atribuída aos altos teores de sais, principalmente o potássio, adicionados nos solos pela vinhaça. Visto que, para

a realização dos ensaios microbianos as vinhaças tiveram ajustes nos teores de potássio, de modo a manter valores equivalentes do elemento em todas as amostras, não foram identificadas grandes diferenças de toxicidade para os micro-organismos, baseando-se nas origens dos efluentes.

A derivação de valores de risco dos contaminantes no solo deve considerar as maiores sensibilidades, verificada nos ensaios ecotoxicológicos, de modo a representar o “*worst case scenario*”. Neste estudo, concentrações iguais ou inferiores às calculadas com base nos limites legais causaram impactos negativos sobre a fauna e mudanças na estrutura da comunidade bacteriana do solo; assim, este estudo pode ser um indicativo de que os critérios legais atuais podem ser fortalecidos, por meio da inclusão de parâmetros ecotoxicológicos, para que este manejo seja também considerado seguro para os organismos do solo.

Este estudo considerou o uso dos principais bioindicadores da fauna e da microbiota do solo para caracterizar o risco ecotoxicológico terrestre da vinhaça de cana-de-açúcar. Entretanto, é possível diminuir ainda mais as incertezas a respeito do risco ecológico deste efluente no solo. Para a fauna é recomendável realizar ensaios em nível de semi-campo ou campo (verificar a interação entre as espécies), e para os micro-organismos, a análise de grupos funcionais ou o uso de uma abordagem metagenômica podem ajudar a revelar os prejuízos sobre os serviços do ecossistema prestados pela microbiota do solo.

APÊNDICES

APÊNDICE A – (1) visão geral do experimento com microcosmos (mudas de cana-de-açúcar da variedade CTC2; (2) comparação do aspecto do solo LVA tratado com a concentração mais elevada (C4) da vinhaça VB (vaso do lado esquerdo da foto) e o controle (vaso do lado direito da foto), no primeiro dia do experimento em microcosmos

APÊNDICE B - Mudas de cana-de-açúcar em solo LVA, após 10 dias do tratamento com a concentração C4 da vinhaça VB (esquerdo) e controle (direito)

ANEXOS

ANEXO A - Concentrações totais dos Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT)
nos solos (LV, LVA e SAT) e vinhaças (VA, VB e VC)

EPT	Vinhaça (mg L ⁻¹)			Solo (mg kg ⁻¹)		
	VA	VB	VC	LV	LVA	SAT
As	0,056	0,011	<0,01	1,30	2,15	<0,01
Cd	<0,002	<0,002	<0,002	1,02	0,025	<0,002
Co	0,104	0,043	0,017	8,42	1,55	0,075
Cr	0,034	0,068	0,071	51,65	18,62	6,17
Cu	0,317	0,954	0,209	75,87	13	4,25
Hg	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Mo	0,020	0,025	0,013	0,8	0,625	<0,005
Ni	0,043	0,064	0,047	11,57	3,85	1,32
Pb	0,024	0,028	0,014	14,55	4,57	8,05
Zn	0,520	0,222	0,337	42,95	15,25	3,57

ANEXO B - Valores de R e p provenientes das análises de similaridade (ANOSIM) entre os perfis de UTOs das comunidades do Latossolo Vermelho (LV) e Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), após aplicação das concentrações C2 e C4, das vinhaças VA, VB e VC, independentemente do tempo de amostragem

Tratamento	Solo LV		Solo LVA	
	Valor de R	Valor de P	Valor de R	Valor de P
VA 2	0,7424	0,0003	0,6156	0,0006
VA 4	0,6979	0,0003	0,5147	0,0003
VB 2	0,3704	0,0003	0,2952	0,0021
VB 4	0,7439	0,0006	0,7767	0,0003
VC 2	0,69	0,0006	0,3819	0,0009
VC 4	0,361	0,0009	0,3964	0,0003

$R=1$ indica que houve separação total entre os perfis de UTOs analisados e $R=0$ não ocorre separação dos perfis. Valor de p inferiores a 0,01 indicam diferenças significativas dentro de um intervalo de confiança de 99%.