UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

NAISSA MARIA SILVESTRE DIAS

Efeito da aplicação de vinhaça na emissão de gases do efeito estufa e na comunidade desnitrificante e metanogênica do solo

Piracicaba
2013

NAISSA MARIA SILVESTRE DIAS

Efeito da aplicação de vinhaça na emissão de gases do efeito estufa e na comunidade desnitrificante e metanogênica do solo

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profª. Drª. Brigitte Josefine Feigl

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Dias, Naissa Maria Silvestre

Efeito da aplicação de vinhaça na emissão de gases do efeito estufa na comunidade desnitrificante e metanogênica do solo / Naissa Maria Silvestre Dias; orientadora Brigitte Josefine Feigl. - - Piracicaba, 2013.

92f. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1.Archaea metanogênica 2. Bactérias desnitrificantes 3. Cana-de-açúcar 4. Ciclos biogeoquímicos 5. Fertilizantes de residuos industriais 6. Genes funcionais 7. Método cromatográfico 8. Microbiologia ambiental 9. Mudanças climáticas 10. PCR quantitativo I. Título

CDU 504.7 : (631.461 + 574.4)

Ofereço...

Ao meu amado noivo pelo apoio incondicional sempre,

Por toda ajuda científica e emocional,

Mas principalmente por estar sempre ...sempre presente.

Dedico...

À minha mãe guerreira Vanilda Helena Silvestre, exemplo de mulher,

Por toda sua dedicação em minha criação, me ensinando sempre

a nunca desistir.

Agradeço...

....primeiramente à Deus por minha vida e por estar sempre comigo nos bons e maus momentos.

....ao meu noivo Franz Walter, por todas as coletas de gases, solo, infindáveis noites e fins de semana nos laboratórios me acompanhando nas análises, correções, sugestões, mas principalmente, por caminhar sempre ao meu lado.

....à minha família, meus pais Antônio e Vanilda, minha avó amada Clarice, minha irmã Kiara, meus tios e tias, primos, ao amigo José Carlos, meus cunhados Fernando, Alexander, Cleber e Nataniela, meus sogros Franz e Margot e especialmente à princesinha da madrinha, Cecília, porque sempre me apoiaram, amaram, mas acima de tudo sempre foram muito pacientes e compreensivos com a minha ausência.

....à querida professora Dra. Brigitte Josefine Feigl pela orientação, pelos ensinamentos fundamentais à minha evolução profissional, por ter estado presente em todas as fases do meu trabalho e principalmente por sempre conseguir me acalmar nos momentos conturbados. Bri, que Deus conserve esse seu dom de transmitir calma e confiança aos outros.

....à professora Dra. Tsai Siu Mui, pela acolhida em seu laboratório, orientação, apoio financeiro e principalmente por sempre incentivar que sejamos independentes. Saiba que a senhora é uma "mãezona", sempre preocupada com nosso crescimento pessoal e profissional.

....ao professor Dr. Carlos Clemente Cerri, por compartilhar todas as suas idéias, pelas valorosas discussões sobre meu trabalho e pela segurança transmitida.

....ao programa de Pós-graduação do CENA pela oportunidade e apoio.

....ao CNPq e Capes pela concessão da bolsa de estudo para o desenvolvimento deste trabalho.

....à FAPESP pelo auxílio financeiro através de Projeto Temático de Pesquisa.

....aos técnicos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental: Dagmar, Sandra, Admilson e Ralf e em especial à minha querida Lili que não só me auxiliou muito na execução da parte prática do trabalho como também me ouviu, me aconselhou. Lilizinha você é realmente muito especial.

....aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: José Elias Gomes, Fábio Duarte, Chiquinho (*in memoriam*) e principalmente ao Wagnão que sempre nos socorre nos momentos de aflição, resolve nossas crises....kkk....sempre com muito bom humor.

....aos secretários Zezinho e Lud pelo auxílio na parte burocrática e amizade construída. Aos inúmeros momentos de alegria... compartilhados.

....aos eternos companheiros do laboratório de Biologia Celular e Molecular, Enéas, Andressa, Caio, Aline, Fernanda, Bia, Clóvis, Felippe, Camila, Danielle, Maria Júlia, Lucas, Acácio, Patrícia, Lucas Palma, Gustavo, Ana Carolina, Fabiana, Rose, Fernanda Cassieri, João, Paula, Milena, pelo companheirismo sempre e amizade. Ao Dennis e à Tatiana pela ajuda fundamental no desenvolvimento do meu trabalho. Vocês foram demais. Valeu. Em especial às minhas queridíssimas Marcela, Marília e Marina por terem sido meu muro das lamentações e minha fonte de riso durante todo meu mestrado. As pessoas especiais são aquelas que têm habilidade para dividir seu tempo, sua vida com os outros. As pessoas especiais são aquelas que têm habilidade de se doar aos outros e de ajudá-los com as mudanças que surgem em seu caminho. As pessoas especiais são aquelas que realmente tornam a vida bela... Assim como vocês...

....aos queridíssimos colegas da Biogeoquímica Ambiental, Karina, Chico, Marcos, Maisa, Caio, João, Arlete, Ingrid, Leidvan, Gregório, Lucas, Irmãos Formigas, André, Ciniro, Adriana, Felipe, José Geraldo, Taís, pela amizade e convivência, mas em especial à Bruninha que me ajudou muito..muito mesmo na análise e interpretação dos meus resultados. Sua ajuda, paciência e amizade foram fundamentais. Valeu!!

....à Raizen por ceder as áreas de estudo e pela oportunidade de trabalho em conjunto, em especial ao Diego, por sempre atender prontamente minhas necessidades.

....à bibliotecária Marília Ribeiro Garcia Henyei pela minuciosa adequação do trabalho de acordo com as normas e imensa paciência e prontidão no esclarecimento de minhas dúvidas.

....a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada!!

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que éramos ".

(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

DIAS, N.M.S. **Efeito da aplicação de vinhaça na emissão de gases do efeito estufa e na comunidade desnitrificante e metanogênica do solo**. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Existe uma preocupação mundial com as mudanças climáticas causadas pelo aumento da concentração de gases do efeito estufa (GEE) e consequente acréscimo na temperatura média da superfície terrestre. A queima de combustíveis fósseis é a maior causadora do aquecimento global e responsável por danos à saúde humana. É notável o esforço global em diversificar a matriz mundial de combustíveis líquidos, priorizando a substituição de fontes fósseis por renováveis. Tal substituição reforça a necessidade de avaliações de todas as emissões de GEE na cadeia produtiva da cana-de-açúcar. O Brasil é o maior produtor de etanol proveniente de cana-de-açúcar. Um importante co-produto deste processo produtivo é a vinhaça, sendo produzida em elevadas quantidades e constituída por uma expressiva carga orgânica. Esta é comumente aplicada ao solo por fertirrigação. Apesar de atuar beneficamente no solo, pouco se sabe sobre a capacidade deste co-produto de aumentar as emissões de GEE no solo. Assim, o objetivo foi avaliar o efeito da aplicação da vinhaça nas emissões de N_2O e CH_4 e na comunidade de bactérias desnitrificantes e metanogênicas do solo. As amostragens de GEE e solo foram em áreas de cana sem queima a partir da aplicação de doses vinhaça (0, 150, 300 e 450 m^3 ha^{-1}). O delineamento experimental realizado foi em cinco blocos casualizados, totalizando 25 câmaras de coleta de gases do efeito estufa. Amostras de solo foram coletadas em quatro períodos de amostragem após aplicação de vinhaça (0, 7, 15 e 30 dias), em dois anos consecutivos. Foram analisados os GEE, N_2O e CH_4, além da abundancia de genes por meio da técnica de qPCR. A fertirrigação via aplicação de vinhaça no solo, nos dois anos, proporcionou aumento nas emissões de N-N_2O, principalmente nos primeiros dias após a aplicação. Contudo os fluxos de C-CH_4 oscilaram indicando a capacidade do solo de servir ora como fonte ora como sumidouro deste GEE. Os fatores de emissão obtidos para aplicação de N na forma de vinhaça, dose de 300 m^3 ha^{-1}, foram de 0,08% para o primeiro ano e 0,07% para o segundo ano. A partir da técnica de qPCR, a abundância dos genes indicou que a introdução deste resíduo ao solo pode aumentar significativamente o total de bactérias no solo e a atividade do gene *nosZ,* contudo o mesmo não ocorre com o potencial de desnitrificação biológica (gene *nirK*) e nem com o gene *mcrA* (redução de CH_4). Os resultados demonstram que a aplicação da vinhaça no solo influencia as emissões de GEE, assim como a comunidade microbiana do solo.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, genes funcionais, ciclos biogeoquímicos, óxido nitroso, qPCR.

ABSTRACT

DIAS, N.M.S. **Effect of vinasse application on the emission of greenhouse gases and denitrifying and methanogenic soil communities.** 2013. 92f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

There is a global concern with climate change caused by increased concentration of greenhouse gases (GHG) and consequent increase in the average temperature of the Earth surface. Fossil fuels burning is the major cause of global warming and it is responsible for damages to human health. Remarkable global efforts in diversifying liquid fuels have been attempted, giving priority to the replacement of fossil fuels to renewables. Such substitution reinforces the need of an evaluation of all GHG emissions in the production chain of sugarcane. Brazil is the largest producer of ethanol with source from sugarcane. An important co-product of the production process is vinasse, which is being produced in large quantities comprising a significant organic load. This is commonly applied over the ground by fertigation. Despite being good for the soil, little is known about the ability of this co-product of increasing GHG emissions. This work aimed to evaluate the effect of the application of vinasse in the emissions of N_2O and CH_4 and in the soil community of denitrifying and methanogenic bacteria. Sampling of GHG and soil were performed in areas of sugarcane without burning with the application of different vinasse doses (0, 150, 300 and 450 m^3 ha^{-1}). The experiment was conducted in five blocks, totaling 25 collection chambers of greenhouse gases. Soil samples were collected in four sampling periods after application of vinasse (0, 7, 15 and 30 days), in two consecutive years. We analyzed the GHG, N_2O and CH_4, and the abundance of genes by qPCR technique. The fertigation via vinasse application on the ground in two years provided an increase in emissions of N-N_2O, especially in the first couple of days after application. However the flow of C-CH_4 was variable indicating the ability of the soil to serve either as source or as sink of this GHG. The emission factor obtained for N application in the form of vinasse dose of 300 m^3 ha^{-1} was 0.08% for the first year and 0.07% for the second year. By qPCR technique, the abundance of the genes indicated that the use of this residue to the soil can significantly increase the amount of bacteria in the soil and *nosZ* gene activity. However it does not occur with the potential for biological denitrification (*nirK* gene) or with the gene *mcrA* (reduction of CH_4). These results demonstrate that the application of vinasse in the soil influences GHG emissions as well as the soil microbial community.

Keywords: sugarcane, functional genes, biogeochemical cycles, nitrous oxide, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo do nitrogênio e sua versatilidade nos estados de oxidação, potencial redox e fluxo energético no solo (Adaptado por MAÇÃS, 2008).....27

Figura 2 - Etapas metabólicas e micro-organismos envolvidos na produção de metano. (1) Bactérias fermentativas hidrolíticas; (2) Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; (3) Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio; (4) *Archaeas* metanogênicas redutoras de CO_2; (5) *Archaeas* metanogênicas descarboxiladoras de acetato. (Adaptado de CHERNICHARO, 1997 e MCINERNEY & BRYANT, 1981).....30

Figura 3. Genes de bactéria e *archaeas* involvidos no ciclo do nitrogênio no solo (Adaptado de Javier Izquierdo, 2007).....35

Figura 4 - Fluxograma dos estudos realizados no presente trabalho de acordo com as análises empregadas.....37

Figura 5 - Área de coleta em Tanquinho, Distrito de Piracicaba-SP. (A) Mapa do Brasil com destaque em São Paulo; (B) Mapa do estado de São Paulo com destaque em Tanquinho e (C) área de cana-de-açúcar sem queima, pertencente à Usina Costa Pinto.....38

Figura 6 - Temperaturas máxima e mínima e precipitação diária no mês de (A) Novembro de 2011, (B) Novembro de 2012 e (C) Dezembro de 2012.....40

Figura 7 - Coleta de amostras para determinação da densidade do solo. (A) Mini-trincheiras em degraus (0-10, 10-20, 20-30); (B) Anéis volumétricos sem ruptura, amostra indeformada.....42

Figura 8 - Instalação das câmaras na área de cana-de-açúcar com manejo sem queima.....44

Figura 9 - Croqui da disposição dos blocos na área experimental, respeitando 50 m de bordadura. Os tratamentos encontram-se representados por cores; cor branca (solo sem aplicação), azul (dose de 300 m^3 ha^{-1} de água), rosa (dose de 150 m^3 ha^{-1}de vinhaça), laranja (dose de 300 m^3 ha^{-1}de vinhaça) e marrom (dose de 450 m^3 ha^{-1} de vinhaça).....44

Figura 10 - Aplicação dos tratamentos. (A) Delimitação da área amostral (B) aplicação da dose de 300 m^3 ha^{-1} de água, (C) aplicação das doses de vinhaça e (D) perímetro demarcado após a retirada do delimitador.....45

Figura 11 - Coleta de amostras ambientas de GEE, utilizando seringas de nylon BD 20 mL..46

Figura 12 - Medição da altura de três pontos dentro da câmara para posterior cálculo de volume médio.....46

Figura 13 - Coleta de solo na área de cana-de-açúcar sem queima.....48

Figura 14 - Espaço poroso preenchido água (EPPA) durante o período de coleta do primeiro ano experimental (2011).....54

Figura 15 - Espaço poroso preenchido água (EPPA) durante o período de coleta do segundo ano experimental (2012).....54

Figura 16 - Temperatura do solo a 2, 5 e 10 cm de profundidade, amostrados nos blocos experimentais, em 2011 (A) e 2012 (B).....55

Figura 17 - Fluxo diário de N_2O em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011.....56

Figura 18 - Fluxo diário de N_2O em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2012.....57

Figura 19 - Fluxo diário de CH_4 em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011.....60

Figura 20 - Fluxo diário de CH_4 em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2012.....60

Figura 21 - Gel de agarose resultante da extração do DNA genômico das amostras ambientais. Padrão molecular: 100 pb.....65

Figura 22 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene 16S rRNA e (B) curva de *melting*das amplificações do gene 16S rRNA.....66

Figura 23 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene *nirK* e (B) Curva de *melting* das amplificações do gene *nirK*.....69

Figura 24 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene *nosZ* e (B) Curva de *melting* das amplificações do gene *nosZ*.....70

Figura 25 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene *mcrA*e (B) Curva de *melting* das amplificações do gene *mcrA*.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas da camada 0-10 cm do solo em estudo, nos anos de 2011 e 2012, antes da aplicação dos tratamentos.....41

Tabela 2 - Características químicas da vinhaça aplicada em 2011 e 2012.....43

Tabela 3 - Fluxos acumulados de N_2O em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011 e 2012.....58

Tabela 4 - Fluxos acumulados de CH_4 em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011 e 2012.....62

Tabela 5 - Conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 equivalente do primeiro ano experimental.....63

Tabela 6 - Conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 equivalente do segundo ano experimental.....63

Tabela 7 - Quantificação do gene 16S rRNA, comunidade total de bactéria, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça.....67

Tabela 8 - Quantificação do gene *nirK*, potencial de desnitrificação, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça.....69

Tabela 9 - Quantificação do gene *nosZ* , potencial de desnitrificação, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça.....70

Tabela 10 - Quantificação do gene *mcrA* , archaeas metanogênicas, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça.....72

Tabela 11 – Correlação de Pearson para as variáveis analisadas.....74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
A	Área
ANOVA	Análise de variância
AR4	Quarto Relatório de Avaliação
BD	Becton Dickinson
cm	Centímetros
Ct	Carbono total
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECD	Detector de captura de elétrons
EPA	Environmental ProtectionAgency
eq	Equivalente
FID	Detector de ionização de chama
g	Grama
GEE	Gases do efeito estufa
ha	Hectare
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
Kg	Quilograma
KPa	Quilopascal
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMO	Enzima monoxygenase
mmolc	Milimolar de carga
nm	Nanomolar
Nt	Nitrogênio total
P	Pressão

PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
ppbv	Partes por bilhão em volume
PVC	Cloreto de polivinilo
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundo
SAS	StatisticalAnalysis System
TM	Temperatura de*melting*
Tris	Tris- (hidroximetil) – aminometano
V	Volt
VM	Volume molar
x g	Força centrífuga relativa
PAG	Potencial de Aquecimento Global
Eh	Potencial redox
CTC	Capacidade de troca catiônica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO DA LITERATURA 24
2.1 Emissão de gases de efeito (GEE) estufa na agricultura 24
2.2 Fluxos de óxido nitroso 26
2.3 Fluxos de metano 29
2.4 Vinhaça no solo 31
2.5 Comunidades microbianas envolvidas nos fluxos de óxido nitroso e metano e seu estudo através de técnicas moleculares 33
3 MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1 Localização e caracterização da área de Estudo 38
3.2 Caracterização físico-química da área de estudo 40
3.3 Densidade, Carbono e Nitrogênio total 41
3.4 Caracterização da vinhaça 42
3.5 Delineamento experimental 43
3.6 Amostragem e quantificação dos fluxos de GEE 45
3.7 Amostragens e análises microbianas 48
3.7.1 Extração de DNA das amostras de solo 49
3.7.2 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) 50
3.8 Análises estatísticas 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
4.1 Efeito das doses de vinhaça sobre as taxas de emissão de metano e óxido nitroso 53
4.1.1 Espaço poroso preenchido por água (EPPA) e temperatura do solo 53
4.1.2 Fluxos de N-N_2O 55
4.1.3 Fluxos de C-CH_4 59
4.1.4 Conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente (CO_2e) 62
4.1.5 Fator de emissão de N_2O devido à aplicação de vinhaça no solo 63

4.2 Efeito das doses de vinhaça sobre a comunidade microbiana do solo 64
4.2.1 Extração de DNA 64
4.2.2 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR)..... 65
4.2.2.1 Análise da abundância da comunidade bacteriana do solo 65
4.2.2.2 Comunidade desnitrificante 67
4.2.2.3 Comunidade metanogênica 71
5 CORRELAÇÕES DAS VARIÁVEIS BIOLÓGICAS COM AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS 73
6 CONCLUSÕES 74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 75

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas observadas nos últimos 100 anos resultam tanto de processos naturais como antrópicos e devem afetar o processo produtivo e o estilo de vida da humanidade (AYROZA, 2011; MARIN; NASSIF, 2013). A América Latina, com 8,5% da população global, é responsável por 12% das emissões de gases de efeito estufa (GEE) mundiais, sendo os três principais: metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) e dióxido de carbono (CO_2). Ainda que sua responsabilidade pelo aquecimento do planeta seja menor que a dos países desenvolvidos, a América Latina tem extrema importância em relação ao futuro da alteração do clima (HONTY, 2009).

O Brasil é um dos principais emissores de GEE. Diferentemente dos demais países, onde as emissões se devem principalmente a queima de combustíveis fósseis, a maior parte das emissões em território brasileiro estão associadas ao desmatamento A retirada da vegetação nativa ocorre de maneira mais intensa em algumas áreas, como por exemplo na região Amazônica, devido à crescente expansão de áreas para desenvolvimento da agricultura e pecuária (CERRI et al., 2007; 2009).

Eventos climáticos extremos, os quais podem se tornar mais frequentes devido ao acúmulo destes gases na atmosfera, podem afetar severamente países como o Brasil, que dependem fortemente de recursos naturais e comércio de "commodities", principalmente do ponto de vista econômico e social (MARIN; NASSIF, 2013).

O setor sucroenergético vem sendo responsável por grande parte do desenvolvimento do Brasil. Na safra de 2011/2012, o país produziu aproximadamente 494 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, das quais 48,4% (238,7 milhões de toneladas) foram para a fabricação de açúcar e 51,6% (254,5 milhões de toneladas) para a produção de etanol (UNICA, 2013).

No cenário nacional, o Estado de São Paulo ocupa posição de destaque, tendo gerado pouco mais de 21 milhões de toneladas de açúcar e 11,5 trilhões de litros de etanol. Desse modo, foi responsável por 56% da produção deste combustível e 67% da produção de açúcar de todo o país (UNICA, 2013).

Cabe ressaltar, no entanto, que a produção desses grandes volumes de açúcar a álcool tem como consequência a produção de quantidades elevadas de uma série de co-produtos, como por exemplo, vinhaça, torta de filtro e bagaço. A vinhaça é considerada o principal resíduo da indústria sucroenergética. Para cada litro de etanol produzido são gerados em torno

de 10 a 18 litros de vinhaça, volume este dependente das condições operacionais e das instalações em uso (KUMAR et al., 1998; WADT, 2008). Esta é rica em nutrientes, principalmente potássio (K), e possui elevada carga orgânica (SILVA et al., 2007).

O uso deste resíduo na agricultura gera diversos benefícios, tanto do ponto de vista agronômico, econômico, quanto social (BARROS et al., 2010). Contudo, há uma grande discussão quando o assunto é sustentabilidade ambiental, já que não se sabe ao certo qual o impacto da vinhaça nos diferentes compartimentos, como por exemplo, o solo (OLIVEIRA et al., 2013).

A vinhaça pode promover melhoria na fertilidade do solo. Entretanto, cabe ressaltar que para alcançar tal objetivo, as quantidades aplicadas devem manter-se dentro da capacidade de retenção de íons do mesmo, isto é, as dosagens necessitam ser calculadas de acordo com as características de cada solo, já que este resíduo possui quantidades variáveis de elementos orgânicos e minerais, podendo ocorrer a lixiviação de vários desses íons, sobretudo do potássio e nitrato (SILVA et al., 2007).

Mesmo considerando as vantagens proporcionadas pela adoção da fertirrigação, existem dúvidas acerca da adequação da prática do ponto de vista da proteção do meio ambiente, principalmente quando considerados seus efeitos a longo prazo no solo (HASSUDA, 1989).

Em estudo recente, CARMO et al. (2012) verificaram que a aplicação de vinhaça em áreas cultivadas com cana-de-açúcar no Brasil levou a um aumento das emissões de GEE a partir do solo. A quantificação de tais emissões durante o processo de produção do etanol, como aquelas associadas ao manejo do solo, aplicação de insumos, dentre outras, têm ganhado foco, já que não se tem muito conhecimento sobre a sua magnitude e tampouco sobre suas consequências no que se refere ao aquecimento global. A escassez de trabalhos científicos comprova tal fato.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (*Environmental Protection Agency –EPA*), 2010, o etanol é capaz de reduzir em 61% as emissões de GEE quando comparado ao combustível mais amplamente utilizado, a gasolina. Tal substituição reforça ainda mais a necessidade de avaliações de todas as emissões de GEE, ao longo da cadeia produtiva da cana-de-açúcar. Desenvolver formas de manejo e métodos de produção do etanol de cana-de-açúcar buscando um melhor desempenho ambiental tornou-se crucial (COSTA, 2010).

Com base na hipótese de que a aplicação de vinhaça ao solo aumenta a disponibilidade de nitrogênio (N) e carbono (C) para a microbiota endêmica e que, portanto, é capaz de

provocar alterações nos ciclos biogeoquímicos de tais elementos, o principal objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito dessa prática agrícola sobre as taxas de emissão de N_2O e CH_4 e sobre a comunidade de bactérias desnitrificantes e metanogênicas do solo.

Para atingir o objetivo principal foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Quantificar a emissão dos principais GEE proveniente da aplicação de três doses de vinhaça no solo, durante o período chuvoso de dois anos consecutivos;
- Detectar de forma quantitativa a alteração da abundância dos genes envolvidos na dinâmica do CH_4 e N_2O no solo por meio de qPCR (PCR quantitativo) em consequência da aplicação de vinhaça;
- Correlacionar variáveis ambientais com as emissões de GEE e com a comunidade metanogênica e desnitrificante para verificar possíveis influências.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Emissão de gases de efeito estufa (GEE) na agricultura

Os solos têm papel determinante nos "*pools*" de gases atmosféricos (NYBORG et al., 1995). São fundamentais nos ciclos do C e N, cooperando como indispensável fonte e reserva desses elementos. Por este motivo, a atividade agrícola deve usufruir desses recursos naturais de maneira sustentável, evitando assim grandes impactos sobre o ambiente (ESCOBAR, 2008). Pelo fato de os solos poderem assumir tanto papel de fonte como dreno de GEE (JOHNSON et al., 2005), seu uso e manejo interferem no fluxo dos mesmos (LAL et al., 1995; LIEBIG et al., 2005).

A agricultura contribui de maneira significativa com a produção de GEE no território brasileiro, sendo responsável por 75% das emissões totais de CO_2, 91% das emissões de CH_4 e 94% das emissões de N_2O (CERRI; CERRI, 2007). Sendo assim, pode-se dizer que o efeito estufa antrópico é em grande parte consequência das atividades agrícolas, sendo necessária a elaboração e implantação de sistemas de manejo do solo que possibilitem a mitigação de emissões de tais formas gasosas (REICOSKY, 1997; JANZEN et al., 1998; BAYER et al., 2000).

Considerando esta vertente, mitigar significa que o homem precisa intervir, desenvolvendo sistemas que venham a diminuir as emissões ou que aumentem os drenos de GEE (ROBERTSON; GRACE, 2004; METZ et al., 2005). Mas para que isso ocorra, o primeiro passo necessário é a quantificação dos fluxos nos principais sistemas agrícolas.

Discussões sobre formas de redução da emissão dos GEE tornaram-se bastante comuns. Segundo Ometto et al. (2009), uma das maneiras de reduzir essa emissão é através da substituição dos combustíveis fosseis por bicombustíveis, tendo como alvo o etanol proveniente da cultura da cana-de-açúcar. O Brasil apresenta grande potencial para o desenvolvimento desta cultura, dispondo de áreas, solos e clima adequados (PISSIONI, 2011).

De acordo com o Quarto Relatório de Avaliação (AR4), apresentado pelo IPCC (2007), as estimativas de aumento de temperatura média global concentram-se na faixa de 1,8 a 3,6 °C e a concentração de CO_2 poderá atingir 720 ppm, ambos até 2099, sendo estas taxas diretamente relacionadas ao cenário de emissão de GEE considerada nos modelos climáticos (TRENBERTH et al., 2007). Bombardi e Carvalho (2008) projetaram que na região Centro-

oeste do Brasil haverá uma intensificação nos eventos climáticos e é nesta região que se localizam as maiores áreas de expansão da cana-de-açúcar.

Este cenário instável é especialmente importante para esta cultura, visto que a mesma apresenta um ciclo relativamente longo. Entretanto, a cana de açúcar é uma planta de metabolismo C4, que apresenta mecanismo de concentração de CO_2 nas células do mesófilo (ALLEN et al., 1985), o que garante que a espécie seja afetada em menor extensão pelo aumento da concentração de CO_2 do que as plantas C3, devido ao fechamento parcial dos estômatos e consequente redução da condutância estomática e da transpiração (MARIN; NASSIF, 2013). Este mecanismo é uma vantagem para a cultura da cana-de-açúcar frente ao aumento das concentrações de GEE.

Embora a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar seja uma estratégia interessante relacionada a mitigação das emissões de GEE, vale lembrar que o processo produtivo da cana-de-açúcar também leva a emissões consideráveis de CO_2, N_2O e CH_4 (OMETTO et al., 2009). Umas das etapas contribuintes é a colheita, que quando precedida da queima da palhada libera grandes quantidades de gases para a atmosfera. No entanto quando o sistema adotado é o de colheita mecânica, a qual não requer a queima prévia, há uma significativa redução das emissões de GEE (CAMARGO et al., 2008).

Neste sistema, a palha permanece sobre o solo, ficando condicionada ao processo de decomposição microbiana. Isso permite uma ciclagem natural dos nutrientes, fonte de alimento para a fauna edáfica, cobertura do solo e eventual fixação de C no solo (PASQUALIN, 2009). Este sistema atende também as exigências do mercado internacional, sendo que as importações só se concretizam se o bicombustível não estiver relacionado com impactos socioambientais severos (CAMARGO et al., 2008).

Além dos sistemas de manejo, a utilização de resíduos ou co-produtos, do setor sucroenergético, pode contribuir significativamente com a mitigação das emissões de GEE pela agricultura (CERRI et al., 2010). A vinhaça, no entanto pode levar a um aumento das emissões, principalmente de CH_4, devido ao processo de decomposição que sofre, já que é em grande parte armazenada e distribuída a partir de sistemas de distribuição com predominante anaerobiose (OLIVEIRA, 2010).

A forma como os resíduos culturais são incorporados e o grau de revolvimento do solo podem provocar drásticas alterações na temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes, aeração do solo e nos teores de substratos orgânicos. Sendo assim, o tipo de manejo adotado

pode afetar tanto a estrutura quanto a atividade das comunidades microbianas do solo, incluindo aquela envolvida na emissão dos GEE (VARGAS; SCHOLLES, 2000).

As mudanças no uso da terra e agricultura promovem alterações significativas na dinâmica dos micro-organismos, quantidade de resíduos vegetais depositados e também na eficiência de utilização do C pela microbiota do solo. Todos esses são fatores capazes de determinar a imobilização ou liberação de nutrientes no solo (BAUDOIN et al., 2003). Como essa ciclagem pode interferir diretamente nas emissões de GEE para a atmosfera, essas alterações que o homem provoca na paisagem podem ser consideradas as ações antrópicas que mais contribuem para o aumento das emissões de CO_2, N_2O e CH_4 (FRAZÃO, 2007).

2.2 Fluxos de óxido nitroso

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre e pode ser encontrado em todos os seres vivos. Este elemento possui dois isótopos estáveis e forma o gás nitrogênio (N_2) caracterizado como insípido, inodoro e incolor e que constitui aproximadamente 78% do volume atmosférico (SCHAEFER, 2011). O N é integrante de diversos compostos em plantas, principalmente aminoácidos, clorofila e ácidos nucleicos. Sendo assim, reações químicas essenciais para plantas e micro-organismos envolvem este nutriente (CANTARELLA, 2007).

Além disso, este elemento é bastante flexível nas reações de oxirredução, podendo ser encontrado nas formas bastante reduzidas (-3), até muito oxidadas (+5) (Figura 1). Isso lhe atribui significativa importância no metabolismo de plantas e nos ciclos biogeoquímicos (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

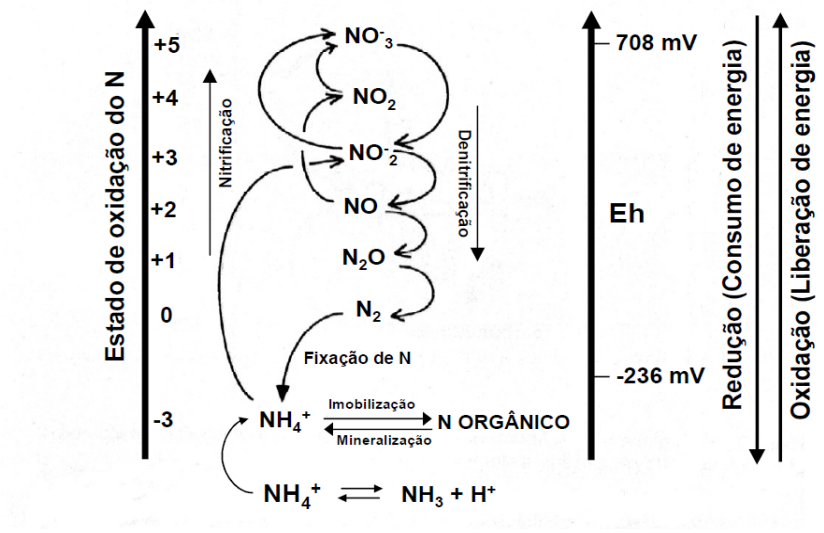


Figura 1 - Ciclo do nitrogênio e sua versatilidade nos estados de oxidação, potencial redox e fluxo energético no solo (Adaptado por Maçãs, 2008)

O N possui importante papel em praticamente todos os ecossistemas, podendo tornar-se um preocupante poluente quando há transferência deste entre ecossistemas. Este autor ainda afirma que o transporte de N nas formas amoniacais e compostos orgânicos ocorrem na superfície do solo, enquanto que os óxidos nítrico e nitroso pela atmosfera e o NO_3^- por meio de eventos como lixiviação. Vale ressaltar que grande parte da amônia e óxidos de nitrogênio na atmosfera provém de processos biológicos (CANTARELLA, 2007), sendo que dentre os óxidos constituintes da atmosfera, o mais abundante é o oxido nitroso (N_2O).

O N_2O é caracterizado como um gás incolor e não tóxico, porém representa uma ameaça ambiental. Este gás retém o calor proveniente das radiações solares resultando em aumento de temperatura. É considerado um dos três principais gases causadores do efeito estufa e seu potencial de aquecimento global (PAG) é 298 vezes em base molecular, superior ao CO_2 (IFA, 2001; ADDISCOTT, 2004), isto é, absorve cerca de 298 vezes mais radiação infravermelha do que o CO_2. Portanto quando isolado o impacto desse GEE, expresso em termos de dióxido de carbono equivalente (CO_2eq) sua contribuição cresce consideravelmente de 0,03% para aproximadamente 10% das emissões globais (IPCC, 2007).

Diferentemente dos outros óxidos que tem tempo de residência na atmosfera de poucos dias, o N_2O pode residir por um período de 70 a 150 anos (IPCC, 2007). Entre os anos 1750 e 2000, a concentração de N_2O na atmosfera teve um acréscimo ao redor de 16%, passando de 270 para 320 ppbv, com taxa média de aumento de 0,8 ppbv ano^{-1} (IPCC, 2007).

Este gás, após sofrer fotodecomposição, atua como catalisador da molécula de ozônio (O_3), afetando assim as concentrações de ozônio estratosférico, devido à sua capacidade de reagir com o oxigênio atômico e formar óxido nítrico (HARISSON, 1995). Esta é mais uma evidência do relevante papel que o N_2O desempenha na camada de ozônio e consequentemente no aquecimento global.

As emissões de N_2O se dividem em naturais e antrópicas. Entre as fontes naturais mais citadas estão solos de vegetação nativa, atmosfera e oceanos, que contribuem com 62% das emissões deste GEE. Já as principais fontes antrópicas, responsáveis por 38% das emissões de N_2O, estão relacionadas à aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos, ricos em N, a deposição de dejetos animais em solos agrícolas e a queima de biomassa e combustíveis fósseis (CERRI et al., 2009).

A maior parte das emissões naturais de N_2O origina-se através de dois processos biológicos, conhecidos como nitrificação e desnitrificação. Os substratos NH_4^+ (amônio) e NO_3^- (nitrato) utilizados na produção de N_2O podem adentrar o solo sob diversas formas. O nitrogênio atmosférico (N_2) pode sofrer fixação biológica pelos micro-organismos e conversão à NH_4^+ pelas bactérias fixadoras de N. Parte deste NH_4^+ é consumida pelas plantas e micro-organismos e parte é oxidada a NO_3^- pelo processo de nitrificação (SCHMIDT, 1982).

A nitrificação ocorre em duas etapas: nitritação, em que o NH_4^+ é oxidado a nitrito (NO_2^-), por meio das bactérias *Nitrosococus* sp., *Nitrosospira* sp. e *Nitrosomonas* sp.; e nitratação, em que o NO_2 é oxidado a NO_3^- pelas bactérias *Nitrococus* sp., *Nitrospira* sp. e *Nitrobacter* sp. (MOREIRA;SIQUEIRA, 2006). A nitrificação é favorecida por condições de umidade no solo entre 35 à 60% do espaço poroso preenchido por água (EPPA) (KHALIL et al., 2004; BATEMAN; BAGGS, 2005; COSTA et al., 2008). Segundo Snyder et al. (2009) em condições anaeróbias ocorre o acúmulo de NO_2^- no solo, onde bactérias nitrificadoras o utilizam como aceptor final de elétrons e posterior formação de NO e N_2O por desnitrificação.

O processo de desnitrificação ocorre em ambientes estritamente anaeróbicos. Neste processo ocorre a oxidação do NO_3^- à N_2, pela ação de bactérias anaeróbias facultativas, as quais representam de 0,1 a 5% da população total de bactérias do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Na rota de desnitrificação o N, utilizado como receptor de elétrons,sofre uma oxidação sucessiva até a formação do produto final, N_2. O produto intermediário obrigatório resultante do incompleto processo de desnitrificação é o N_2O (DE KLEIN; ECKARD, 2008; SINGH et al., 2010). Este processo é facilitado em solos com mais de 70% dos EPPA (RUSER et al., 2006). Vale ressaltar que os picos de emissão de N_2O do solo geralmente são atribuídos a desnitrificação (WRAGE et al., 2001; LEE et al., 2006).

Além dos processos de nitrificação e desnitrificação, emissões de N_2O podem ser resultado da degradação microbiana de materiais biológicos de oceanos (LASSEY; HARVEY, 2007) e também de processos não biológicos como quimiodesnitrificação e a redução química da hidroxilamina (NH_2OH) (STEVENS; LAUGHLIN, 1998). A quimiodesnitrificação é a decomposição química do nitrito acumulado no solo e concomitante reação com compostos orgânicos, tendo como produto final N_2O e N_2. Enquanto a redução química da hidroxilamina (produto intermediário na conversão de NH_4^+ à NO_2^-) ocorre a partir da reação desta com o NO_2^-e também resulta na produção de N_2O (BREMMER, 1997).

A formação e a emissão de N_2O por processos de nitrificação e desnitrificação é resultado de complexas interações entre a microbiota do solo e seus fatores físicos e químicos. A nitrificação é influenciada principalmente por temperatura e densidade do solo, já a desnitrificação sofre maior influência do potencial redox (Eh) do solo e do EPPA (DAVIDSON; SWANK, 1986).

2.3 Fluxos de metano

O metano (CH_4), principal hidrocarboneto presente na atmosfera, vem aumentando a uma taxa de 7 ppbv ano^{-1} (IPCC, 2007). Este gás apresenta curto tempo de residência na atmosfera, aproximadamente 12 anos, contudo este GEE tem potencial de absorção de radiações infravermelhas 25 vezes maior que o CO_2, sendo considerado o segundo gás de relevante importância no efeito estufa antrópico (IPCC, 2007).

Este GEE é liberado para a atmosfera a partir da superfície terrestre, tendo fontes naturais (áreas alagadas, oceanos, rios e hidratos de metano) e antrópicas (combustíveis fósseis, cultivo de arroz irrigado, fermentação entérica, queima de biomassa, dejetos de animais e tratamento de esgotos domésticos) (WATSON, et al., 1990; AMSTEL, 1998).

A formação de CH_4 no solo depende da condição de aeração deste compartimento. Em solos aeróbios, o processo predominante é a oxidação do CH_4 a CO_2. Este processo é conhecido como metanotrofia e, neste caso, o solo atua como dreno deste GEE (WANG; INESON, 2003; CERRI, et al., 2010). Em solos anaeróbios, o CH_4 é produto final da decomposição anaeróbia de materiais orgânicos. Este processo é chamado de metanogênese e quando ocorre em maior intensidade faz com que o solo atue como fonte de CH_4 (CERRI, et al., 2010; YOSHIDA, 1978; LE MER; ROGER, 2001).

Segundo Singh et al. (2010), a metanogênese é responsável pela emissão de 250 milhões de toneladas de metano para a atmosfera por ano, sendo este processo precedido de diversas etapas através do metabolismo de diversos micro-organismos (MCINERNEY; BRYANT, 1981; CHERNICHARO, 1997), conforme Figura 2.

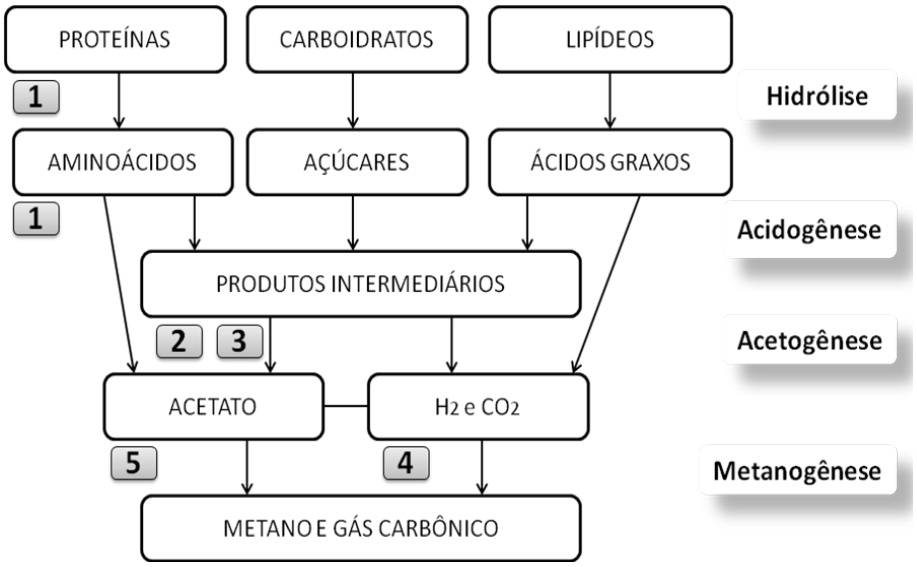


Figura 2 - Etapas metabólicas e micro-organismos envolvidos na produção de metano. (1) Bactérias fermentativas hidrolíticas; (2) Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; (3) Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio; (4) *Archaeas* metanogênicas redutoras de CO_2; (5) *Archaeas* metanogênicas descarboxiladoras de acetato. (Adaptado de Chernicharo, 1997 e Mcinerney; Bryant, 1981).

A formação de CH_4 envolve diversas etapas como demonstrado acima. A primeira etapa é a hidrólise de polímeros em materiais dissolvidos mais simples, através de exoenzimas excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas. Nesta fase, as proteínas sofrem degradação por polipeptídeos, formando os aminoácidos. Os carboidratos são convertidos em açúcares solúveis e os lipídeos transformam-se em ácidos graxos de cadeia longa (LETTINGA et al., 1997).

Na etapa seguinte, acidogênese, os produtos gerados na hidrólise são absorvidos nas células das mesmas bactérias fermentativas. Posteriormente são excretados como ácidos orgânicos, alcoóis e dióxido de carbono (NOVAIS, 1986).

A acetogênese é a próxima fase. Nesta ocorre a oxidação dos produtos da fermentação acidogênica em substrato necessário para as *archaeas* metanogênicas. Os produtos gerados são acetato, H_2 e CO_2 (CHERNICHARO, 1997).

Finalmente, ocorre a última etapa de degradação anaeróbica de compostos orgânicos em CH_4 e CO_2, a metanogênese. Esta é realizada de duas formas: metanogênese hidrogenotrófica ou metanogênese acetotrófica. Na hidrogenotrófica os micro-organismos são capazes de produzir metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono, isto é, o CO_2 como aceptor de elétrons é posteriormente reduzido a CH_4. No caso da metanogênese acetotrófica, os micro-organismos tem a função de converter o carbono orgânico na forma de acetato em metano (MCINERNEY; BRYANT, 1981; SOUBES, 1994; CHERNICHARO, 1997).

É evidente a necessidade de interação dos microorganismos fermentativos e metanogênicos no processo de formação do CH_4. Contudo, as *archaeas* metanogênicas são consideradas mais vulneráveis às mudanças das condições ambientais e requerem uma atenção especial (CHERNICHARO, 1997). Apesar de já existir um grande número de estudos a respeito dos micro-organismos envolvidos na produção deste GEE, ainda existem muitas questões a serem respondidas quanto ao fluxo terrestre do CH_4 (ZOTELLI, 2012).

As emissões de CH_4 provêm principalmente de queima de biomassa, criação de ruminantes, dejetos animais, cultivos em terras alagadas, aterros e queima de combustíveis fósseis (DENMAN et al., 2007; FORSTER et al., 2007; IPCC, 2007). O manejo de subprodutos resultantes principalmente do setor agrícola, como a vinhaça, por exemplo, também exerce importante papel na emissão de GEE pelo solo (OLIVEIRA, 2010; CARMO et al., 2012).

2.4 Vinhaça no solo

Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias no Brasil é o grande volume de resíduos gerados. No setor sucroenergético, o principal resíduo é a vinhaça (WADT, 2008). A utilização intensiva da vinhaça nos solos cultivados com cana-de-açúcar surgiu devido à produção de mais de 150 bilhões de litros desse resíduo por safra, ou seja, cerca de 1.000 litros de efluentes líquidos por tonelada de cana-de-açúcar moída (RODELLA; FERRARI, 1977), que anteriormente eram, em grande parte, despejados nos rios e lagoas nas redondezas das usinas e destilarias.

A vinhaça é considerada um co-produto pelas usinas de cana-de-açúcar, sendo resultado final da fermentação e destilação do etanol. Segundo um levantamento feito pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, 2012), a taxa média de produção de vinhaça na safra

de 2011/2012 foi de 15 litros por litro de etanol produzido. Este subproduto, quando descartado em corpos hídricos, causa sérios impactos ambientais. No entanto, se corretamente aplicado ao solo, favorece tanto a cultura como os micro-organismos do solo, já que contém expressiva quantidade de matéria orgânica e cátions como o K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} (PASQUALIN, 2009).

Em virtude dos elevados níveis de nutrientes, a maior parte do setor de destilaria brasileira tem adotado sua utilização na fertirrigação (CUNHA et al., 1981). A vinhaça pode ser usada para melhorar a fertilidade do solo; entretanto, deve-se estar atento as quantidades, pois estas devem manter-se dentro da sua capacidade de retenção de íons, o que é variável para cada tipo de solo (SILVA et al., 2007). Mesmo considerando as vantagens proporcionadas pela adoção da fertirrigação, existem dúvidas quanto à adequação da prática do ponto de vista da proteção do meio ambiente, principalmente quando considerados seus efeitos em longo prazo no solo (HASSUDA, 1989). Existem critérios e procedimentos para dosagem e aplicação de vinhaça no solo agrícola que seguem as normas estabelecidas pela CETESB / P4. 231 /dez./06, a fim de evitar a poluição do solo e das águas.

Mudanças nas propriedades químicas do solo, decorrentes da aplicação desse resíduo, podem alterar a estabilidade de agregados e a dispersão de argilas do solo, influenciando assim a sua compactação. Isso pode ter como principais consequências: o aumento da densidade do solo, a diminuição do tamanho dos poros e a redução da condutividade hidráulica (KLEIN; LIBARDI, 2002).

A vinhaça também contribui com o aumento da população e atividade microbiana no solo. O pH do solo nos primeiros dez dias após sua aplicação sofre uma redução considerável para, posteriormente, elevar-se abruptamente (SILVA; RIBEIRO, 1998) principalmente em áreas cultivadas há mais tempo, podendo alcançar valores de pH > 7. Este efeito se deve à ação dos micro-organismos (ROSSETTO, 1987).

A matéria orgânica contida na vinhaça quando incorporada no solo, passa a ser colonizada por fungos e transformada em húmus, que neutralizam a acidez. Assim, a proliferação bacteriana é estimulada, bem como o desenvolvimento de micro-organismos que atuam em processos ligados ao N, como mineralização, imobilização, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica, e também micro-organismos participantes dos ciclos biogeoquímicos de outros elementos (SILVA et al., 2007).

Existem vários estudos do uso da vinhaça no solo como fertilizante e seus impactos neste compartimento, porém existem poucas pesquisas direcionadas à contribuição desse resíduo nas emissões de GEE em solos agrícolas (ZOTELLI, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

A emissão de CH_4 como resultado da aplicação de vinhaça, tem despertado interesse tanto da comunidade cientifica como do setor produtivo, considerando sua ação desde sistemas de armazenamento até a aplicação na lavoura.

Inventários de GEE do processo produtivo da cana-de-açúcar consideram que o valor referência de 1% do nitrogênio aplicado no solo, via vinhaça, é convertido a N_2O (IPCC, 2006; SEABRA; MACEDO, 2007; MACEDO; SEABRA., et al., 2008). Entretanto em um estudo recente, Oliveira et al. (2013) demonstraram que a quantidade de N do resíduo que é convertida a essa forma gasosa é menor. Tal fato ressalta ainda mais a importância de estudos deste resíduo e sua contribuição na emissão de gases do efeito estufa.

2.5 Comunidades microbianas envolvidas nos fluxos de óxido nitroso e metano e seu estudo através de técnicas moleculares

Os solos desempenham um importante papel como fonte e dreno de gases do efeito estufa em quase todos os ecossistemas terrestres. Os três diferentes GEE, CO_2, N_2O e CH_4 são frutos da atividade microbiológica. O CO_2 é fixado por fotossíntese e sua liberação é resultado do metabolismo energético dos microrganismos (MARSTORP, 1996), o N_2O pode tanto ser produzido pelos processos de desnitrificação e nitrificação, como ser oxidado a N_2 (FIRESTONE; DAVIDSON, 1989). E o CH_4 pode ser produzido, através de micro-organismos metanogênicos (BOHRZ, 2011) ou oxidado por bactérias metanotróficas (MOSIER et al., 2004), o que dependerá das condições ambientais.

Existe uma grande necessidade de entendimento das inter-relações entre os micro-organismos e o ambiente, sendo que as mesmas podem ser elucidadas através do estudo da estrutura e da diversidade funcional da microbiota do solo e de como estas respondem aos diversos distúrbios, tanto naturais como antrópicos (RANJARD et al., 2000).

Os micro-organismos têm importante função na produção e consumo de CO_2, N_2O e CH_4, pois sobrevivem e ganham energia através da quebra das ligações de carbono dos compostos orgânicos dissolvidos (LI, 2007). No âmbito solos, o CO_2, N_2O e CH_4 podem ser produzidos ou consumidos pelas atividades microbianas, sendo estas reguladas pelo potencial redox do solo e a disponibilidade de carbono orgânico dissolvido (LI, 2007).

Quando o assunto é CH_4, deve-se levar em conta que a oxidação deste é feita por bactérias metanotróficas, as quais são aeróbias obrigatórias. Isto porque a enzima

monoxigenase (MMO), responsável pelo primeiro passo da oxidação, precisa de O_2 molecular (MOSIER et al., 2004). A emissão ou consumo de CH_4 tende a variar conforme a natureza do sistema agrícola adotado e suas referidas as práticas (MOSIER et al., 2004).

Os micro-organismos metanogênicos, responsáveis pelo processo de metanogênese, estão classificados na ramificação euriarqueal do Domínio *Archaea* (WOESE; FOX, 1977; REEVE et al., 1997). A principal característica desses micro-organismos é a especialidade catabólica (VAZOLLER, 1995). Podem ser encontrados em diversos hábitats anaeróbicos, como por exemplo, solos inundados, pântanos, trato gastrointestinal de animais, sistemas de armazenamento e distribuição de alguns resíduos, como vinhaça, dentre outros (OLIVEIRA, 2010). Estudos tem usado o gene *mcrA* (Metil Coenzima M Redutase), associado a metanogênese, para investigação de diversidade de metanogênicas em amostras ambientais (LUTON et al., 2002; WILMS et al., 2007; ORPHAN et al., 2008; TAKETANI et al., 2010). Este gene se mostrou conservado entre micro-organismos metanogênicos (DHILLON et al.,2005).

A utilização dos chamados genes funcionais é muitas vezes considerado como uma ferramenta poderosa para os grupos de estudo de organismos associados com um determinado processo metabólico (TAKETANI et al., 2010).

A emissão de N_2O por nitrificação ou desnitrificação é dependente do grau de oxigenação do solo. Quando o solo está sob baixa saturação de água prevalece o processo de nitrificação. No entanto, quando esta condição é inversa, a desnitrificação é predominante (JANTALIA et al., 2006). Em solos agrícolas, de acordo com Dalal et al. (2003) e Nevison (2000), o processo de desnitrificação prevalece como o principal mecanismo de formação de N_2O. Esse fato justifica vários estudos envolvendo genes funcionais (Figura 3) que codificam subunidades de enzimas envolvidas no processo de desnitrificação, principalmente *nirK, nirS, cnorB e nosZ* (MORALES, et al., 2010; DANDIE et al., 2011; FAGERSTONE et al., 2011).

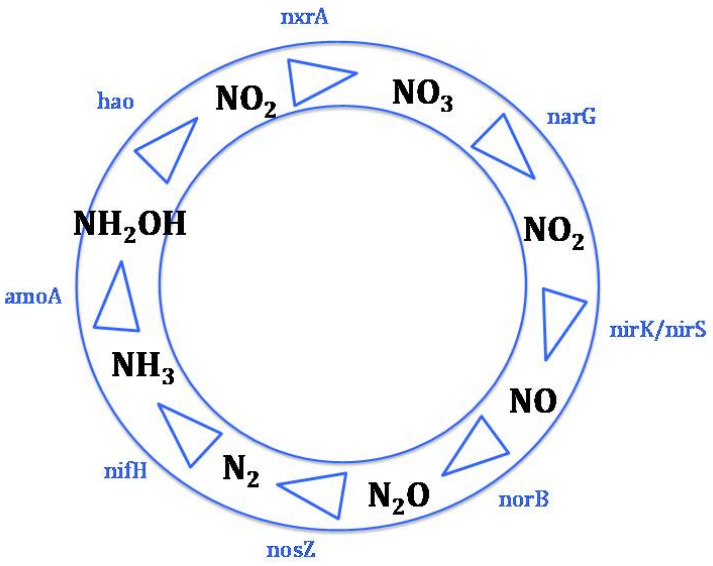


Figura 3 - Genes de bactérias e *archaeas* involvidos no ciclo do nitrogênio no solo (Adaptado de Javier Izquierdo, 2007)

Quantificações de taxas de processos microbianos, desnitrificação, por exemplo, ou até mesmo de seus produtos, emissão de N- N_2O são formas fáceis de investigar como impactos ambientais podem interferir na funcionalidade de uma comunidade (ALLISON; MARTINY, 2008). Tal verificação também pode ser feita através do estudo de grupos microbianos específicos (PAULA, 2012).

A estrutura da comunidade microbiana de um determinado ambiente, sua função e sua dinâmica têm sido foco de muitos estudos de ecologia microbiana (WAGNER et al., 2005). Nos últimos anos, técnicas baseadas na análise de genes do 16S rRNA em procariotos (MUYZER et al., 1993) têm sido amplamente utilizadas na detecção, identificação, classificação e filogenia de micro-organismos.

A diversidade das comunidades de micro-organismos foi investigada, por muito tempo, através de técnicas baseadas no cultivo e isolamento. Avalia-se que menos de 1% das espécies bacterianas são passíveis de cultivo a partir de técnicas disponíveis atualmente (AMMAN etal., 1995), o que demonstra que essas técnicas não abrangem de forma representativa a maior parte da comunidade microbiana em solos (BENT; FORNEY, 2008). Para tanto houve avanços no desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo, permitindo assim a detecção de uma vasta diversidade de espécies de bactérias no solo (AMANN; LUDWING 2000; CANNAVAN, 2007).

Essas novas ferramentas proporcionam maior desenvolvimento no âmbito de pesquisas, já que produzem um volume maior de dados, a um custo bem menor (RANJARD et al., 2000; ARMOUGOM; RAOULT, 2009). Existe uma extensa gama de técnicas moleculares que podem ser empregadas ao estudo e entendimento das comunidades microbianas, incluindo micro-organismos não cultiváveis (ROSADO et al., 1997; HANDELSMAN; SMALLA, 2003). De acordo com os objetivos pretendidos, essas técnicas podem ser usadas isoladas ou até mesmo em conjunto.

A técnica de PCR em Tempo Real (qPCR- *Real-time polymerase chain reaction*), ou PCR quantitativa, permite estimar o número de cópias de um gene de interesse (HIGUCHI; FOCKLER, 1993; HEID; STEVENS, 1996; DÖLKEN; SCHÜLER, 1998). Os benefícios desta técnica tem se destacado por não necessitar de detecção de banda em gel de agarose, sendo que essa detecção do produto amplificado se dá durante a reação, além de fornecer resultados rapidamente (LORENZI, 2008). O qPCR têm grande aplicação na ecologia microbiana, pois permite a quantificação da abundância e expressão de genes taxonômicos e funcionais em amostras provenientes de diversos ambientes (SMITH; OSBORN, 2009).

Genes funcionais desnitrificantes têm sido isolados a partir de culturas de bactérias, e os fragmentos de genes amplificados a partir de amostras ambientais e cultivadas utilizando uma gama de iniciadores (BRAKER et al., 1998; BRAKER; TIEDJE, 2003; HALLIN; LINDGREN, 1999; SCALA; KERKHOF, 1998). Estudos de desnitrificantes tendem a se concentrar nas etapas de nitrito redutase em diante já que a nitrato redutase não está sempre ligada à completa desnitrificação (PHILIPPOT, 2005). PCR em tempo real fornece um método simples e rápido para quantificar os genes alvo em amostras complexas, tais como do solo e outras matrizes ambientais. Muitos trabalhos em ecologia molecular de bactérias desnitrificantes tem sido baseados nos genes funcionais, *nirK* e *nosZ* (HENRY et al., 2005; THROBACK et al., 2004; DANDIE et al., 2007; GEETS et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008; CHEN et al., 2010; SINGH et al., 2011; PASTORELLI et al., 2011).

Enfim, as possibilidades de estudo da diversidade de bactérias em solo através de técnicas moleculares vêm crescendo a cada dia. Essas técnicas vêm sendo melhoradas e também há o surgimento de novas técnicas, ferramenta esta importante para uma busca de conhecimento da ecologia microbiana. O Brasil demonstra grande potencial de aplicação destas técnicas, já que tem uma grande variedade de solos e ecossistemas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em área de cultivo de cana-de-açúcar colhida sem queima prévia. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados tendo como tratamentos três doses de vinhaça. As análises das amostras de GEE foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, enquanto as análises moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (Figura 4), ambos pertencentes ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba/SP. O mesmo experimento foi desenvolvido em novembro de 2011 e repetido em novembro de 2012.

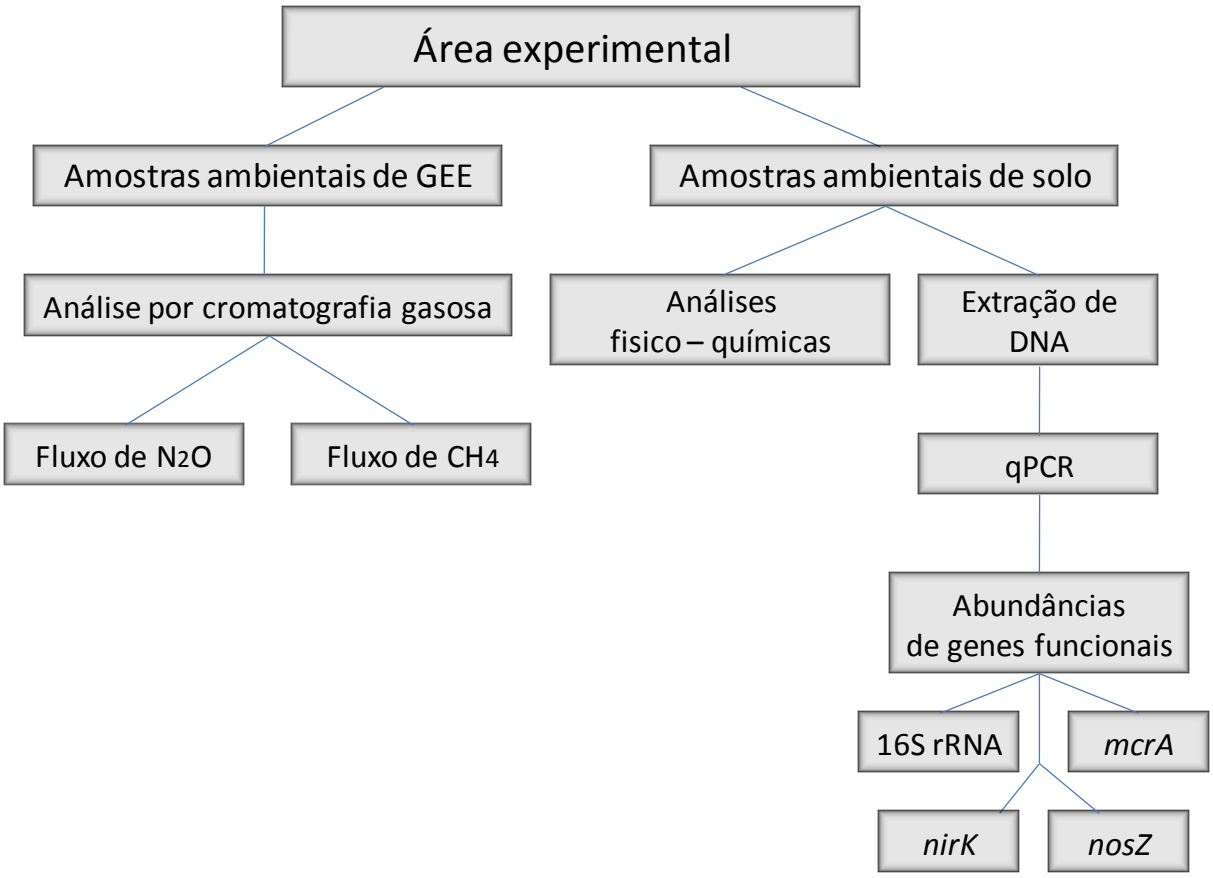


Figura 4 - Fluxograma dos estudos realizados no presente trabalho de acordo com as análises empregadas

3.1 Localização e caracterização da área de estudo

A área de estudo adotada foi a Fazenda Santana, pertencente à Usina Costa Pinto, situada em Tanquinho (22º35’31’’S, 47º38’23’’O), Distrito de Piracicaba-SP, (Figura 5). Esta área foi selecionada por apresentar cultivo de cana-de-açúcar sem queima por um período maior que cinco anos. A região apresenta clima tropical úmido com verão chuvoso e inverno seco (precipitação do mês mais seco < 30mm, temperatura média do mês mais quente > 22ºC e do mês mais frio >18ºC), , segundo a classificação de Köppen. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Escuro (EMBRAPA, 2006) e possui textura média arenosa (CAMARGO et al., 2009). Os dados de precipitação e temperaturas máximas e mínimas dos períodos experimentais encontram-se na Figura 6.

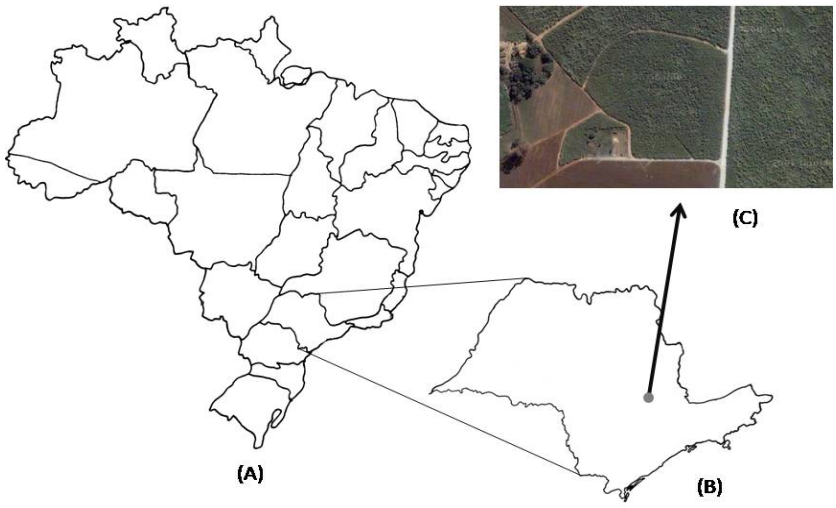
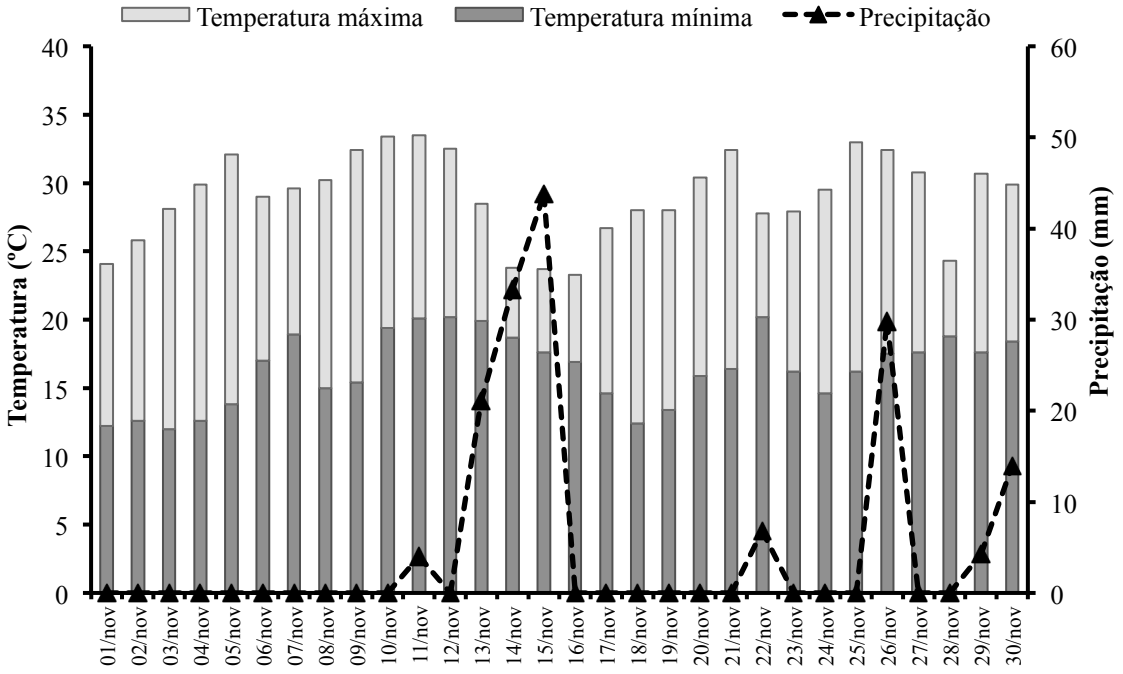
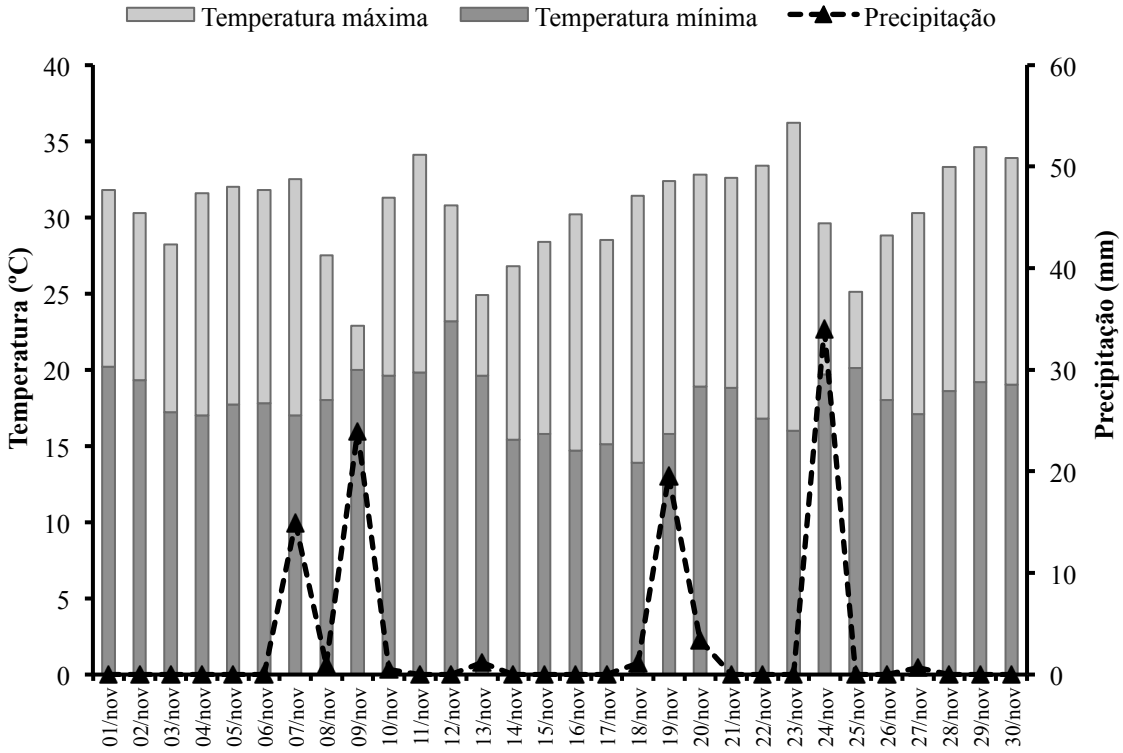


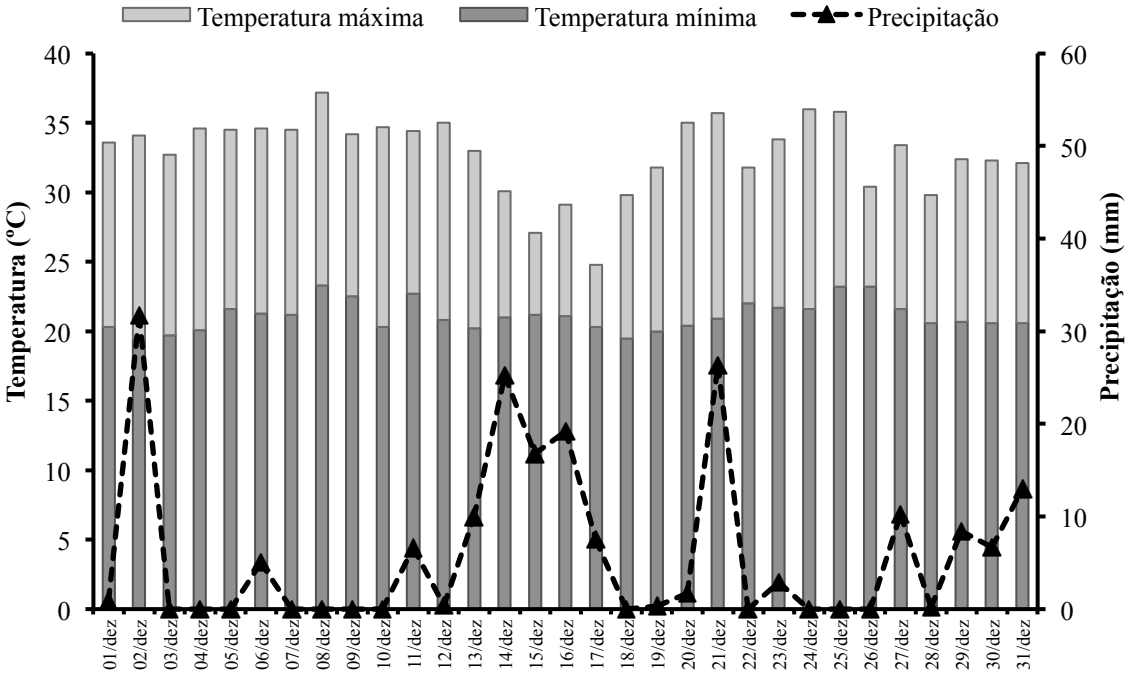
Figura 5 - Área de coleta em Tanquinho, Distrito de Piracicaba-SP. Mapa do Brasil com destaque em São Paulo (A); (B) Mapa do estado de São Paulo com destaque em Tanquinho (B) e área de cana-de-açúcar sem queima (C), pertencente à Usina Costa Pinto


Temperatura máxima
Temperatura mínima
Precipitação
Temperatura (ºC)
Precipitação (mm)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
10
20
30
40
50
60
01/nov
02/nov
03/nov
04/nov
05/nov
06/nov
07/nov
08/nov
09/nov
10/nov
11/nov
12/nov
13/nov
14/nov
15/nov
16/nov
17/nov
18/nov
19/nov
20/nov
21/nov
22/nov
23/nov
24/nov
25/nov
26/nov
27/nov
28/nov
29/nov
30/nov

(A)


Temperatura máxima
Temperatura mínima
Precipitação
Temperatura (ºC)
Precipitação (mm)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
10
20
30
40
50
60
01/nov
02/nov
03/nov
04/nov
05/nov
06/nov
07/nov
08/nov
09/nov
10/nov
11/nov
12/nov
13/nov
14/nov
15/nov
16/nov
17/nov
18/nov
19/nov
20/nov
21/nov
22/nov
23/nov
24/nov
25/nov
26/nov
27/nov
28/nov
29/nov
30/nov

(B)



(C)

Figura 6 - Temperaturas máxima e mínima e precipitação diária no mês de (A) Novembro de 2011, (B) Novembro de 2012 e (C) Dezembro de 2012

3.2 Caracterização físico-química da área de estudo

Para caracterização inicial das propriedades físico-químicas do solo, a amostragem foi feita ao redor das câmaras na camada 0-10 cm, com o auxílio de tubos PVC (10 cm) e enxadão para a retirada dos tubos do solo, sendo as amostras acondicionadas em sacos plásticos e analisadas segundo Raij et al., (2001) (Tabela 1). Os valores das propriedades físico-químicos apresentados são a média de cinco repetições, tornando essa caracterização mais precisa e representativa.

Tabela 1 - Características físico-químicas da camada 0-10 cm do solo em estudo, nos anos de 2011 e 2012, antes da aplicação dos tratamentos

		2011	**2012**
pH	($CaCl_2$)	5,4	5,9
S	*mg dm*$^{-3}$	5	7
P	*mg dm*$^{-3}$	176	233
K	*mmol*$_c$ *dm*$^{-3}$	13,2	8,8
Ca	*mmol*$_c$ *dm*$^{-3}$	42	41
Mg	*mmol*$_c$ *dm*$^{-3}$	13	10
H+Al	*mmol*$_c$ *dm*$^{-3}$	25	18
SB	*mmol*$_c$ *dm*$^{-3}$	68,0	60,1
CTC	*mmol*$_c$ *dm*$^{-3}$	92,9	78,3
V	*%*	73	77
B	*mg dm*$^{-3}$	0,11	0,18
Cu	*mg dm*$^{-3}$	2,5	1,2
Fe	*mg dm*$^{-3}$	106	160
Mn	*mg dm*$^{-3}$	15,4	16,2
Zn	*mg dm*$^{-3}$	3,4	2,4
C	*%*	1,7	1,2
N	*%*	0,13	0,10
Relação C/N		12,41	12,93

pH-potencial hidrogeniônico, S-enxofre, P-fósforo, K-potássio, Ca-cálcio, Mg-magnésio, H+Al-potencial de acidez, SB-soma de bases, CTC-capacidade de troca catiônica, V-saturação de bases , B-boro, Cu-cobre, Fe-ferro, Mn-manganês, Zn-zinco, C-carbono, N-nitrogênio, C/N-relação carbono nitrogênio.

3.3 Densidade do solo, Carbono e Nitrogênio total

A determinação da densidade aparente do solo foi feita em 10 mini-trincheiras utilizando o método do anel volumétrico (BLAKE; HARTGE, 1986; EMBRAPA, 1997), que envolve a obtenção de amostras de volumes conhecidos, 98 cm^3, por meio de anéis volumétricos de aço inox (5 x 5 cm), inseridos no solo por pressão, com o uso de trado específico. É essencial que as amostras permaneçam indeformadas (Figura 7). Após serem pesadas as amostras foram levadas para a estufa a 105 ºC até sua massa permanecer constante, em que se obteve a massa seca da amostra. Para a determinação de densidade aparente (g dm^{-3}) foi dividida a massa seca do solo (g) pelo volume do anel (cm^3).

A densidade aparente do solo determinada no presente experimento foi utilizada para calcular os valores dos espaços porosos do solo preenchidos por água (EPPA; %) (Equação 1).

EPPA ou WFPS= (umidade do solo*densidade aparente) / porosidade total *(Eq. 1)*

A porosidade total foi obtida pela expressão:1- (densidade aparente/densidade da partícula), sendo assumido o valor de densidade de partícula do solo de 2,65 mg m^{-3},de acordo com (BIELDERS et al., 1990; FAGERIA; STONE, 2006).

O cálculo do EPPA do solo foi feita simultaneamente às coletas de GEE e de amostras de solo para análises moleculares.

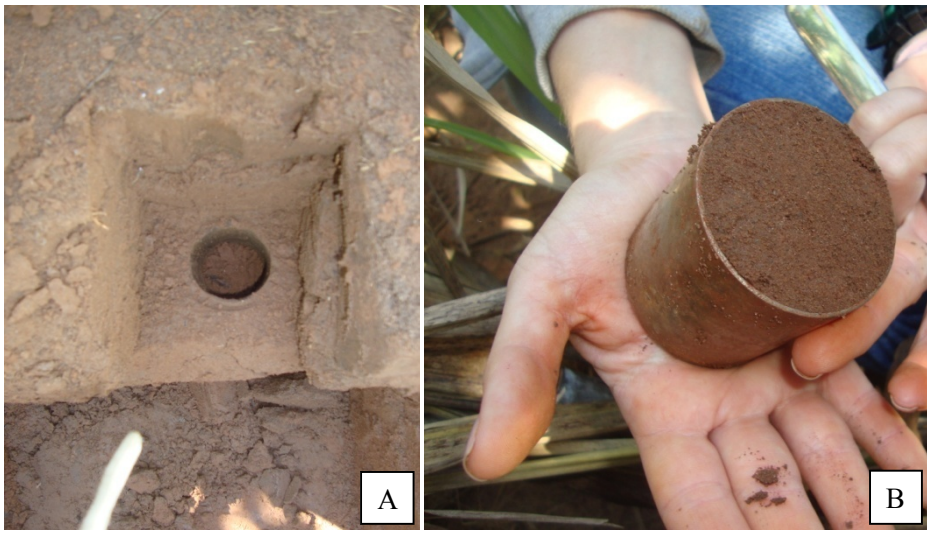


Figura 7 - Coleta de amostras para determinação da densidade do solo. (A) Mini-trincheiras em degraus (0-10, 10-20, 20-30); (B) Anéis volumétricos sem ruptura, amostra indeformada

As amostras destinadas à determinação de carbono total (Ct) e nitrogênio total (Nt), coletadas de 0-10 cm, foram secas à 42ºC, destorroadas e trituradas em almofariz e passadas em peneira de malha 100 mesh (0,150 mm). A determinação das concentrações de Ct e Nt, nestas frações, foram obtidas por combustão a seco, com analisador elementar Carbon Analyzer CN-2000 (Leco, Michigan, MI, EUA) (NELSON; SOMMERS, 1982).

3.4 Caracterização da vinhaça

Para a caracterização físico-química da vinhaça aplicada (Tabela 2), amostras foram coletadas em triplicata e enviadas ao Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo (ESALQ-USP). Essa determinação é crucial, pois, estes elementos podem interferir na emissão de gases do efeito estufa, quando adicionados ao solo via vinhaça.

Tabela 2 - Características químicas da vinhaça aplicada em 2011 e 2012

		2011	**2012**
pH		4,4[1]	5,1
Densidade	$g\ mL^{-1}$	0,94	0,96
Resíduo seco à 100-110ºC	$g\ L^{-1}$	18,42	22,08
M.O total (combustão)	$g\ L^{-1}$	10,01	13,21
Carbono total (orgânico e mineral)	$g\ L^{-1}$	5,56	7,34
Resíduo mineral total	$g\ L^{-1}$	8,41	8,87
Resíduo mineral insolúvel	$g\ L^{-1}$	0,09	0,19
Resíduo mineral solúvel	$g\ L^{-1}$	8,32	8,68
Nitrogênio total	$g\ L^{-1}$	0,57	0,54
Fósforo (P_2O_5) total	$g\ L^{-1}$	0,15	0,13
Potássio (K_2O)	$g\ L^{-1}$	3,75	3,05
Cálcio	$g\ L^{-1}$	0,98	0,76
Magnésio	$g\ L^{-1}$	0,33	0,28
Enxofre	$g\ L^{-1}$	1,12	0,061
Cobre	*ppm*	1,0	1,0
Manganês	*ppm*	9,0	5,0
Zinco	*ppm*	11,0	1,0
Ferro	*ppm*	24,0	18,0
Relação C/N		9/1	8/1

pH-potencial hidrogeniônico, M.O-matéria orgânica, C/N- relação carbono nitrogênio.
[1]Valores representam a média de quatro repetições

3.5 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em blocos, distribuídos na área com cultivo de cana-de-açúcar selecionada. Em cada bloco foram instaladas cinco câmaras estáticas (Figura 8) para a coleta de GEE, sendo que cada uma representava um tratamento. Os tratamentos foram doses de vinhaça de 150, 300 e 450 m^3ha^{-1}, uma dose de água de 300 $m^3\ ha^{-1}$ (controle) e o solo sem nenhum aditivo, mantendo-o em condições originais (Figura 9).

A vinhaça foi aplicada com o auxílio de um delimitador, com dimensão de um metro quadrado, e aplicador com os volumes previamente calculados, mensurados em proveta e demarcados no mesmo (Figura 10).

Figura 8 - Instalação das câmaras na área de cana-de-açúcar com manejo sem queima

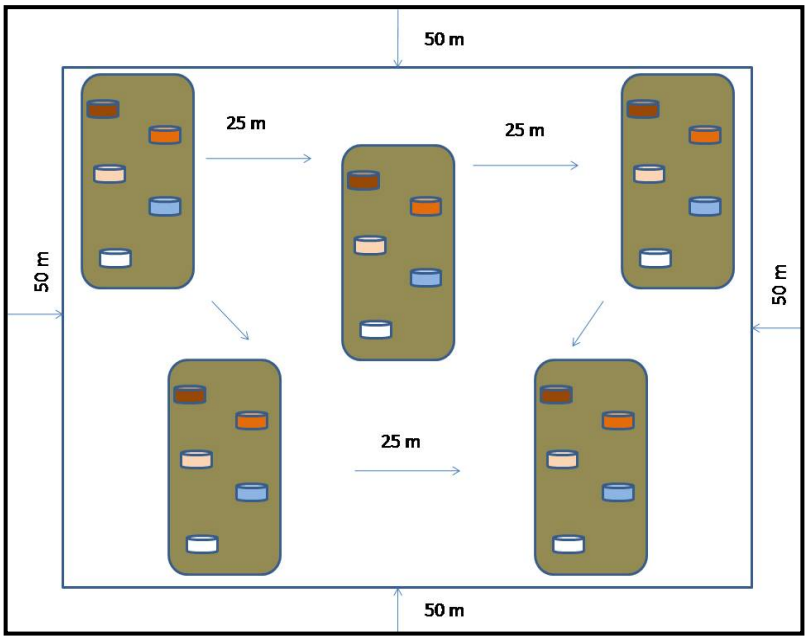


Figura 9 - Croqui da disposição dos blocos na área experimental, respeitando 50m de bordadura. Os tratamentos encontram-se representados por cores; cor branca (solo sem aplicação), azul (300 m^3 ha^{-1} de água), rosa (150 m^3 ha^{-1}de vinhaça), laranja (300 m^3 ha^{-1}de vinhaça) e marrom (450 m^3 ha^{-1} de vinhaça)

Figura 10 - Aplicação dos tratamentos. (A) Delimitação da área amostral (B) aplicação da dose de 300 m^3ha^{-1} de água, (C) aplicação das doses de vinhaça e (D) perímetro demarcado após a retirada do delimitador

3.6 Amostragem e quantificação dos fluxos de GEE

Em cada um dos tratamentos, foram instaladas câmaras estáticas para coleta de amostras de GEE, conforme metodologia descrita por Steudler et al. (1991). As amostragens dos fluxos de GEE do solo foram realizadas diariamente (entre 10:00h e 14:00h) iniciando no primeiro dia de aplicação da vinhaça até o décimo quinto dia após a aplicação. A partir de então, as coletas ocorreram em dias espaçados, findando no trigésimo dia após a aplicação da vinhaça.

As câmaras eram compostas por base e tampa (volume total médio de 10,4 L), sendo a base fixa, evitando perturbação do solo e facilitando as diversas coletas ao longo do período experimental. Para determinação do volume médio de cada câmara foram feitas medições de alturas de três pontos da superfície do solo até a tampa e calculada a média (Figura 12).

O experimento foi conduzido de forma semelhante em novembro de 2011 e 2012. Para a coleta de amostras de GEE do interior das câmaras foram utilizadas seringas de *nylon* tipo BD de 20 mL e intervalos de coleta de 15s, 5min, 10min e 20min, tempo este determinado em experimentos preliminares. A contagem do tempo iniciava-se após o fechamento hermético da tampa na base fixa (Figura 11). Durante o período de coleta foram obtidas também as temperaturas do solo nas profundidades de 2, 5 e 10 cm, dentro e fora da câmara, por meio de termômetro analógico em inox. Foram avaliadas também a pressão atmosférica, utilizando barômetro, e a umidade do solo.

Figura 11 - Coleta de amostras ambientais de GEE, utilizando seringas de nylon BD 20 mL

Figura 12 - Medição da altura de três pontos dentro da câmara para posterior cálculo de volume médio

Para cada amostra foram determinadas as concentrações de N_2O e CH_4 por cromatografia gasosa, através de cromatógrafo GC-2014 (*Shimadzu*, Tóquio, Japão), constituído por uma coluna empacotada, um detector de captura de elétrons (ECD) para análise de N_2O e um detector de ionização de chama (FID) para determinação de CH_4. O fluxo de cada GEE foi determinado pela alteração linear das concentrações em função do tempo de incubação, baseado na Equação 2:

$$\textit{Fluxo} = (d[GEE]/dt) \times (Vh/A) \times ((1-e/P)/VM) \qquad \textit{(Equação 2)}$$

Em que:

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

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

(A) = área da câmara (m^2);

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

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

A emissão diária de óxido nitroso e metano foi obtida pela média dos fluxos das cinco repetições de cada tratamento. A emissão total (acumulada) dos GEE foi determinada por integração de curvas, gerando a quantidade total de GEE emitida para o período estudado. A partir das emissões acumuladas de N-N_2O foi calculado o fator de emissão deste GEE em relação à quantidade de N adicionado via vinhaça.

Os fluxos de N_2O e CH_4 foram convertidos em CO_2eq. De acordo com IPCC (2007), o potencial de aquecimento global (PAG) do N_2O é 298 vezes a do CO_2 e CH_4 equivale 25 vezes. Sendo assim, a fórmula de conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2eq encontra-se apresentada nas Equações 3 e 4:

$$CO_2eq\ (N\text{-}N_2O) = N\text{-}\ N_2O \times (44/28) \times 298 \qquad \textit{(Equação 3)}$$

$$CO_2eq\ (C\text{-}CH_4) = C\text{-}CH_4 \times (16/12) \times 25 \qquad \textit{(Equação 4)}$$

Em que:

N_2O = fluxo de N_2O na situação

CH_4= fluxo de CH_4 na situação

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

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

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

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

3.7 Amostragens e análises moleculares microbianas

As amostras de solo para análises moleculares foram coletadas em três pontos ao redor de cada câmara de GEE (Figura 13). Tubos de PVC de 6 cm de diâmetro por 10 cm de comprimento foram utilizados para retirar o material a uma profundidade de 0-10cm. As amostras (tubos) foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixa térmica até o término da coleta e em seguida foram armazenadas em ultra-freezer (-80 ºC), para análises.

Figura 13- Coleta de solo na área de cana-de-açúcar sem queima

3.7.1 Extração de DNA das amostras de solo

Para a extração de DNA genômico total de cada amostra foi utilizado o Kit *Power Lyzer* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) seguindo instruções fornecidas pelo fabricante. É muito importante que a extração de DNA das células seja feita com muito rigor, pois se cometermos erros nesta fase, as seguintes que consistem nas análises, baseadas neste produto, serão em suas totalidades comprometidas.

Primeiramente, 0,25 g de solo foram adicionados em um microtubo do kit contendo micro-esferas de vidro (tubo *Power Bead* 2mL) e um tampão que ajuda a dispersar as partículas de solo e a dissolver os ácidos húmicos protegendo o DNA de degradação. Em seguida, o microtubo foi agitado por 5 s em vortex e adicionado 60 µL da solução C1 do kit ao microtubo e este foi invertido várias vezes. Esta solução é um detergente que quebra os ácidos graxos e lipídeos associados à membrana celular. Os tubos foram agitados horizontalmente em vortex por 10 min à velocidade máxima. O procedimento do vortex é essencial para a completa homogeneização e lise das células. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 segundos à 10.000 x *g* e o sobrenadante (500 µL) foi transferido para um novo tubo do kit. Foram adicionados então 250 µL da solução C2 e vortexado por 5 s. A solução C2 precipita materiais orgânicos e inorgânicos que não sejam DNA, incluindo ácidos húmicos, restos celulares e proteínas. É importante remover todos estes compostos, já que podem reduzir a pureza do DNA e prejudicar análises futuras. A reação foi então incubada a 4 ºC por 5 min e, em seguida, centrifugada por 60 s a 10.000 x *g*. Foi transferido 600 µL para um novo tubo do kit, adicionado 200 µL da solução C3 e essa mistura foi agitada em vortex. A solução C3 tem a função de precipitar compostos adicionais que restaram. A reação foi incubada a 4 ºC por 5 min e posteriormente, centrifugada por 1 min a 10.000 x *g*. Foi transferido 750 µL para um novo tubo do kit com 1.200 µL da solução C4 (proporciona a ligação do DNA) e agitada em vortex por 5 s. Em um novo tubo do kit, contendo uma coluna com filtro, foram carregados 675 µL da mistura e centrifugada por 60 s a 10.000 x *g*. O líquido do tubo foi descartado e mais 675 µL da mistura foi adicionada, repetindo a centrifugação. O mesmo processo foi novamente executado para filtrar o restante do líquido contendo DNA. Foram adicionados 500 µL da solução C5 e centrifugado por 30 s a 10.000 x *g*. A solução C5 contém etanol e tem a função de limpeza do DNA. Esta também remove sais residuais e outros contaminantes enquanto permite que o DNA continue ligado à

membrana. O sobrenadante foi descartado e centrifugado novamente por 60 s a 10.000 x *g*. A coluna foi transferida para um novo tubo e adicionado à ele 100 µL da solução C6 no centro da mesma seguido de centrifugação por 30 s a 10.000 x *g*. A solução C6 (Tampão 10mM Tris) deve ser colocada bem no centro da coluna, garantindo assim que toda a membrana seja embebida com a mesma. Isso resulta em uma eficiente e completa liberação do DNA da membrana.

A qualidade do DNA e quantidade aproximada foram conferidas em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 1989), corado com 1,5 µL de *Gel Red*™ (Biotium Inc., CITY, UF, COUNTRY) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando 2µL de *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies, CITY, UF, COUNTRY) como padrão de massa. Após o carregamento do gel com os padrões, as amostras e o DNA extraído, este foi submetido a um campo elétrico de 85V por 30 min e em seguida transferido para um transiluminador e foto-documentado.

As extrações feitas também foram quantificadas em espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies,Thermo Scientific,Wilmington, DE, EUA) com leitura D.O = 260 nm. Alíquotas de DNA foram armazenadas em freezer a -20 ºC e ultra-freezer a -80 ºC.

3.7.2 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR)

Após verificada a eficiência da extração de DNA, a técnica molecular de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) foi aplicada com o objetivo de estimar o número de cópias de quatro genes de interesse no presente estudo; gene relacionado à comunidade total de bactérias (16S rRNA); ao potencial de desnitrificação (*nirK e nosZ)* e à metanogênese (*mcrA*). As reações de qPCR foram realizadas no *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies), utilizando o sistema *SYBR Green ROX qPCR* (Fermentas).

Para as reações de qPCR, para o gene 16S rRNA, foi feito um mix (solução) contendo 5 µL do kit *SYBR Green ROX qPCR* , 1 µL de cada primer (5 pmol) (U968 – 5’ CGA ACG AGA ACC TTA C 3’ e R1387 – 5’ CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3’; HEUER et al., 1997) 1 µL do DNA e 2 µL água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95 ºC por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 ºC por 15 s, 56 ºC por 20 s e 72 ºC por 45 s com coleta de dados de fluorescência. Ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95 ºC por 15 s, 56 ºC por 1 min e 95 ºC por 15 s com leitura de dados a cada 0,7 ºC.

Já para as reações de qPCR, para o gene *nirK* foi utilizado um mix (solução) contendo 5 µL do kit *SYBR Green ROX qPCR*, 1 µL de cada primer (5 pmol) (1F – 5' GGRATGGTYCCSTGGCA 3' e 5R – 5' GCCTCGATCAGRTTRTGG 3'; BRAKER et al.,1998) 1 µL do DNA e 2 µL água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação de 5 min a 95 ºC seguido por touchdown de 6 ciclos com a desnaturação a 95 ºC durante 30 s, anelamento a 45 ºC durante 30 s, e extensão a 72 ºC durante 40 s, e fase seguinte com 40 ciclos de amplificação de DNA a 95 ºC durante 30 s, 43 ºC durante 30 s e 72 ºC durante 40 s. Um passo final a 95 ºC durante 15 s, 43 ºC por 1 min e 95 ºC por 15 s com leitura de dados a cada 0,5 ºC.

Para as reações de qPCR, para o gene *nosZ*, foi feito um mix (solução) contendo 5 µL do kit *SYBR Green ROX qPCR*, 1 µL de cada primer (5 pmol) (2F – 5'CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT 3' e 2R – 5' CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA 3'; HENRY et al., 1997) 1 µL do DNA e 2 µL água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação de 10 min a 95 ºC seguido por touchdown de 6 ciclos com a desnaturação a 95 ºC durante 15 s, anelamento a 65 ºC durante 30 s, e extensão a 72 ºC durante 30 s, e fase seguinte com 40 ciclos de amplificação de DNA a 95 ºC durante 20 s, 60 ºC durante 15 s e 72 °C durante 30 s. Um passo final a 95 ºC durante 15 s, 60 ºC por 1 min e 95 ºC por 15 s com leitura de dados a cada 0,5 ºC.

Por fim para as reações de qPCR, para o gene *mcrA*, o mix (solução) continha 5 µl do kit *SYBR Green ROX qPCR* , 1µl de cada primer (5 pmol) (*mcrA*F – 5' CGA ACG AGA ACC TTA C 3' e *mcrA*R – 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3'; TAKETANI et al., 2010) 1 µl do DNA e 2 µl água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µl. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95 ºC por 10 min, seguido de 42 ciclos de 95 ºC por 30 s, 60 ºC por 30 s e 72 ºC por 45 s com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95 ºC por 15 segundos, 60 ºC por 60 s e 95 ºC por 15 s com leitura de dados a cada 0,7 ºC.

Em todas as reações foi incluído controle negativo, usando água como molde em vez de DNA. Para cada amostra de cada gene estudado e para a curva padrão de cada gene foram feitas triplicatas (réplicas técnicas). Para construir a curva padrão dos genes 16S rRNA, *nirK, nosZ* e *mcrA*, foram utilizados clones disponíveis no laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, os quais foram obtidos a partir da amplificação do DNA de

amostras ambientais em reações feitas com os primers anteriormente descritos, específicos de cada gene.

O produto de PCR dos clones, aproximadamente 419 pb, 510 pb, 259 e 440 pb, respectivos aos genes 16S rRNA, *nirK, nosZ* e *mcrA,* foi purificado e quantificado com auxílio do espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies). Diluições seriadas contendo de 10^8 a 10^4 cópias do fragmento de 16S rRNA, 10^6 a 10^2 cópias do fragmento de *nirK*, 10^6 a 10^2 cópias do fragmento *nosZ* e 10^5 a 10 cópias do fragmento de *mcrA* foram feitas para a curva padrão.

3.8 Análises estatísticas

Foi aplicada estatística descritiva nos fluxos diários de GEE, já os fluxos acumulados de GEE e quantificação de genes foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e quando significativo, foi submetido ao teste de Tukey com nível de significância de 5% (SAS version 9.2, SAS Institute, Cary, NC). O Coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre as variáveis estudadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito das doses de vinhaça sobre as taxas de emissão de metano e óxido nitroso

4.1.1 Espaço poroso preenchido por água (EPPA) e temperatura do solo

Os valores de EPPA, profundidade de 0-10 cm, variaram nos diferentes tratamentos no primeiro e no segundo ano (Figuras 14 e 15). A densidade do solo utilizada para o cálculo desta variável não apresentou variações entre os anos experimentais, apresentando de tal forma um valor médio de 1,59 g m^{-3}. O EPPA médio do período amostrado no primeiro ano para solo (Tsolo) foi de 59%, sendo que para o controle (300 m^3 ha^{-1} de água) (Tágua) foi de 58% e para as doses de vinhaça (150, 300 e 450 m^3 ha^{-1}) (T150, T300, T450), 62, 63 e 65% respectivamente. Já para o segundo ano, o Tsolo apresentou um EPPA médio de 68%, o Tágua de 64% e as doses de vinhaça 70, 71, 69% respectivos a T150, T300 e T450. No primeiro ano houve diferença estatística ($p<0,05$) entre o Tágua e Tsolo e o Tsolo com as diferentes doses de vinhaça, T150, T300 e T450. Já no segundo ano não houve diferença ($p>0,05$) entre o Tsolo e T150, T300 e T450. Tal variável é importante, já que exerce influência na atividade biológica, conteúdo de água, aeração do solo e consequentemente na emissão de GEE (OLIVEIRA et al., 2013).

Tal parâmetro tem relevância já que a emissão de GEE pode ocorrer quando o solo apresenta a maior parte da porosidade ocupada por água (PAVEI, 2005). A mineralização do N é favorecida com um EPPA em torno de 60%, além disso, tal valor dificulta a difusão de oxigênio no solo acarretando na formação de ambientes anaeróbicos (PARTON et al., 1996; MERINO et al., 2001; BATEMAN; BAGGS, 2005).

Não houve variações na temperatura do solo nas diferentes camadas 2, 5 e 10 cm, em ambos os anos (Figura 16). Com temperaturas médias de 22 ºC no primeiro ano e 25 ºC no segundo ano.

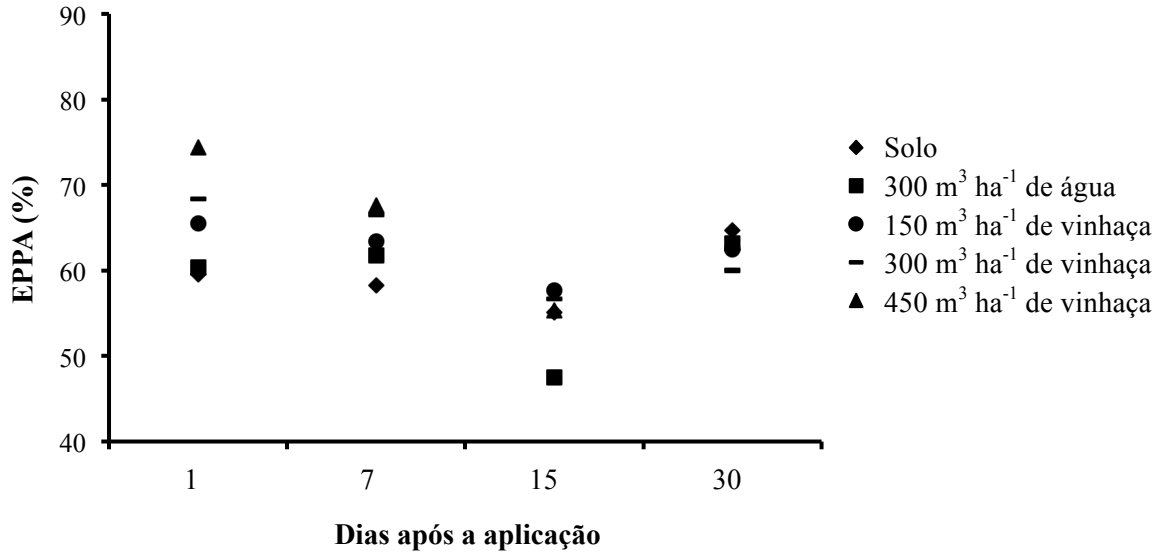


Figura 14 - Espaço poroso preenchido água (EPPA) durante o período de coleta do primeiro ano experimental (2011).

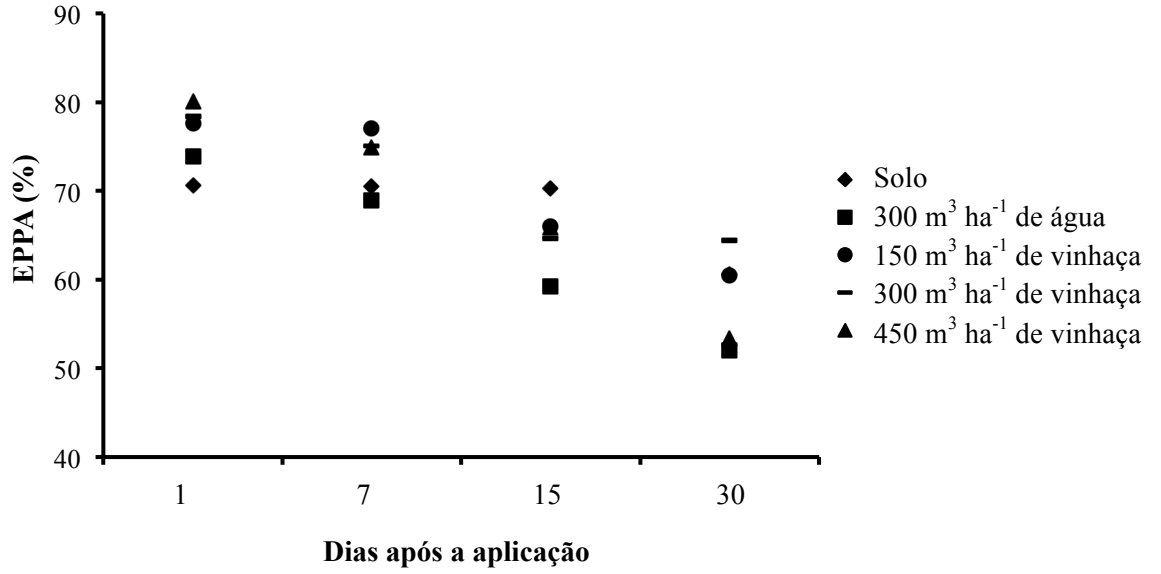


Figura 15- Espaço poroso preenchido água (EPPA) durante o período de coleta do segundo ano experimental (2012).

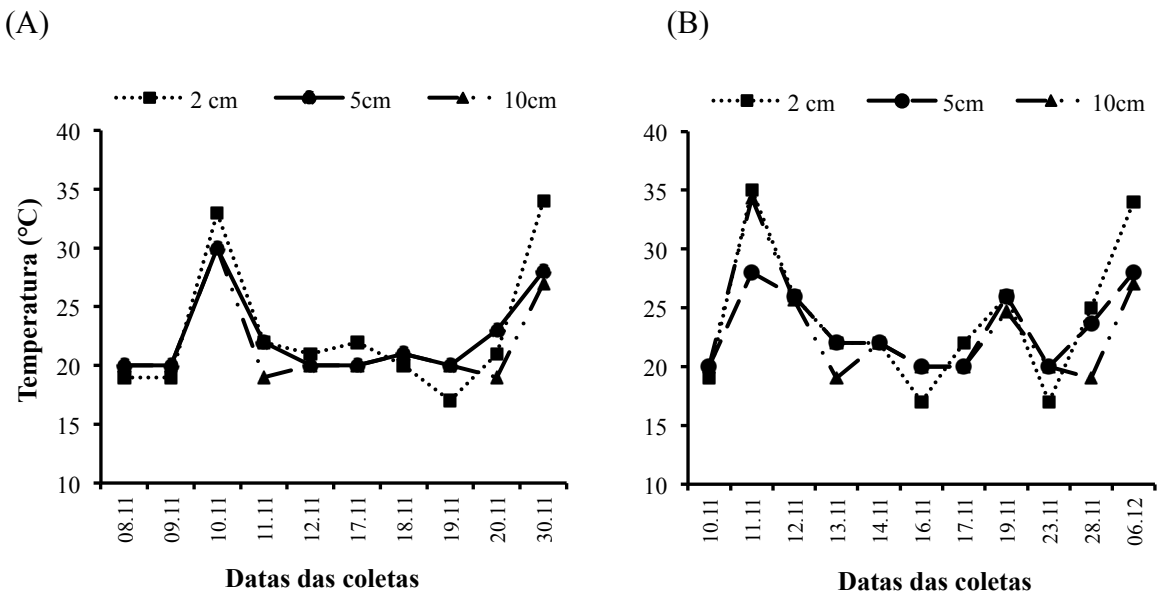


Figura 16 - Temperatura do solo a 2, 5 e 10 cm de profundidade, amostrados nos blocos experimentais, em 2011 (A) e 2012 (B)

4.1.2 Fluxos de N-N_2O

Os fluxos diários de N_2O observados no período experimental, 2011 e 2012, foram positivos para todos os tratamentos (Figuras 17 e 18). No primeiro ano, as emissões de N-N_2O provenientes do Tsolo variaram de 7,5 a 182,86 µg N-N_2Om^{-2} h^{-1}. O Tágua apresentou emissões de N-N_2O variando de 9,38 a 156,57 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Já as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, variaram respectivamente de 19,66 a 233,04 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}; 79,55 a 497,78 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1} e 63,87 a 1270,62 µg N-N_2O m^{-2}h^{-1}. Durante todo o período avaliado, a emissão média para Tsolo foi de 54,28 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}, enquanto que para Tágua foi de 82,98 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Para as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, as emissões médias foram respectivamente, 117,48; 167,28; 239,24 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}.

No segundo ano, as emissões de N-N_2O provenientes Tsolo variaram de 25,6 a 66,9 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. O Tágua apresentou emissões de N-N_2O variando de 15 a 79,6 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Já T150, T300 e T450, variaram respectivamente de 15,8 a 87,5 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}; 37,3 a 80,4 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1} e 40 a 180,7 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Durante todo o período avaliado, a emissão média para Tsolo foi de 45,3 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}, enquanto que para Tágua foi de 38,1 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Para as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, as emissões médias foram respectivamente, 53,7; 54,1; 75,0 µg N-N_2O m^{-2}h^{-1}. Analisando tais resultados, é

possível observar emissão mais acentuada de N-N_2O nos tratamentos com aplicação de vinhaça. Tal fato está associado ao aporte de N, aplicado via vinhaça e sua influência na velocidade da decomposição da palha (OLIVEIRA, 2010).

Vale ressaltar que os picos de emissão de N-N_2O no primeiro dia de coleta, no primeiro e segundo ano, podem ser resultado do chamado efeito *priming,* que é um estímulo a mineralização da matéria orgânica do solo a partir da entrada de C e N como resíduos orgânicos (ALFAIA, 1994; ALFAIA et al., 1995; RIBEIRO, 1996;ALFAIA, 1997; KUZYAKOV et al.; 2000) e consequente aumento da atividade microbiana (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Este efeito é dependente do solo e do tipo de substrato orgânico adicionado. A intensidade do efeito *priming* é mais elevada em Latossolos (ALFAIA, 1997). Além disso, é possível que este efeito explique a ausência de resposta à aplicação de doses crescentes de vinhaça, já que doses pequenas de N podem aumentar os rendimentos a 90% do rendimento máximo (VAN WAMBEKE, 1992).

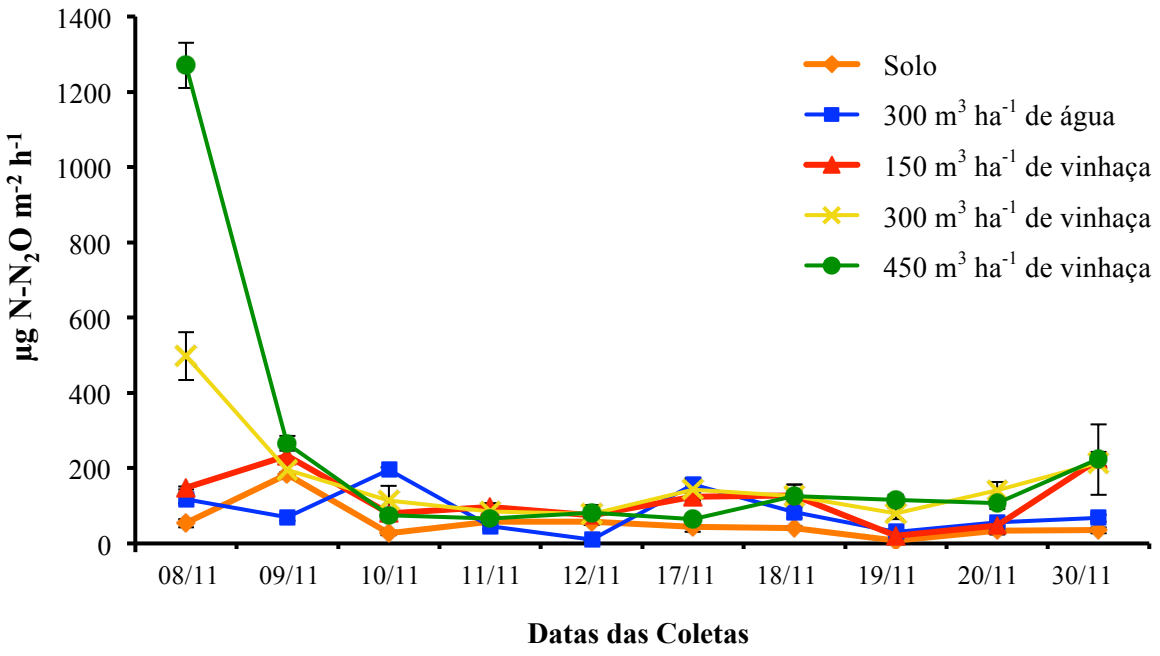


Figura 17 - Fluxo diário de N_2O em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011

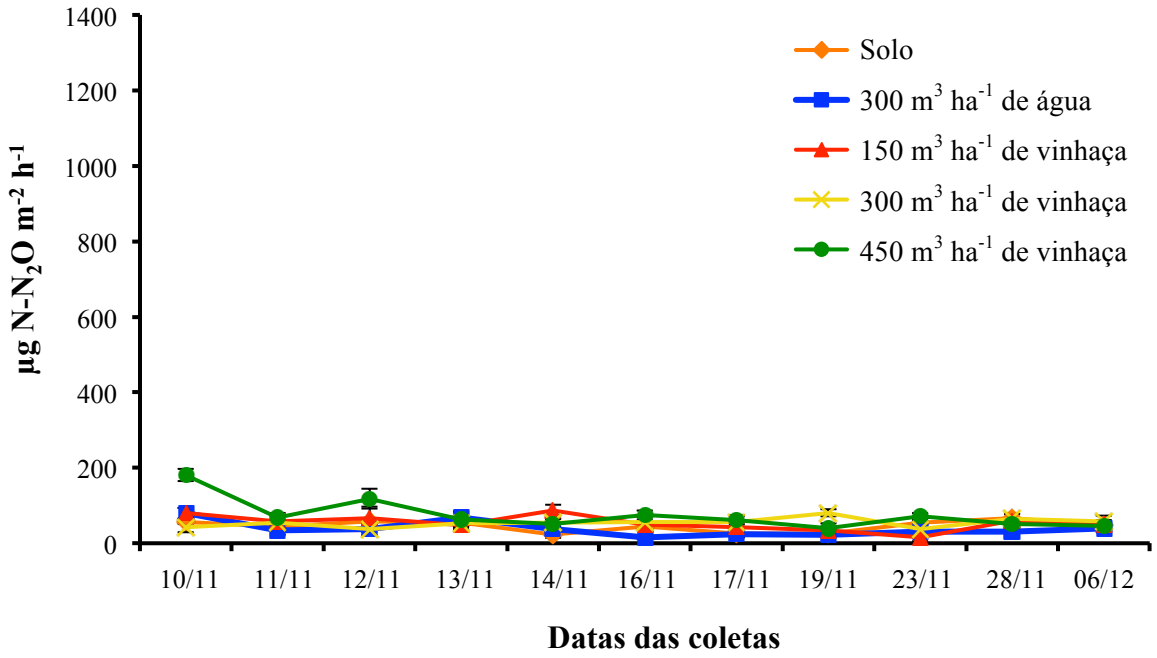


Figura 18 - Fluxo diário de N_2O em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2012

Os resultados das medições de N_2O, no primeiro e segundo ano, revelaram diferenças entre os tratamentos quando considerado o efeito da aplicação de vinhaça nas emissões acumulativas de N-N_2O durante os 30 dias de avaliação (Tabela 3). Este efeito pode estar relacionado ao fato da vinhaça ser uma fonte matéria orgânica prontamente decomponível, resultando em maior emissão de GEE (OLIVEIRA et al., 2013).

Os fluxos de N-N_2O observados foram positivos, indicando, portanto, que os GEE foram emitidos a partir do solo. No primeiro ano o Tsolo com uma emissão média de 210,52 g N-N_2O ha^{-1} diferiu de todos os outros tratamentos (p<0,05), bem como do Tágua, com uma emissão média de 395,78 g N-N_2O ha^{-1} que diferiu do T450, com uma emissão de 660,05 g N-N_2O ha^{-1}. Enquanto no segundo ano o Tsolo com uma emissão média de 253,23 g N-N_2O ha^{-1} não diferiu do Tágua (p>0,05), emissão média de 253,55 g N-N_2O ha^{-1}, mas diferiu de todos os tratamentos com aplicação de vinhaça (p<0,05), tendo o T150 apresentado uma emissão média acumulada de 306,38 g N-N_2O ha^{-1}, o T300, 363,03 g N-N_2O ha^{-1} e o T450, 407,35 g N-N_2O ha^{-1}. O Tágua só não diferiu do T150. Essas diferenças podem estar associadas com as principais contribuições da aplicação de vinhaça, a oferta de N e solo anaeróbico.

O grau de oxigenação do solo interfere diretamente com o processo de emissão de N_2O, e este pode ser um resultado do processo de nitrificação (baixa saturação de água) e desnitrificação (saturado com água). De acordo com Denmead et al. (2009), o N_2O produzido no solo é favorecido quando há preenchimento dos poros do solo com água (aproximadamente 80%). Isso estimula a desnitrificação anaeróbia, que converte NO_3 a N_2O através da atividade microbiana.

Tabela 3 - Fluxos acumulados de N_2O em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011 e 2012

Tratamentos	**2011**	**2012**
	g N-N$_2$O ha^{-1}	
Solo	210,5 c	253,2 b
300 m^3 ha^{-1} de água	395,8 b	253,5 b
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	466,5 b	306,4 ab
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	525,5 b	363,0 a
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	660,1 a	407,3 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

As doses de vinhaça tiveram efeitos mais pronunciados sobre as emissões acumulativas. Isto pode estar relacionado não só a anaerobiose, mas também ao fato deste co-produto de etanol ter baixa relação C/N [9/1 (2011) e 8/1 (2012)] (Tabela 2), facilitando a sua decomposição por micro-organismos do solo (ALEXANDER, 1977; SCHULTEN; HEMPFLING, 1992) e consequentemente aumentando os fluxos de N-N_2O.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o EPPA, que no primeiro ano teve média de 59% e no segundo ano de 68%. Emissões de óxido nitroso, dependendo das características do solo, sofrem estímulo com o EPPA a partir de valores entre 40-50%, atingindo ponto máximo de emissão entre 65-75% de saturação de água no solo (BOUWMAN, 1998; DALAL et al., 2003).

4.1.3 Fluxos de C-CH_4

Os fluxos de C-CH_4 apresentaram valores negativos e positivos em todos os tratamentos analisados, demonstrando a capacidade do solo de servir como fonte e sumidouro deste GEE.

Observando os fluxos diários no primeiro ano (Figura 19), os fluxos de C-CH_4 provenientes do Tsolo variaram de -147,2 a 157,4 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. O Tágua apresentou fluxos de C-CH_4 variando de -216,8 a 46,6 µg N-N_2O m^{-2} h^{-1}. Já as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, variaram respectivamente de -67,6 a 204,8 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}, -147,6 a 201,6 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1} e -226,6 a 215,1 µg C-CH_4 $m^{-2}h^{-1}$. Durante todo o período avaliado, o fluxo médio para Tsolo foi de 5,7 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}, enquanto que para Tágua foi de -54,8 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. Para as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, os fluxos médios foram respectivamente, 58,8; 24,7; 18,2µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}.

No segundo ano (Figura 20), os fluxos de C-CH_4 provenientes do Tsolo variaram de -25,1 a 113,1 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. O Tágua apresentou fluxos de C-CH_4 variando de -89,5 a 81,0 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. Já as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, variaram respectivamente de -151,2 a 99,8 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}, -74,5 a 126,3 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1} e -137,5 a 89,3 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. Durante todo o período avaliado, o fluxo médio para Tsolo foi de 35µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}, enquanto que para Tágua foi de 9,3µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. Para as doses de vinhaça, T150, T300 e T450, os fluxos médios foram respectivamente, 23; 25; 1,8 µg C-CH_4 m^{-2} h^{-1}. De acordo com os resultados obtidos podemos afirmar que o solo atuou ora como fonte ora como dreno de metano, contudo o processo predominante foi de emissão deste GEE, no período amostrado.

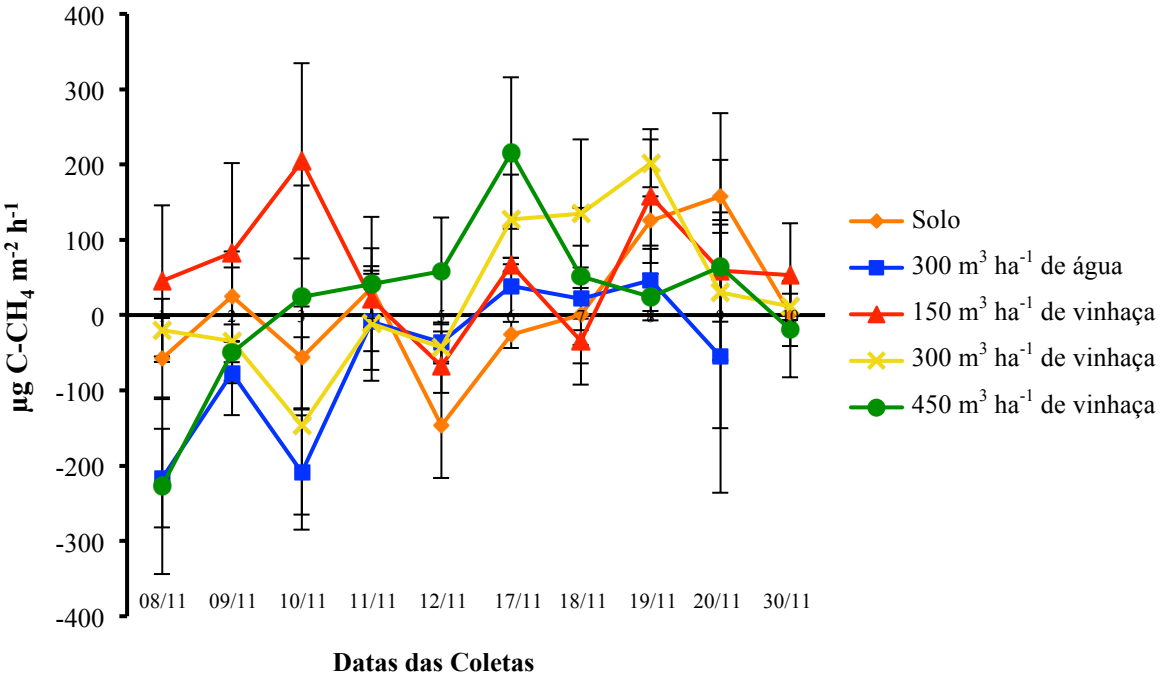
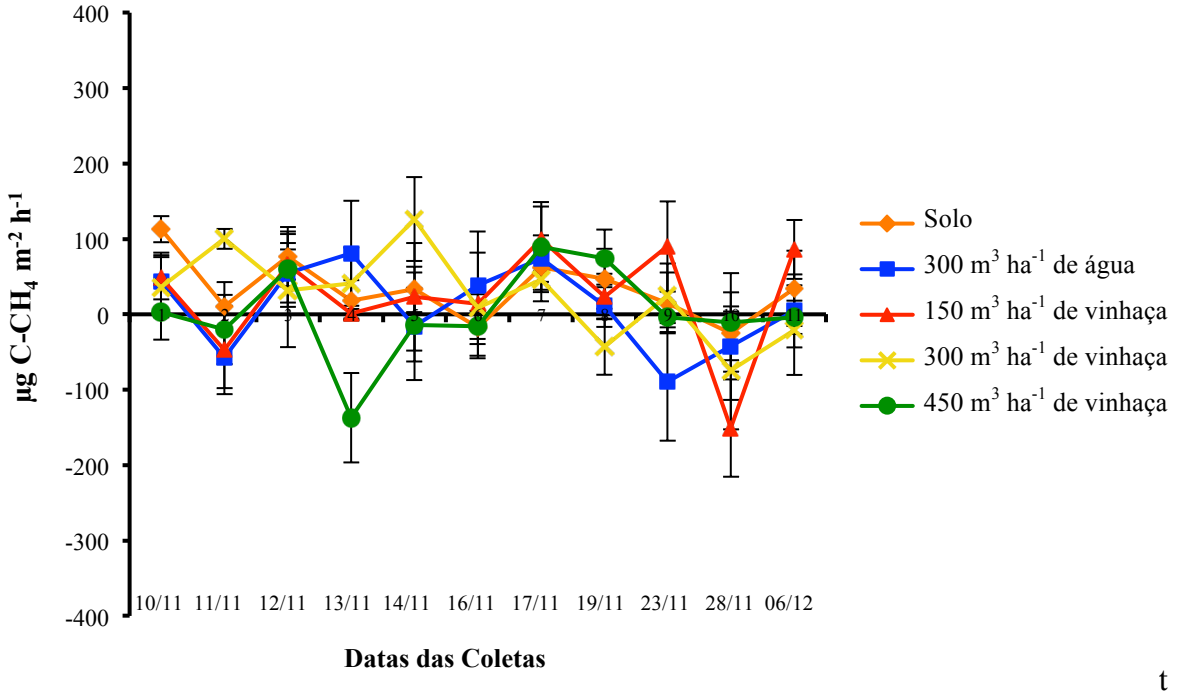


Figura 19 - Fluxo diário de CH_4 em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011



t

Figura 20 - Fluxo diário de CH_4 em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2012

Os resultados das medições de CH_4, no primeiro e segundo ano, revelaram comportamentos bastante variáveis entre os tratamentos quando considerado o efeito da aplicação de vinhaça nas emissões acumulativas de C-CH_4 durante os 30 dias de avaliação (Tabela 4).

Os fluxos acumulados de C-CH_4 observados não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (p>0,05), nem para o primeiro e nem para o segundo ano. Contudo os fluxos obtidos foram negativos no primeiro ano e positivos no segundo. No primeiro ano os fluxos acumulados médios foram: Tsolo (-12,1 g C-CH_4 ha^{-1}), Tágua (-129,0 g C-CH_4 ha^{-1}), T150 (-333,9 g C-CH_4 ha^{-1}), T300 (-146,0 g C-CH_4 ha^{-1}) e T450 (-97,3 g C-CH_4 ha^{-1}). Enquanto no segundo ano fluxos acumulados médios foram: Tsolo (47,5g C-CH_4 ha^{-1}), Tágua (34,0 g C-CH_4 ha^{-1}), T150 (35,3 g C-CH_4 ha^{-1}), T300 (37,8 g C-CH_4 ha^{-1}) e T450 (39,9 g C-CH_4 ha^{-1}). Isso é um indício de que a carga de C via aplicação de vinhaça não interfere nos fluxos de C-CH_4. O mesmo foi observado por Carmo et al. (2012) e Oliveira et al. (2013).

Os fluxos de C-CH_4 demonstraram a capacidade do solo de cana-de-açúcar de servir como fonte e sumidouro deste GEE, resultado este, diferente aos descritos por Weier (1999), Denmead (2009), Zotelli (2012), Carmo et al. (2012) e Oliveira et al. (2013), em que este GEE apresentou apenas a capacidade de atuar como sumidouro de metano.

A absorção de CH_4 pelo solo é resultado da ação das bactérias metanotróficas, sendo aeróbias obrigatórias (MOSIER et al., 2004). A emissão ou consumo de CH_4 é dependente do sistema de cultivo e das práticas relacionadas a este (MOSIER et al., 2004). Se perturbados, através de preparo do solo, por exemplo, os microrganismos metanotróficos, podem ter sua capacidade de oxidação do metano comprometida (BALL et al., 1999). Em solos agrícolas, a taxa de oxidação de CH_4 pode diminuir também devido a aplicação de adubos nitrogenados (MOSIER et al., 1991; MAJUMDAR; MITRA, 2004), pois o amônio inibe a oxidação do CH_4 no solo ao competir pela enzima monoxigenase, que exerce a função de catalisar a oxidação de CH_4 (HÜSTCH et al., 1993; BOECKX et al., 1997). Solos aerados apresentam capacidade de absorção de CH_4, já solos submetidos a eventos de chuva ou irrigação podem apresentar microsítios de anaerobiose resultando em emissão de metano (CORTON, et al., 2000; ESCOBAR, 2008).

A capacidade do solo de atuar como fonte de metano está diretamente relacionada à ação de micro-organismos procariotos, *Archaeas* metanogênicas. Este grupo microbiano em

condições de anaerobiose tem a capacidade de catabolizar acetato e compostos de carbono em metano (LEIGH et al.,2011).

Tabela 4 - Fluxos acumulados de CH_4 em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Piracicaba-SP em 2011 e 2012

Tratamentos	**2011**	**2012**
	g C-CH$_4$ ha^{-1}	
Solo	-12,1 a	47,5 a
300 m^3 ha^{-1} de água	-129,0 a	34,0 a
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	-333,9 a	35,3 a
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	-146,0 a	37,8 a
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	-97,3 a	39,9 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.1.4 Conversão dos fluxos de N-N_2O e C-CH_4 em CO_2 equivalente (CO_2eq)

Na Tabela 5 pode ser observado a conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2eq, para cada um dos tratamentos. Tal medida é baseada nos respectivos potenciais de aquecimento global. O N_2O tem um PAG 298 vezes superior ao CO_2 (ADDISCOTT, 2004). Já o do CH_4 é 25 vezes maior que o do CO_2 (IPCC, 2007).

O Tsolo no primeiro ano experimental emitiu 98,18 kg de CO_2eq ha^{-1}, considerando um período de 30 dias. Já o Tágua foi responsável por uma emissão de 181,04 kg de CO_2eq ha^{-1}, enquanto as doses de vinhaça emitiram 207,35; 241,24; 305,85 kg de CO_2eq ha^{-1}, respectivamente para T150, T300 e T450.

No segundo ano houve redução destes valores (Tabela 6), de forma que o Tsolo emitiu 120,17 kg de CO_2eq ha^{-1}, o Tágua 119,87 kg de CO_2eq ha^{-1} e as doses de vinhaça 144,65, 171,26 e 192,02 kg de CO_2eq ha^{-1}, respectivamente para T150, T300 e T450. A emissão total de GEE é resultado da somatória dos fluxos de C-CO_2, N-N_2O e C-CH_4, entretanto, quando se trata de setor sucroenergético e decomposição de vinhaça, os fluxos de C-CO_2 não são considerados devido à reassimilação deste GEE por meio de fotossíntese pela cultura da cana-de-açúcar (CERRI et al., 2004).

Tabela 5 - Conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 equivalente do primeiro ano experimental

Tratamentos	**CO_2eq (N_2O)**	**CO_2eq (CH_4)**	**CO_2eq Total**
		kg ha^{-1}	
Solo	98,58	-0,40	98,18
300 m^3 ha^{-1} de água	185,34	-4,30	181,04
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	218,48	-11,13	207,35
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	246,11	-4,87	241,24
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	309,09	-3,24	305,85

Tabela 6 -Conversão dos fluxos de N_2O e CH_4 em CO_2 equivalente do segundo ano experimental

Tratamentos	**CO_2eq (N_2O)**	**CO_2eq (CH_4)**	**CO_2eq Total**
		kg ha^{-1}	
Solo	118,58	1,58	120,17
300 m^3 ha^{-1} de água	118,74	1,13	119,87
150 m^3 ha $^{-1}$ de vinhaça	143,47	1,18	144,65
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	170,00	1,26	171,26
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	190,76	1,33	192,08

A conversão de CO_2eq baseada no potencial de aquecimento global, apesar de largamente utilizada na apresentação das emissões totais dos GEE e assegurar a transparência da informação, tem sido questionada pelo fato de não se saber se ela representa adequadamente a importância relativa dos diferentes GEE à mudança do clima (BRASIL, 2010). A AR4 tem analisado alternativas métricas ao uso de PAG, sendo que o Quinto Relatório do IPCC (AR5) deverá examinar profundamente tais métricas (BRASIL, 2010).

4.1.5 Fator de emissão de N_2O devido à aplicação de vinhaça no solo

O fator de emissão é um número que relaciona a quantidade de poluentes emitidos para a atmosfera com uma atividade potencialmente poluidora. Este fator pode ser avaliado partindo da quantidade de N-N_2O emitida, em função da dose de N aplicada no solo, via fertilizantes nitrogenados (BOUWMAN,1996) e vinhaça (OLIVEIRA, 2010; ZOTELLI, 2012). Tal fator é utilizado nas preparações de inventários de gases do efeito estufa (IPCC, 1997).

O fator de emissão do presente estudo foi calculado apenas para a dose de 300 m^3 ha^{-1} de vinhaça, devido à necessidade de um tratamento controle de 300 m^3 ha^{-1} de água. Para o cálculo foi utilizada a integração das emissões de N-N_2O para os respectivos tratamentos. Após isto, o fluxo de N-N_2O do controle foi subtraído do fluxo de N-N_2O respectivo ao tratamento com aplicação de vinhaça. Foi considerado, como citado anteriormente, a quantidade de vinhaça aplicada de 300 m^3 ha^{-1} e o teor de N contido na vinhaça, 0,57 g L^{-1} no primeiro ano e 0,54 g L^{-1} no segundo ano. Ou seja, no primeiro ano foi aplicado via vinhaça 171 kg de N de ha^{-1}, enquanto no segundo ano a dose foi de 162 kg de N ha^{-1}, tais quantidades de N são bastante elevadas.

Baseado no exposto acima, os fatores de emissão foram de 0,08% para o primeiro ano e 0,07% para o segundo ano, valores estes muito inferiores ao valor genérico proposto pelo IPCC que considera que 1% do N aplicado no solo, seja forma mineral ou orgânica é emitido como N-N_2O. O mesmo pode ser observado em Oliveira et al. (2013), que obteve fator de emissão via aplicação de vinhaça de 0,44%. Diferentemente de Zotelli (2012) que obteve para a aplicação deste resíduo orgânico fatores de emissão de 1,27% e 3,45%.

O estudo de um único fator de emissão não é aconselhável, pois as emissões de N_2O diferem muito em função do tipo de fertilizante, tipo de solo, etc (BOECKX; VAN CLEEMPUT, 2001; SNYDER et al., 2009). A maioria dos resultados obtidos em diversos estudos (DOBBIE; SMITH, 2003; ROCHETTE et al., 2004; JANTALIA, et al.,2008) demonstram a magnitude do fator de emissão proposto pelo IPCC. Devido à imensa faixa de valores de fator de emissão para fontes de N aplicadas ao solo, torna-se difícil a comparação entre estudos e a possível definição de um valor referência.

4.2 Efeito das doses de vinhaça sobre a comunidade microbiana do solo

4.2.1 Extração de DNA

O DNA das amostras ambientais foi extraído com sucesso, apresentando ótima qualidade e quantidade, cujas concentrações para cada amostra variaram em torno de 30 a 60 ng μL^{-1} (Figura 21).

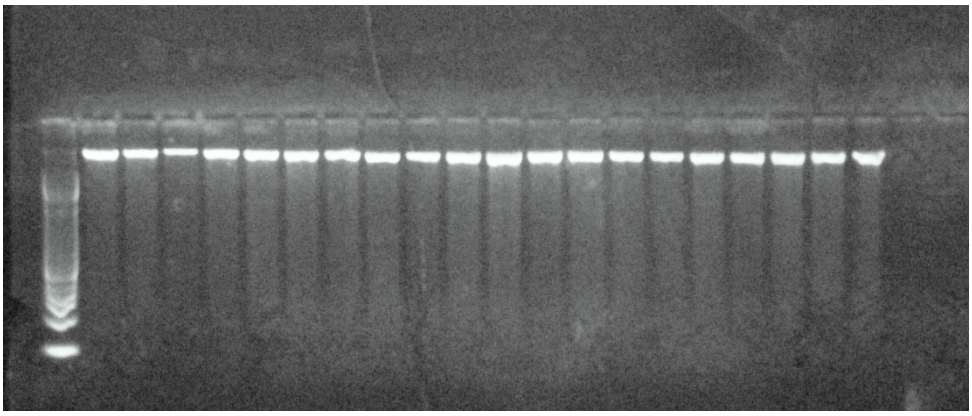
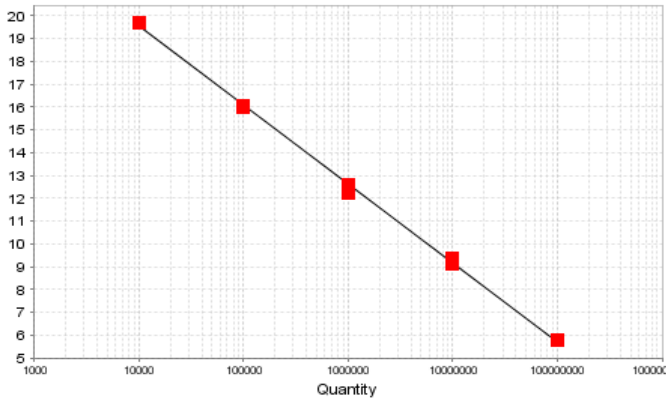


Figura 21 - Gel de agarose resultante da extração do DNA genômico das amostras ambientais. Padrão molecular: 100 pb

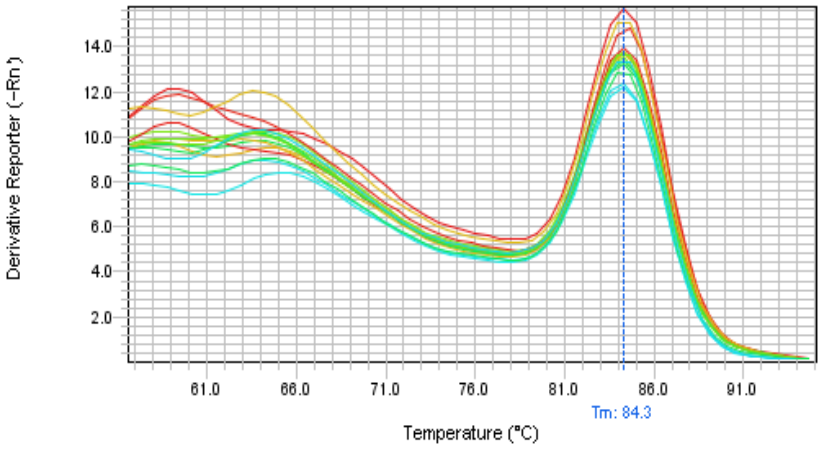
4.2.2 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR)

4.2.2.1 Análise da abundância da comunidade bacteriana do solo

As curvas-padrão foram feitas a partir de diluições em série do gene 16S rRNA, de 10^8 a 10^4 cópias do gene μL^{-1}. Estas foram feitas para cada um dos tempos de coleta e para cada ponto de diluição foram feitas três repetições. A Figura 22 mostra que as curvas geradas apresentaram ótimos coeficientes de correlação (R^2>0,99), o que é essencial já que as mesmas são usadas para interpolar os dados obtidos e determinar o número de cópias do gene-alvo presente em cada amostra analisada. Outro fator relevante é o pico na curva de *melting*, pois este demonstra a especificidade do *primer* na reação. Isso porque segmentos de DNA com composições nucleotídicas distintas apresentam diferentes picos, de modo que a presença de um único pico indica que todos os *amplicons* gerados se referem ao mesmo segmento de DNA.



(A)



(B)

Figura 22 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene 16S rRNA e (B) curva de *melting* das amplificações do gene 16S rRNA

Os dados de qPCR mostraram diferenças significativas ($p<0,05$) no número de cópias do gene 16S rRNA de bactérias em resposta à adição de vinhaça no primeiro ano, sendo que o resíduo levou a um aumento na abundância destes micro-organismos no solo. Contudo, no segundo ano essa diferença não foi significativa ($p>0,05$) (Tabela 7), de modo que esse estímulo ao crescimento bacteriano não foi observado. Um fato que poderia explicar esse fenômeno é a ocorrência de precipitação no dia da aplicação dos tratamentos no segundo ano. Esta pode ter provocado a diluição das doses de vinhaça aplicadas, eliminando assim o efeito das maiores concentrações de nutrientes do resíduo capazes de promover a multiplicação microbiana. No primeiro ano a abundância do gene no Tsolo foi de $2,26 \times 10^8$ cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de $1,98 \times 10^8$ cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as

abundâncias foram de 2,75x10^9, 2,00x10^9, 2,97x10^9 cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para os T150, T300 e T450. No segundo ano a abundância do gene no Tsolo foi de 6,91 x10^9 cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de 6,57 x10^9 cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de 7,57x10^9, 7,15x10^9, 7,57x10^9 cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para os T150, T300 e T450.

Apesar da importância dos micro-organismos do solo na realização de processos ainda não é bem estipulado como mudanças no habitat interferem nas comunidades e suas funções (BERTHRONG et al., 2009). Mudanças na forma de manejo, na maioria das vezes são acompanhadas por alterações características do solo como pH, umidade e disponibilidade de nutrientes, sendo que tais alterações influenciam as comunidades microbianas do solo (HE et al., 2012; KURAMAE et al., 2012).

Tabela 7 -Quantificação do gene 16S rRNA, comunidade total de bactéria, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça

Tratamentos	**2011**	**2012**
	cópias de genes g^{-1} solo	
Solo	2,26E+08 b	6,91E+09 a
300 m^3 ha^{-1} de água	1,98E+08 b	6,57E+09 a
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	2,75E+09 a	7,57E+09 a
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	2,00E+09 a	7,15E+09 a
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	2,97E+09 a	7,57E+09 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.2.2.2 Comunidade desnitrificante

As Figuras 23 e 24 mostram que as curvas padrões geradas, para os genes de potencial de desnitrificação apresentaram ótimos coeficientes de correlação (R^2>0,99), e eficiência de 90,73 % para o gene *nirk* e 66,41% para o gene *nosZ*.

Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos anos experimentais no potencial de desnitrificação (p>0,05) para gene *nirK* (Tabela 8), normalmente utilizado como indicador biológico de emissão de N_2O. Estes dados indicam que a vinhaça, embora capaz de aumentar a abundância total de bactérias do solo, não tem qualquer efeito sobre o gene *nirK*.

No primeiro ano a abundância do gene no Tsolo foi de 1,68x10^6 cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de 1,57x10^6 cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de 2,21x10^6, 1,86x10^6, 2,38x10^6 cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente

para as doses de T150, T300 e T450. No segundo ano a abundância do gene no Tsolo foi de $8,40x10^8$ cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de $7,65x10^8$ cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de $9,26x10^8$, $8,69x10^8$, $9,35x10^8$ cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para os T150, T300 e T450. É interessante considerar que nem todos os organismos desnitrificantes presentes em um determinado ambiente devem obrigatoriamente contribuir para o processo de emissão de N_2O, e que mudanças nas condições ambientais podem resultar em alterações de composição e abundância dos desnitrificantes ativos, independente da comunidade total (WERTZ, et al., 2006).

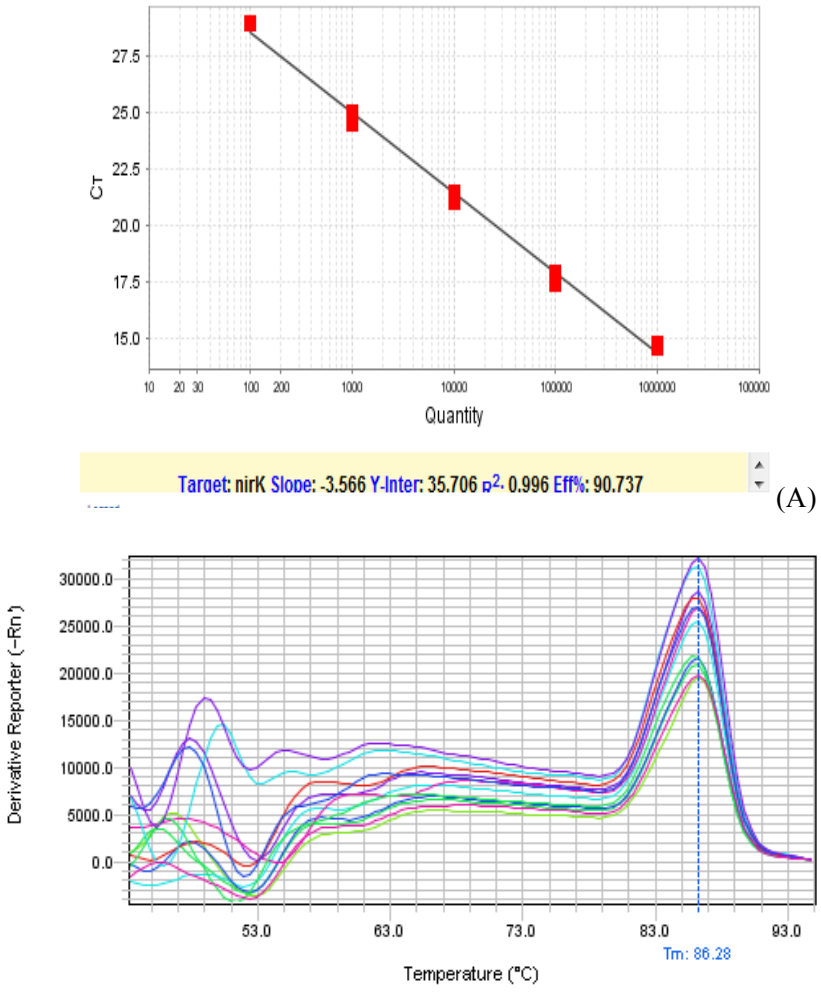


Figura 23 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene *nirK* e (B) Curva de *melting* das amplificações do gene *nirK*

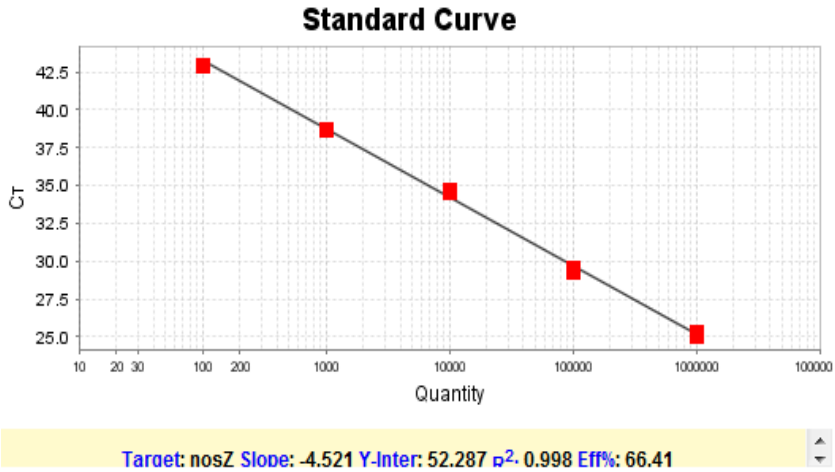
Tabela 8 -Quantificação do gene *nirK*, potencial de desnitrificação, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça

Tratamentos	**2011**	**2012**
	cópias de genes g^{-1} solo	
Solo	1,68E+06 a	8,40E+08 a
300 m^3 ha^{-1} de água	1,57E+06 a	7,65E+08 a
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	2,21E+06 a	9,26E+08 a
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	1,86E+06 a	8,69E+08 a
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	2,38E+06 a	9,35E+08 a

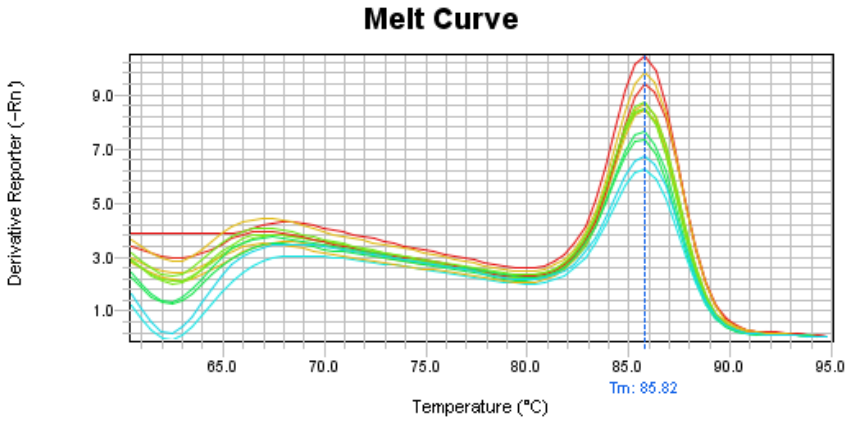
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

Diferentemente do gene *nirK,* o gene *nosZ*, também considerado indicador do potencial de desnitrificação do solo, apresentou diferenças significativas (p<0,05) nos dois anos experimentais (Tabela 9). Vale ressaltar que a resposta do gene *nosZ* a adição de vinhaça, no primeiro ano, foi apenas para a dose máxima, diferente do segundo ano que tal gene respondeu significativamente as três diferentes doses.

No primeiro ano a abundância do gene no Tsolo foi de 2,29 x10^7 cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de 2,74x10^7 cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de 4,85x10^7, 5,50x10^7, 6,43x10^7 cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para as doses de T150, T300 e T450 m^3 ha^{-1}de vinhaça. No segundo ano a abundância do gene no Tsolo foi de 6,61x10^7 cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de 5,71x10^7 cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de 1,06 x10^8, 1,06x10^8, 1,21x10^8 cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para as doses de T150, T300 e T450.



(A)



(B)

Figura 24 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene *nosZ* e (B) Curva de *melting* das amplificações do gene *nosZ*

Tabela 9 - Quantificação do gene *nosZ*, potencial de desnitrificação, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça

Tratamentos	**2011**	**2012**
	cópias de genes g^{-1} *solo*	
Solo	2,29E+07 c	6,61E+07 b
300 m^3 ha^{-1} de água	2,74E+07 bc	5,71E+07 b
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	4,85E+07 abc	1,06E+08 a
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	5,50E+07 ab	1,06E+08 a
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	6,43E+07 a	1,21E+08 a

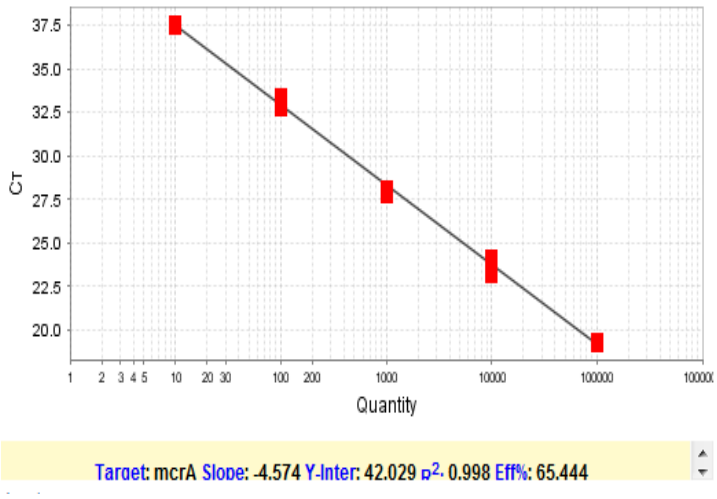
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Desnitrificação e nitrificação são processos biológicos que têm causado emissões de N_2O dos solos agrícolas. No entanto, a desnitrificação foi postulada como o processo dominante responsável pela emissão deste GEE em solos agrícolas (AULAKH et al., 1984) particularmente sob condições de alta umidade do solo (MATHIEU et al., 2006).

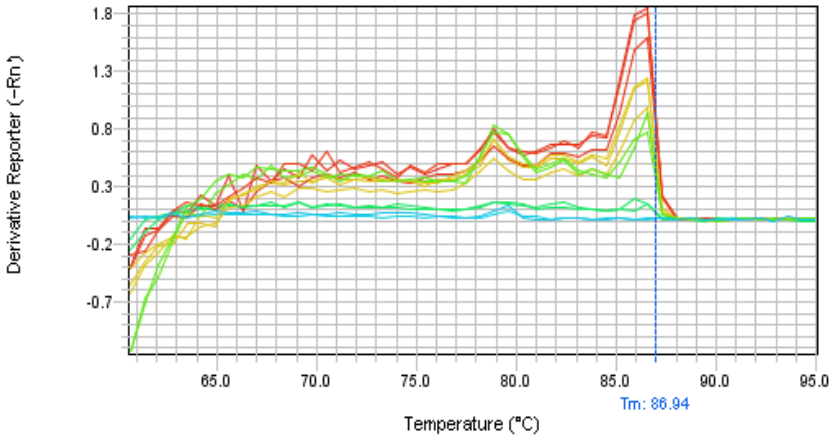
4.2.2.3 Comunidade metanogênica

No presente estudo, para quantificar a abundância do gene *mcrA* foram geradas curvas padrões (FIGURA 25) que apresentaram ótimos coeficientes de correlação (R^2>0,99), e eficiência de 65,44%.

Foram observadas diferenças significativas (p<0,05) entre o solo e os demais tratamentos (Tabela 10) no primeiro ano, sugerindo que o gene *mcrA* é muito mais relacionado à umidade do solo do que a conteúdo orgânico aplicado via vinhaça. Ressaltando que a falta de oxigênio, juntamente com a quantidade de matéria orgânica, cria um ambiente ideal para vários grupos de organismos anaeróbicos, como metanogênicos (DAR et al., 2008). Já no segundo ano, não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) entre os tratamentos (Tabela 10). No primeiro ano a abundância do gene no Tsolo foi de $1,27x10^7$ cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de $5,09x10^7$ cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de $5,03x10^7$, $1,74x10^7$, $3,06x10^7$ cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para as doses de T150, T300 e T450. No segundo ano a abundância do gene no Tsolo foi de $4,12x10^5$ cópias do gene g^{-1} solo, no Tágua foi de $1,12x10^5$ cópias do gene g^{-1} solo, já nas doses de vinhaça, as abundâncias foram de $2,02x10^5$, $1,35x10^5$, $1,47x10^5$ cópias do gene g^{-1} solo, respectivamente para as doses de T150, T300 e T450.



(A)



(B)

Figura 25 - qPCR: (A) Curva padrão desenvolvida para a quantificação do gene *mcrA*e (B) Curva de *melting* das amplificações do gene *mcrA*

Tabela 10 - Quantificação do gene *mcrA* , archaeas metanogênicas, em solo com aplicação de diferentes doses de vinhaça

Tratamentos	**2011**	**2012**
	cópias de genes g^{-1} *solo*	
Solo	1,27E+07 b	4,12E+05 a
300 m^3 ha^{-1} de água	5,09E+07 a	1,12E+05 a
150 m^3 ha^{-1} de vinhaça	5,03E+07 a	2,01E+05 a
300 m^3 ha^{-1} de vinhaça	1,74E+07 ab	1,35E+05 a
450 m^3 ha^{-1} de vinhaça	3,06E+07 ab	1,47E+05 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

5. CORRELAÇÕES DAS VARIÁVEIS BIOLÓGICAS COM AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS

As variáveis biológicas foram correlacionadas às variáveis ambientais resultando em diversas correlações significativas ($p<0,05$) (Tabela 10). Houve correlação negativa entre N_2O e a relação C/N do solo. Isto pode estar associado ao fato de que a presença de palha na superfície do solo pode facilitar o processo de imobilização do nitrogênio, devido à elevada relação C/N reduzindo assim as reações de desnitrificação e consequentes emissões de N_2O (SIGNOR, 2010).

O CH_4 teve correlação positiva com EPPA e com o teor de carbono do solo. Tal correlação pode ser justificada pelo fato de que este GEE pode ser produzido ou consumido de acordo com a aeração do solo e sua disponibilidade de carbono orgânico dissolvido (LI, 2007).

O gene *nirK* correlacionou-se negativamente com relação C/N; tal correlação, como já citada anteriormente deve-se ao fato de o processo de imobilização de N ser facilitado pela elevada relação C/N e consequente redução do potencial de desnitrificação.

O gene *mcrA* teve correlação positiva com EPPA e negativa com relação C/N, tal correlação demonstra a associação destes micro-organismos com a aeração do solo, a decomposição de matéria orgânica e atividades geoquímicas (ZINDER, 1998).

O gene *nosZ* teve correlação positiva com a umidade, facilmente justificável pelo fato de que os micro-organismos desnitrificantes são em sua maioria anaeróbios.

É importante ressaltar que não houve correlação entre as emissões de $N\text{-}N_2O$ e os genes de potencial de desnitrificação, assim como as emissões de $C\text{-}CH_4$ e o gene *mcrA*. Possivelmente este fato deve estar associado a sensibilidade das comunidades microbianas em responder as variações de temperatura e umidade do solo, principalmente entre os anos experimentais.

Tabela 11 – Correlação de Pearson para as variáveis analisadas.

	N_2O	CH_4	*16S rRNA*	*nirK*	*mcrA*	*nosZ*	Umidade	EPPA	N%	C%	Relação C/N
N_2O	-										
CH_4	0,49	-									
16S rRNA	0,01	0,66	-								
nirK	0,53	0,34	0,05	-							
mcrA	0,20	0,71	0,52	0,76	-						
nosZ	0,01	0,62	0,01	0,01	0,29	-					
Umidade	0,12	0,16	0,44	0,28	0,20	0,87*	-				
EPPA	0,01	0,88*	0,01	0,04	0,91*	0,01	0,39	-			
N%	0,12	0,21	0,12	0,55	0,19	0,34	0,85	0,09	-		
C%	0,10	0,84*	0,29	0,62	0,42	0,32	0,57	0,16	0,01	-	
Relação C/N	0,82*	0,70	0,50	0,85*	0,78*	0,44	0,29	0,70	0,2	0,19	-

Legenda - ** e *, significativo à 1 e 5%.
WFPS – espaço poroso preenchido por água

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que a aplicação de vinhaça ao solo aumenta a disponibilidade de nitrogênio (N) e carbono (C) para a microbiota endêmica e que, portanto, é capaz de provocar alterações nos ciclos biogeoquímicos de tais elementos e sobre a comunidade de bactérias desnitrificantes e metanogênicas do solo.

A aplicação de vinhaça no solo proporciona aumento nas emissões de N-N_2O, contudo, o fator de emissão é baixo, o que indica que pouco do N aplicado via vinhaça é perdido na forma de gás. Além disto, a utilização deste co-produto, mesmo em doses elevadas não estimula a emissão de C-CH_4. Portanto a aplicação de vinhaça ao solo como fertirrigação é uma ótima forma de destino às elevadas quantidades produzidas pelo setor sucroenergético, considerando sua contribuição no efeito estufa.

A utilização da vinhaça como fertilizante do solo, em áreas de cana-de-açúcar sem queima, modelo sustentável para a produção de cana de açúcar, aumenta significativamente o total de bactérias no solo e a atividade do gene *nosZ,* que é responsável pela redução de N_2O a N_2, considerado um gás inerte que não agrava o efeito estufa. Em outras palavras a aplicação de vinhaça estimulou apenas os genes com função mitigadora de GEE.

Enfim é importante que estudos continuem sendo feitos na busca de uma compreensão das complexas dinâmicas do C e do N durante o processo de decomposição de co-produtos agrícolas, como a vinhaça. Uma compreensão mais detalhada e precisa poderia ser feita a partir do uso de isótopos ^{15}N e ^{13}C aplicados a estudos sobre dinâmica desses elementos, associados às atividades microbianas no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDISCOTT, T.M. **Nitrate, agriculture and the environment**. Wallingford: CABI, 279p. 2004.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 467 p.

ALFAIA, S.S.; JACQUIN, F.; GUIRAUD, G. Transformation of nitrogen fertilizers in Brazilian Amazonia soils. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, Logan, UT, v. 9, p. 335-340, 1995.

ALFAIA, S.S. Destino de fertilizantes nitrogenados marcados com ^{15}N em dois solos da região da Amazônia Central.In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 21., Petrolina, 1994. **Anais...**Campinas, SP: SBCS, 1994. p. 260-261.

ALFAIA, S.S. Mineralização do nitrogênio incorporado como material vegetal em três solos da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa, MG, v. 21, p. 387-392, 1997.

ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 105, p. 11512-11519, 2008.

ALLEN, L.H.; JONES, P.H.; JONES, J.W. Rising atmospheric CO_2 and evapotranspiration. In: NATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN EVAPOTRANSPIRATION, 1985, Chicago, Ill. **Advances in evapotranspiration; proceedings…** St. Joseph, MI: ASAE, 1985. p. 13-27.

AMANN, R.I.; LUDWING, W. Ribosomal RNA-Targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 24, p. 555-565, 2000.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143-169, 1995.

AMSTEL, A. V., Global anthropogenic methane emission comparisons. **IGAC Ativities Newsletter**, 12, 11-17, 1998.

AULAKH, M.S., RENNIE, D.A., PAUL, E.A. Acetylene and N-Serve effects upon N_2O emissions from NH4 and NO3 treated soils under aerobic and anaerobic conditions. **Soil Biology Biochemical**. 16, 351–356. 1984.

AYROZA, M. R. **Mudança climática e moral**: dois caminhos que se cruzam. 2011. 295 p. Dissertação (Mestrado em Administração Pública e Governo) - Escola de Administração de Empresas de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 2011.

ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, Los Angeles, CA, v. 2, p. 69-92, 2009.

BALL, B.C.; SCOTT, A.; PARKER, J.P. Field N_2O, CO_2 and CH_4 fluxes in relation to tillage, compaction and soil quality in Scotland. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 29-39, 1999.

BARROS, R.P. de; VIÉGAS, P.R.A.; SILVA, T.L. da; SOUZA, R.M. de; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R.A.; BARRETTO, M.C.V.; MELO, A.S. de. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.

BATEMAN, E. J.; BAGGS, E. M. Contribution of nitrification and desnitrification to N_2O emissions from soils at different water-filled pore space. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 41, n. 6, p.379-388, 2005.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. A impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; AMADO, T.J.C.; MARTIN-NETO, L.; FERNANDES, S.V. Organic matter storage in a sandy clay loam Acrisol affected by tillage and cropping systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 54, p. 101–109, 2000.

BENT, S.J.; FORNEY, L.J. The tragedy of uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 689-695, 2008.

BERTHRONG, S. T.; SCHADT, C.W.; PIÑEIRO, G.; JACKSON, R.B.Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American Grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, n. 19, p. 6240-6248, 2009.

BIELDERS, C. L.; DEBACKER, L. W.; DELVAUX, B. Particle density of volcanic soils as measured with a gas pycnometer. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 54, n. 3, p. 822-826, 1990.

BLAKE, G.R.; HARTGE, K.H. Bulk density. In: KLUTE, A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Part 1 - Physical and mineralogical methods. Madison, Wisconsin: ASA, 1986. p. 363–375.

BOECKX, P.; VAN CLEEMPUT, A. Estimates of N_2O and CH_4 fluxes from agricultural lands in various regions of Europe. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 60, n. 1-3, p. 35-47, 2001.

BOECKX, P.; VAN CLEEMPUT, O.; VILLARALVO, I. Methane oxidation in soils with different textures and land use. **NutrientCycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.49, n.1-3, p. 91-95, 1997.

BOHRZ, G.I. **Geração de metano em lagoa anaeróbia:** ***um estudo de caso em abatedouro de bovinos***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

BOMBARDI, R. J.; CARVALHO, L.M. V. Variabilidade do regime de monções sobre o Brasil: o clima presente e projeções para um cenário com 2x CO_2usando o modelo MIROC. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São Paulo, v.23, p.58-72, 2008.

BOUWMAN, A.F. Direct emissions of nitrous oxide from agricultural soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 46, 53-70. 1996.

BOUWMAN, A.F. Nitrogen oxides and tropical agriculture. **Nature**, London, v. 392, p. 866-867, 1998.

BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3769–3775, 1998.

BRAKER, G.;TIEDJE, J.M. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3476-3483, 2003.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Segunda Comunicação Nacional do Brasil à Convenção- Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima**. Brasília, DF, 2010. v.2, p.280.

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

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

CAMARGO, A.M.M.P.; KÜSTERS, J.; LAMMEL, J.; KUHLMANN,H. Methods to estimate on-field nitrogen emissions from crop production as an input to LCA studies in the agricultural sector. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, Berlin, v. 5, n. 6, p. 349-357, 2008.

CAMARGO, O.A. de; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas**. Ed.rev.atual. Campinas: Instituto Agronômico, 2009. 77p. (Boletim Técnico, 106).

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. 2. ed. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.

CANNAVAN, F. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARMO, J. B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L. C.; DE SOUSA NETO, E. R.; PITOMBO, L. M.; DUARTE-NETO, P. J.; VARGAS, V. P.; ANDRADE, C. A.; GAVA, G. J.; ROSSETTO, C. R.; CANTARELLA, H.; NETO, A. E.; MARTINELLI; L. A. In Field Green house gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **Global Change Biology Bioenergy**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 267-280, 2012.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC. **Banco de dados do Controle Mútuo Agroindustrial** – Módulo Industrial. Safra 2011/2012. Piracicaba, SP,2012a. Disponível em: <http://www.ctcanavieira.com.br>. Acesso em: 25 fev. 2013.

CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; CERRI, C.E.P.; FELLER, C. Carbon cycling and sequestration opportunities in South America: the case of Brazil. **Soil Use and Management**, Oxford, v. 20, special issue, p. 248-254, 2004.

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

CERRI, C.E.P.; SPAROVEK, G.; BERNOUX, M.; EASTERLING, W.E.; MELILLO, J.M.; CERRI C.C. Tropical agriculture and global warming: impacts and mitigation options. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 83-89, 2007.

CERRI, C. C.; CERRI, C. E. P. Agricultura e aquecimento global. **Boletim Informativo da SBCS,** Campinas, v. 23, p. 40-44, 2007.

CERRI, C. C.; BERNOUX, M.; MAIA, S. M. F.; CERRI, C. E. P.; COSTA JÚNIOR, C.; FEIGL, B. J.; FRAZÃO, L. A.; MELLO, F. F. C.; GALDOS, M. V.; MOREIRA, C. S.; CARVALHO, J. L. N. Green house gás mitigations in Brazil for land-use change, livestock and agriculture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 1, p. 102-116, 2010.

CHEN, Z.; HOU, H.; ZHENG, I.; QIN, H.; ZHU, Y.; WU, JINSHUI, W. WEI, W. Influence of fertlization regimes on a nosZ-containing denitrifying community in a rice paddy soil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.92, n.5, p. 1064-1072, 2010.

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

CORTON, T.M.; BAJITA, J.B.; GROSP, F.S.; PAMPLONA, R.R.; ASSIS JUNIOR, C.A.; WASSMANN, R.; LANTIN, R.S.; BUENDIA, L.V. Methane emission from irrigated and

intensively managed rice field in Central Luzon (Philippines). **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 58, p. 37-53, 2000.

COSTA, F.S.; ZANATTA, J.A.; BAYER,C. Emissão de gases do efeito estufa em agroecossistemas e potencial de mitigação. In: SANTOS, D.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo:** ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 545-556.

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

CUNHA, R.C.A.; COSTA, A.C.S.; MASET FILHO, B.; CASARINI, D.C.P. Effects of irrigation with vinasse and dynamics of its constituents in the soil: I – physical and chemical aspects. **Water Science Technology**, London, v. 19, n. 8, p. 155-165, 1981.

DALAL, R.C.; WANG, W; ROBERTSON, G.P.; PARTON, W. J. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. **Australian Journal of Soil Research,** Melbourne, v. 41, p. 165-195, 2003.

DANDIE, C.E.; BURTON, D.L.; ZEBARTH, B.J.; TREVORS, J.T.;GOYER, C. Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, p. 128-138, 2007.

DANDIE, C.E.; WERTZ, S.; LECLAIR, C.L.; GOYER C.; BURTON, D.L.; PATTEN, C.L.; ZEBARTH, B.J.; TREVORS, J.T. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. **FEMS Microbiology Ecology,** Amsterdam, v. 77, p. 69-82, 2001.

DAR, S.A.; KLEEREBEZEM, R.; STAMS, A.J.M.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Competition and coexistence of sulface-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 78, p. 1045-1055, 2008.

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

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

DENMEAD OT, MACDONALD BCT, WHITE I, GRIFFITH DWT, BRYANT G, NAYLOR T, WILSON, S. Evaporation and carbon dioxide exchange by sugarcane crops. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists** 31, 116-124. 2009.

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

DOBBIE, K.E.; SMITH, K.A. Impact of different forms of N fertilizer on N_2O emissions from intensive grassland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.67, n.1, p.37-46, 2003.

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

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: EMBRAPA, CNPS, 1997. 202 p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos** (SiBCS). 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa Solos, 2006. 306p.

EPSTEIN, E., BLOOM, A.J. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, second** ed. Sinauer, Sunderland, MA. 2005.

ESCOBAR, L.F. **Emissão de gases de efeito estufa em sistemas de manejo em solo do planalto médio do Rio Grande do Sul**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

FAGERSTONE, K.D.; QUINN, J.C.; BRADLEY, T.H.; DE LONG, S.K.; MARCHESE, A.J. Quantitative measurement of direct nitrous oxide emissions from microalgae cultivation. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 45, p. 9449-9456, 2011.

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F. **Qualidade do solo e meio ambiente**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. (Documentos, 197).

FRAZÃO, L. A. **Conversão do Cerrado em pastagem e sistemas agrícolas**: eleitos na dinâmica da matéria orgânica do solo. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura,Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FIRESTONE, M.K.; DAVIDSON, E.A. **Microbial basis of NO and N_2O production an consumption in soils**. New York: John Wiley, 1989.

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

Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 129-234.

GEETS, J.; COOMAN, M.; WITTEBOLLE, L.; HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; VOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, p. 211–221, 2007.

HALLIN, S.; LINDGREN, P.E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 1652-1657, 1999.

HANDELSMAN, J.; SMALLA, K. Conversations with the silent majority.**Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 271-273, 2003.

HANSEL, C.M.;FENDORF, S.; JARDINE, P.M.; FRANCIS, C.A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore,v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

HARRISON, R. M. Pollution: Causes, effects, and control. **The Royal Society of Chemistry**: Cambridge, 2 ed., 579p, 1995.

HENRY,S.; BAUDOUIN, E.; GUTIÉRREZ, J.C.L.; LAURENT, F.M.; BRAUMAN, A.; PHILIPPOT, L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 289-290, 2005.

HASSUDA, S. **Impactos da infiltração da vinhaça de cana no aquífero de Bauru**. 1989. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

HE, X.Y.; SU, Y.R.; LIANG, Y.M.; CHEN, X.B.; ZHU, H.H.; WANG, K.L. Land reclamation and short-term cultivation change soil microbial communities and bacterial metabolic profiles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, n. 5, p.1103-1111, 2012.

HEID, C.A.; STEVENS, J. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 986-994, 1996.

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

HIGUCHI, R., C. FOCKLER. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HONTY, G. **América Latina**: a hora de uma economia climática. Brasília, DF: ANDI - Agência de Notícias dos Direitos da Infância, 2009. Disponível em: <http://www.mudancasclimaticas.andi.org.br/content/america-latina-hora-de-uma-economia-climatica>. Acesso em: 15 maio 2013.

HÜTSCH, B.W.; WEBSTER, C.P.; POWLSON, D.S. Long-term effects of nitrogen fertilization on methane oxidation in soil of the Broadbalk wheat experiment. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1307–1315, 1993.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **Guidelines for national greenhouse gas inventories**: agriculture, forestry and other land use. Hayama: National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006. v. 4. Disponível em:<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/206gl/vol4.html>. Acesso em: 12 maio 2013.

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

IZQUIERDO, J.A. **Microbial communities involved in the nitrogen cycle at the soil agregate scale**. 2007. Dissertation (Doctor of Microbiology) – University of Massachusetts Amherst, Massachusetts, 2007.

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

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

JANZEN, H. H.; CAMPBELL, C. A.; IZAURRALDE, R. C.; ELLERT, B. H.; JUMA, N.; McGILL, W. B; ZENTNER, R.P. Management effects on soil C storage on the Canadian prairies. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 47, p. 181-195, 1998.

JOHNSON, J.M.F.; REICOSKY, D.C.; ALLMARAS, R.R.; SAUER, T.J.; VENTEREA, R.T.; DELL, C.J. Greenhouse gas contributions and mitigation potential of agriculture in the central USA. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 83, p. 73–94, 2005.

KHALIL, K.; MARY, B.; RENAULT, P. Nitrous oxide production by nitrification and desnitrification in soil aggregates as affected by O2 concentration. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 687-699, 2004.

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

KLEIN, V.A.; LIBARDI, P.L. Densidade e distribuição do diâmetro dos poros de um Latossolo Vermelho sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 857-867, 2002.

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

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A.Soil characteristics more strongly influence soil bacterialcommunities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology,** Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 12-24, 2012.

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

LAL, R.; KIMBLE, J.; STEWART, B.A. World soils as a source or sink for radiatively-active gases. In: LAL, R.; KIMBLE, J.; LEVINE, E.; STEWART, B.A. (Ed.). **Soil management and greenhouse effect.** Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 1995.p. 1-7.

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

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

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

LEIGH, J. A.; ALBERS, S. V.; ATOMI, H.; ALLERS, T. Model organisms forgenetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 577–608, 2011.

LETTINGA, G.; FIELD, J.; VAN LIER, J.; ZEEMAN, G.; HULSHOFF POL, L.W.Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future. **Water Science and Technology**, London, v. 35, p. 5-12, 1997.

LI, C. Quantifying greenhouse gas emissions from soils: Scientific basis and modeling approach. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 53, p. 344-352, 2007.

LIEBIG, M.A.; MORGAN, J.A.; REEDER, J.D.; ELLERT, B.H.; GOLLANY, H.T.; SCHUMAN, G.E. Greenhouse gas contributions and mitigation potential of agricultural practices in northwestern USA and western Canada. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 83, p. 25–52, 2005.

LORENZI, A. S. **Implementação da técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de Microcystis e genótipos potencialmente produtores de**

microcistinas.2008. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.R. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, n. 7, p. 582-564, 2008.

MAJUMDAR, D.; MITRA, S. Methane consumption from ambient atmosphere by a TypicUstochrept soil as influenced by urea and two nitrification inhibitors. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 140–145, 2004.

MAGALHÃES, C.; BANO, N.; WIEBE, W.J.;BORDALO, A.A.; HOLLIBAUGH, J.T. Dynamics of nitrous oxide redutase genes (nosZ) in intertidal rocky biofilms and sediments of the Douro River Estuary (Portugal), and their relation to N-biogeochemistry. **Microbiology Ecology**, Heidelberg, v.55, 259-269. 2008.

MARIN, F.; NASSIF, D.S.P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 232–239, 2013.

MARSTORP, H. Interections in the microbial use of soluble plant components in soil. **Biology and Fertility Soils**, v.22, p. 45-52, 1996.

MATHIEU, O., HÉNAULT, C., LÉVÊQUE, J., BAUJARD, E., MILLOUX, M.J., ANDREUX, F. Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using 15N tracers. **Environmental Pollution**, London, v. 144, p. 933-940, 2006.

McINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P. Review of methane fermentation fundamentals. In: WISE, D.L. (Ed). **Fuel gas production from biomass**. New York: Chemical Rubber, 1981. v.1, p. 19-46.

MERINO, P.; ESTAVILLO, J.M.; BESGA, G.; PINTO, M.; GONZALES-MURUA, C.Nitrification and denitrification derived N2O production from a grassland soil under application of DCD and Actilith F2. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 60, p. 9–14, 2001.

METZ, B.; DAVIDSON, O.; CONINCK, H.; LOOS, M.; MEYER, L. (Ed.). **Carbon dioxide capture and storage**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 431 p. (IPCC SpecialReport).

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

MORALES, S. E.; COSART, T.; HOLBEN, W. E. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. **The ISME Journal,** London, v. 4, n. 6, p. 799-808, 2010.

MOSIER, A.; WASSMANN, R.; VERCHOT, L.; KING, J.; PALM, C. Methane and nitrogen oxide fluxes in tropical agricultural soils: sources, sinks and mechanisms. **Environment, Development and Sustainability**, Dordrecht, v. 6, p. 11-49, 2004.

MOSIER, A.; SCHIMEL, D.; VALENTINE, D.; BRONSON, K.; PARTON, W. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. **Nature,** London, v. 350, p. 330-332, 1991.

MURREL, J.C.; McDONALD, I.R.; BOURNE, D.G. Molecular methods for the study of methanotroph ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 103-14, 1998.

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

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

NETO, P.T. **Ecopolítica das mudanças climáticas:** o IPCC e o ecologismo dos pobres. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Políticas) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NEVISON, C. D. Review of the IPCC methodology for estimating nitrous oxide emissions associated with agricultural leaching and runoff. **Chemosphere**, Oxford, v. 2, n. 3-4, p. 493-500. 2000.

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

NYBORG, M.; SOLBERG, E.D.; MALHI, S.S.; IZAURRALDE, R.C. Fertilizer N, cropresidue, and tillage alter soil C and N content in a decade. In: LAL, R.; KIMBLE, J.; LEVINE, E.; STEWART, B.A. (Ed.).**Soil management and greenhouse effect.** Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 1995. p. 93-99.

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

OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C.C.; FEIGL, B. J. Soilgreenhouse gás fluxesfromvinasseapplication in Brasiliansugarcaneareas. **Geoderma**, Amsterdam, v. 200-201, p. 77-84, 2013.

OMETTO, A.R.; HAUSCHILD, M.Z.; ROMA, W.N.L. Life cycle assessment of fuel ethanol from sugarcane in Brazil. **International Journal of Life Cycle Assessment,** Berlin, v. 14, n. 3, p. 236-247, 2009.

ORPHAN, V.J.; JAHNKE, L.L.; EMBAYE, T.; TURK, K.A.; PERNTHALER, A.; SUMMONS, R.E.; DES MARAIS, D.J. Methanogenic biosignatures in microbial mats Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. **Geobiology**, New York, v. 6, p. 376–393, 2008.

PARTON, W.J.; MOSIER, A.R.; OJIMA, D.S.; VALENTINE, D.S.; SCHIMEL, D.S.; WEIER, K.; KULMALA, A.E. Generalized model for N_2 and N_2O production from nitrification and denitrification. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 10, p. 401-412, 1996.

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

PASTORELLI, R.; LANDI, S.; TRABELSI, D.; PICCOLO, R.; MENGONI, A.; BAZZICALUPO, M.; PAGLIAI, M. Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.40, p. 46-58, 2011.

PAULA, F. S. **Diversidade e estrutura funcional de comunidades microbianas em solos da Amazônia e resposta a mudanças na forma de uso do solo**. 2012. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PAVEI, M.A. **Decomposição de resíduos culturais e emissões de gases do efeito estufa em sistemas de manejo do solo em Ponta Grossa (PR).**2005. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PISSIONI, L.L.M. **Emissão de N_2O pela palhada da cana-de-açucar na região de Iracemápolis, SP.**2011. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

PHILIPPOT, L. Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment**. Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 33, p. 200-204, 2005.

RAIJ, B. VAN; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: InstitutoAgronômico, 2001. 284p.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

REEVE, J.N.; NOLLING, R.M.M.; SMITH, D.R. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 5975-5986, 1997.

REICOSKY, D.C. Tillage-induced CO_2 emission from soil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 49, p. 273–285, 1997.

RIBEIRO, G.A. **Efeito de período de incubação de adubos verdes (mucuna e puerária) na liberação de nitrogênio (^{15}N) e enxofre (^{5}S) para o arroz**. 1996. 82 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

ROBERTSON, G.P.; GRACE, P.R. Greenhouse gas fluxes in tropical and temperate agriculture: the need for a full-cost accounting of global warming potentials. **Environment, Development and Sustainability**, Dordrecht, v. 6, p. 51–63, 2004.

RODELLA, A.A.; FERRARI, S.E. A composição da vinhaça e efeitos de sua aplicação como fertilizante na cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.90, n.1, p.380-389, 1977.

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

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a mini review. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 135-147, 1997.

ROSSETTO, A.J. Utilização agronômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar:**cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, p.435-504.

RUSER, R.; FLESSA, H.; RUSSOW, R.; SCHMIDT, G.; BUEGGER, F.; MUNCH, J.C. Emission of N_2O, N_2 and CO_2 from soil fertilized with nitrate: effect of compaction, soil moisture and rewetting. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 263-274, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHAEFER, S. Nitrogênio. Boituva, SP: Tabela Periódica On Line, 2011. Disponível em: <http://tabela.oxigenio.com/nao_metais/elemento_quimico_nitrogenio.htm>. Acesso em: 15 jun. 2013.

SCALA, D.J.; KERKHOF, L. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. **FEMS Microbiology**,Amsterdam, v.162, p. 61-68, 1998.

SCHMIDT, E. Nitrification in soil.In: STEVENSON, F.J.; BREMNER, J.M.; HAUCK, R.D.; KEENEY, D.R. **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA, 1982. (Agronomy Series, 22).

SCHULTEN, H.; HEMPFLING, R. Influence of agricultural soil management on humus composition and dynamics: classical and modern analytical techniques. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 142, p. 259-271, 1992.

SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C. **Balanço de energia e emissões de GEE na produção do açúcar e álcool orgânico na Usina São Francisco**. São Paulo: Native Alimentos, 2007. Disponível em: <http://www.nativealimentos.com.br/media/pt-br/pdf/inventario_CO2.pdf>. Acesso em: 12 maio 2013.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

SILVA, A.J.N.; RIBEIRO, M.R. Caracterização de um Latossolo Amarelo sob cultivo contínuo de cana-de-açúcar no Estado de Alagoas: propriedades químicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 291-299, 1998.

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

SINGH, B.K.; BARDGETT, R.D.; SMITH, P.; REAY, D.S. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 8, p. 779–790, 2010.

SINGH, B.K.; TATE, K.; THOMAS, N.; ROSS, D. E. S.; SINGH, J. Differential effect of afforestation on nitrogen-fixing and denitrifying communities and potential implications for nitrogen cycling. **Soil Biology & Biochemistry,**Oxford, v. 43, p. 1426-1433, 2011.

SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (q-pcr)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiological Ecology**, Amsterdam, v. 67, p. 6-20, 2009.

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

SOUBES, M. Microbiologia de ladigestion anaeróbia. In: TALLER E SEMINARIO LATINOAMERICANO, 3., 1994, Montevideo, Uruguay. **Tratamiento anaerobio de aguas residuales**. Montevideo, Uruguay, 1994. p. 15-27.

STEUDLER, P.A.; MELILLO, J.M.; BOWDEN, R.D.; CASTRO, M.S.; LUGO, A.E. The effects of natural and human disturbances on soil nitrogen dynamics and trace gas fluxes in Puerto Rican wet forest. **Biotropica**, Washington, DC, v. 23, p. 356-363, 1991.

STEVENS, R.J.; LAUGHLIN, R.J. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 52, n. 2-3, p. 131-139, 1998.

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

THROBÄCK, I.N.; ENWALL, K.; JARVIS, A.; HALLIN, S. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 401-417, 2004.

TRENBERTH, K. E. et al. Observations: Surface and Atmospheric Climate Change. In: SOLOMON, S. D. et al. (Ed.) **Climate Change 2007**: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Dados e cotações**. São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Acesso em: 15 maio 2013.

VAN WAMBEKE, A. **Soils of the tropics**: properties and appraisal. 1.ed. New York: McGraw-Hill, 1992. 333p.

VARGAS, L.K.; SCHOLLES,D. Biomassa microbiana e produção de C-CO2 e N mineral de um solo Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 35-42, 2000.

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

WADT, L.C. **Cultivo de *Pleurotus spp.* em vinhaça visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WATSON, RT., H. ROHDE, H. OESCHGER, AND U. SIEGENTHALER. 1990. GREENHOUSE GASES AND AEROSOLS. In: Houghton, J.T., Jenkins, G.J. and Ephraums, J.J. (eds.). **Climate Change, The IPCC Scientific Assessment**, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-40.1990.

WAGNER, W.L.; WELLER, S.G.; SAKAI, A. Monograph of Schiedea (Caryophyllaceae-Alsinoideae). **Systematic Botany Monographs**, Ann Arbor, v. 72, p. 1-169, 2005.Disponível em: **http://www.nhbs.com/systematic_botany_monographs_sefno_33121.html.**

WANG, Z.; INESON, P. Methane oxidation in a temperate coniferous forest soil: effects of inorganic N. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 427-433, 2003.

WEIER, K.L. N_2O and CH_4 consumption in sugarcane soil after variation in nitrogen and water application. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1931-1941, 1999.

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

WILMS,R.; SASS, H.; KOPKE, B.; CYPLONKA, H.; ENGELEN, B. Methane and sulphate profiles within the subsurface of a tidal flat are reflected by distribution of sulphate – reducing bacteria and methanogenicarchaea. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 611-621, 2007.

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

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

YOSHIDA, S. **Tropical climate and its influence on rice**. Los Baños, Philippines: IRRI, 1978. (Paper Series, 20).

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

ZOTELLI, L. C. **Palha e vinhaça: emissões de CO_2, N_2O E CH_4 em solo com cana-de-açúcar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2012.