Gabriela Mercuri Quiterio

“AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA NO SOLO MEDIANTE ADIÇÃO DO BIOFERTILIZANTE”

“Evaluation of vinasse biodegradation in soil by addition of biofertilizer”

LIMEIRA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE TECNOLOGIA

Gabriela Mercuri Quiterio

"AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA NO SOLO MEDIANTE ADIÇÃO DO BIOFERTILIZANTE"

Orientador(a)/Supervisor: Profª Drª. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

"EVALUATION OF VINASSE BIODEGRADATION IN SOIL BY ADDITION OF BIOFERTILIZER"

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Tecnologia, na área de concentração Tecnologia e Inovação.

Master ddissertation presented to the Graduate Program of the School of Technology of the State University of Campinas to obtain the Master grade of Technology, in concentration area Technology and Innovation.

LIMEIRA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR VANESSA EVELYN COSTA CRB-8/8295
BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL
UNICAMP

Quiterio, Gabriela Mercuri, 1986-
Q48a Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante/ Gabriela Mercuri Quiterio. -
Limeira, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cassiana Maria Reganhan Coneglian.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Vinhaça. 2. Biofertilizantes. 3. Biorremediação. I. Coneglian, Cassiana Maria Reganhan II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. III. Título

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of vinasse biodegradation in soil by addition of biofertilizer.

Palavras-chave em inglês (Keywords):

1- Vinasse
2- Biofertilizers
3- Bioremediation

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

Titulação: Mestra em Tecnologia

Banca examinadora: Cassiana Maria Reganhan Coneglian, Marta Siviero Guilherme Pires, Dejanira de Franceschi de Angelis.

Data da Defesa: 22-02-2013

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante

Autor: Gabriela Mercuri Quitério

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Cassiana Maria Reganhan Coneglian
FT/UNICAMP

Prof. Dr. Marta Siviero Guilherme Pires
FT/UNICAMP

Prof. Dr. Dejanira de Franceschi de Angelis
UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por essa etapa realizada.

Agradeço à minha família pelo apoio e companheirismo.

Agradeço à Profª. Drª. Cassiana Maria Reganhan Coneglian pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Profº Dr. Abílio Lopes - LEAL e do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia, Ádria Caloto de Oliveira, Gilberto de Almeida, Anjaína Fernandes de Albuquerque, Josiane Ap. de Souza Vendemiatti e Geraldo Dragoni Sobrinho, pela amizade e colaboração na realização dos experimentos.

Agradeço à Ana Paula Justiniano Rego e Anita Inafuku e a todos os colegas de Laboratório de Microbiologia Ambiental da Faculdade de Tecnologia pela amizade e colaboração.

Agradeço à Capes pela bolsa concedida.

Agradeço à Microbiol Biotecnologia por possibilitar a realização da pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ensaio de lixiviação de íons em colunas de PVC de 60, 40 e 20 cm. ... 20

Figura 2. Tratamentos realizados no ensaio de biodegradação da vinhaça no solo acrescido de biofertilizante Microgeo pelo método respirométrico de Bartha nos experimentos 1 e 2. ... 22

Figura 3. Resultado do teste de toxicidade com Daphnia similis após o ensaio de lixiviação de íons. ... 31

Figura 4. Resultados da geração média acumulada de CO2 em ensaio de respirometria avaliados em respirometros de Bartha, durante o período de 27 dias incubados e temperatura de 26 ± 2ºC, no experimento 1. ... 33

Figura 5. Resultados da geração média acumulada de CO2 em ensaio de respirometria avaliados em respirometros de Bartha, durante o período de 90 dias incubados e temperatura de 26 ± 2ºC, no experimento 2. ... 34

Figura 6. Germinação relativa da semente após teste respirométrico 1. ... 39

Figura 7. Germinacao relativas das sementes para as amostras Solo Cana, Solo + Vinhaça + biofertilizante, Solo + vinhaça e vinhaça nas concentrações 1%, 3%, 5%, 7% e 10%. ... 40

Figura 8. Germinação relativa da semente após segundo teste respirométrico ... 41

Figura 9. Ensaio de toxicidade aguda com o organismo-teste Daphnia similis após teste respirométrico, avaliado em CE50. ... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns efeitos da vinhaça no solo 7

Tabela 2. Lista de trabalhos realizados utilizando respirômetros de Bartha e Pramer 13

Tabela 3. Caracterização físico-química da vinhaça e do biofertilizante utilizados no experimento 1. 26

Tabela 4. Caracterização físico-química da vinhaça e do biofertilizante utilizados no experimento 2. 26

Tabela 5. Resultados das análises físico-químicas da vinhaça coletada para o experimento 2. 28

Tabela 6. Resultado das análises físico-químicas do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 1. 29

Tabela 7. Resultado da Análise Granulométrica do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 1. 29

Tabela 8. Resultado das análises físico-químicas do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 2. 30

Tabela 9. Resultado da Análise Granulométrica do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 2. 30

Tabela 10. Estimativa da atividade microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) expressa em µg de FDA hidrolisado em 5g de solo e CO2 acumulado em 27 dias no experimento 1. 36

Tabela 11. Estimativa da atividade microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) expressa em µg de FDA hidrolisado em 5g de solo e CO2 acumulado em 90 dias no experimento 2. 37

Tabela 12. Resultado do teste de fitotoxicidade com Phaseolus vulgaris L.. Altura e peso seco médios. 44

Tabela 13. Quantificação de bactérias e fungos após o processo de biodegradação em teste respirométrico durante o período de 27 dias, avaliados em Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo seco (UFC/g). Experimento 1. 46

Tabela 14. Quantificação de batérias e fungos do solo cana e do solo após o processo de biodegradação em teste respirométrico durante o período de 90 dias, avaliados em Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo (UFC/g). Experimento 2. 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVO 3
2.1. Objetivo Geral 3
2.2. Objetivos Específicos 3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
3.1. Etanol no Brasil 4
3.1.1. Caracterização da Vinhaça 5
3.1.2. Efeitos da Vinhaça no Meio Ambiente 6
3.1.3. Vinhaça e Legislação Ambiental 8
3.2. Biofertilizante 9
3.3. Biorremediação 10
3.4 Biodegradação e Toxicidade 14
4. MATERIAL E MÉTODOS 16
4.1. Coleta das Amostras de Solo, Vinhaça e Biofertilizante 16
4.1.1 Coleta de Solo 16
4.1.2 Coleta da Vinhaça 17
4.1.3 Coleta do Biofertilizante 17
4.2. Métodos 17
4.2.1 Caracterização da vinhaça 17
4.2.2. Caracterização do Solo 18
4.2.3. Ensaio de Lixiviação de Íons 19
4.2.4. Caracterização do Biofertilizante 20
4.2.5. Ensaios Biológicos 20
4.2.5.1. Respirometria de Bartha e Pramer 20
4.2.5.2. Quantificação Microbiológica 22
4.2.5.3. Estimativa da Atividade Microbiana 23
4.2.5.4. Fitotoxicidade com Sementes *Lactuca sativa* 23
4.2.5.5 Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* 24
4.2.5.6. Ensaio de fitotoxicidade com *Phaseolus vulgaris L.* (feijão) 25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
5.1 Resultados da Caracterização da Vinhaça e do Biofertilizante 26
5.2 Resultados da Caracterização do Solo 29

5.3. Resultado do ensaio de lixiviação de íons 31
5.4. Resultados da avaliação da respirometria do solo 32
5.5. Resultados da Estimativa da Atividade Microbiana 35
5.6 Resultados do teste de fitotoxicidade com Sementes *Lactuca sativa*. 38
5.7 Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* 41
5.8. Resultado do ensaio de fitotoxicidade com feijão 44
5.9. Quantificação Microbiológica 45
6. CONCLUSÃO 48
7. REFERÊNCIAS 49

RESUMO

O aumento da população acompanhado da atividade industrial fizeram com que o problema da poluição do ambiente atingisse níveis alarmantes. Além da contaminação por detritos pouco biodegradáveis, como plásticos e detergentes, soma-se o problema dos resíduos industriais e, principalmente, dos resíduos agroindustriais, como a vinhaça, resultante da produção do etanol. Quando depositada no solo, a vinhaça pode promover melhoria em sua fertilidade; todavia, as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, isto é, as dosagens devem ser mensuradas de acordo com as características de cada solo, uma vez que este possui quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos, podendo ocorrer lixiviação dos mesmos. Diante dos impactos que o excesso de vinhaça utilizada nos processos de fertirrigação podem provocar no solo e corpos hídricos é crescente a preocupação com a destinação e tratamento deste efluente. Objetivando reduzir os impactos da vinhaça no solo quando descartada em excesso, este trabalho verificou a capacidade do biofertilizante Microgeo em estimular a biodegradação do efluente no solo. Os experimentos para avaliar a biodegradação foram realizados pelo método respirométrico de Bartha por períodos de 27 dias em solo denominado natura e por 90 dias em solo seco em estufa a 106ºC, com aplicação de 3 concentrações do biofertilizante (1, 5 e 10% p/v). Os solos coletados em área de cultivo de cana de açúcar foram caraterizados quanto a: análises físico químicas, granulométricas, microbiológica e de toxicidade. Após o processo de biodegradação avaliou-se a fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa,* de toxicidade aguda com *Daphnia similis,* quantificação de bactérias de fungos e determinação da atividade microbiana do solo através da hidrólise de Diacetato de Fluoresceína. Realizou-se ainda teste de lixiviação de íons e de fitotoxicidade com *Phaseolus vulgaris* no solo acrescido de vinhaça e biofertilizante. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que a adição do biofertilizante Microgeo nas concentrações de 5 e 10% favoreceram a atividade microbiana no solo e sua consequente biodegradação. A vinhaça inibe a germinação de *Lactuca sativa* e após a sua biodegradação ocorre diminuição da toxicidade e melhoria das condições microbiológicas do solo, mostrando ser o biofertilizante potencializador da biorremediação deste efluente, pois a sua composição, pode suprir a carência de nutrientes.

Palavras-chave: vinhaça, biofertilizantes, biorremediação.

ABSTRACT

The increase in population accompanied industrial activity caused the problem of environmental pollution reached alarming levels. In addition to contamination by poorly biodegradable waste such as plastics and detergents, adds industrial waste, and especially the agro-industrial residues such as stillage, resulting in the production of ethanol. When deposited in the soil, vinasse can promote improvement in fertility, yet the amounts should not exceed its capacity to retain ions, i.e., dosages should be measured in accordance with the characteristics of each soil since it has Unbalanced quantities of mineral and organic elements and may leaching thereof. Given the impact that excess vinasse used in fertigation processes can cause soil and water bodies is increasing concern about the disposal and treatment of wastewater. Aiming to reduce the impacts of vinasse when discarded in soil in excess, this study examined the ability of biofertilizer Microgeo to stimulate biodegradation of the effluent into the soil. The experiments to evaluate the biodegradation were performed by the respirometric method Bartha for periods of 27 days in soil called natura and for 90 days in soil dried at 106 º C, with application of three concentrations of biofertilizer (1, 5 and 10% w / v). Soils collected in area of cultivation of sugarcane were characterized as: physico chemical, textural, microbiological and toxicity. After the biodegradation process phytotoxicity was assessed with Lactuca sativa seeds, acute toxicity to Daphnia similis, quantification of bacteria and fungi determination of soil microbial activity by hydrolysis of fluorescein diacetate. We carried out further leachate test ions and phytotoxicity with Phaseolus vulgaris in soil and fertilizer plus stillage. According to the results obtained it was found that the addition of biofertilizer Microgeo at concentrations of 5 and 10% favored soil microbial activity and its subsequent biodegradation. The stillage inhibits the germination of Lactuca sativa and after biodegradation occurs reducing toxicity and improving the microbiological condition of the soil, showing that the biofertilizer this effluent bioremediation enhancer because its composition, can supply the lack of nutrients.

Keywords: vinasse, biofertilizers, bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio no Brasil vem crescendo devido ao aumento da capacidade produtiva, da produtividade e do investimento em tecnologia avançada. Nos últimos anos, poucos países tiveram crescimento no comércio internacional do agronegócio quanto o Brasil, sendo este um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários, tais como soja, café, sucos de frutas, açúcar e álcool.

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil para consolidar a colonização portuguesa e, ao mesmo tempo, garantir grandes lucros à metrópole, e tornou-se um dos produtos mais importantes do agronegócio brasileiro. Atualmente, o país é o maior produtor de álcool combustível, com previsão de produção de 23,62 bilhões de litros de etanol na safra 2012/13. Para produzir esta quantidade de etanol, são necessários uma área de 8,4 milhões de hectares cultivados de cana-de-açúcar (CONAB, 2012).

A industrialização do setor sucroalcooleiro impulsionada principalmente pelo lançamento do Programa Proálcool na década de 1980, assim como a necessidade mundial do uso de fontes renováveis de energia resultou no aumento da produção do etanol e conseqüentemente o aumento na geração de resíduos como bagaço, cinzas, vinhaça, e emissões gasosas (CORRÊA *et al*., 2001; VACCARI *et al*., 2005).

Devido a esse aumento acelerado da geração da vinhaça e diante dos problemas ambientais que esta pode ocasionar quando em excesso, é crescente a preocupação com a destinação e tratamento deste efluente. A biorremediação é um processo biológico de tratamento amplamente utilizado, onde os organismos do solo usam as substâncias xenobióticas como alimento para seu desenvolvimento (CUTRIGHT e LEE, 1994). Possui vantagens em relação aos tratamentos convencionais de resíduos e algumas necessidades para seu sucesso, como a concentração de nutrientes presentes para o crescimento microbiano.

A necessidade de nutrientes para a atividade microbiana do solo pode ser conseguida com utilização de biofertilizantes, produtos menos agressivos ao meio ambiente e de baixo custo. O Microgeo é um adubo orgânico líquido decorrente de fermentação aeróbia ou anaeróbia, possui em sua composição quase todos os nutrientes, variando em suas concentrações conforme a matéria-prima utilizada na

fermentação (NETO, 2006). Esta composição torna-o uma alternativa para o seu uso na biodegradação de xenobióticos no solo, além de atuar na fertilidade do mesmo.

Diante do exposto, é de suma importância avaliar se o biofertilizante Microgeo de uso agrícola pode suprir a carência de nutrientes e potencializar a biodegradação quando do excesso da vinhaça de cana-de-açúcar, além de melhorar a fertilidade do solo.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Determinar, no solo, a eficiência da biodegradação da matéria orgânica presente na vinhaça de fermentação etanólica de cana-de-açúcar com adição do biofertilizante Microgeo de uso agrícola.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a biodegradação da vinhaça de cana de açúcar em solo "natural" mediante o método respirométrico de Bartha.
- Avaliar a biodegradação da vinhaça de cana de açúcar em solo seco em estufa a 106ºC mediante o acréscimo de vinhaça e de biofertilizante pelo método respirométrico de Bartha.
- Avaliar a toxicidade da vinhaça mediante os organismos-teste *Daphnia similis* e a fitotoxidade com *Lactuca sativa* variedade Regina de Verão.
- Avaliar comparativamente a toxicidade do solo antes e após os processos de biodegradação, mediante os organismos-teste *Daphnia similis* e a fitotoxidade com *Lactuca sativa* variedade Regina de Verão.
- Avaliar a atividade microbiana do solo antes e após a adição do biofertilizante Microgeo, mediante o método enzimático de diacetato de fluoresceina (FDA).
- Avaliar a toxicidade da vinhaça mediante o organismo teste *D. similis* após ensaio de lixiviação de íons em solo sem histórico de aplicação do efluente.
- Avaliar a altura e peso seco médios da vinhaça e das concentrações realizadas no teste respirométrico de Bartha utilizando *Phaseolus vulgaris L*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Etanol no Brasil

A intensificação do uso do etanol no Brasil ocorreu em 1975 com a implementação do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), que tinha como objetivo principal a redução da dependência externa do petróleo (TAKESHITA, 2006). No entanto, por volta de 1986 o programa perdeu força, com progressiva desregulamentação do setor e regulação dos preços e da produção comandadas pelo mercado (MARJOTTA-MAISTRO, 2002).

Atualmente, as preocupações oriundas do efeito estufa e das mudanças climáticas, o reaquecimento do mercado interno pela introdução de carros bicombustíveis, a mistura obrigatória de álcool anidro a gasolina, a inserção do etanol como *commodity*, a liderança tecnológica da indústria alcooleira nacional, o aumento das exportações do etanol brasileiro e o crescente interesse global em reduzir as incertezas quanto ao preço do petróleo e em substituir oxigenantes altamente poluentes da gasolina têm colocado o etanol em destaque no cenário nacional e mundial e aumentado suas perspectivas de crescimento.

A produção de etanol coloca o Brasil na vanguarda mundial da agroenergia, pois é o principal país no mundo a implantar este biocombustível em larga escala como alternativa à utilização do petróleo. Sua utilização é reconhecida mundialmente pelas vantagens ambientais, sociais e econômicas que proporciona.

Atualmente, o país é o maior produtor de álcool combustível, com previsão de produção de 23,62 bilhões de litros de etanol na safra 2012/13, ocupando uma área agrícola de 8,4 milhões de hectares cultivados de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*). O Estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 52,6% do total nacional (4.436,53 mil hectares), seguido por Minas Gerais com 9% (759,21 mil hectares), Goiás com 7,97% (672,43 mil hectares), Paraná com 7,26% (612,25 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 5,7% (480,86 mil hectares), Alagoas com 5,39% (454,54 mil hectares), e Pernambuco com 3,85% (324,73 mil hectares). Nos demais

Estados produtores as áreas são menores, mas com bons índices de produtividade (CONAB, 2011).

Concomitantemente ao aumento da produção de etanol, é acrescida a geração de seus resíduos, como o bagaço, a torta de filtro e principalmente a vinhaça, caracterizada como o principal efluente das destilarias de álcool. Segundo Rezende (1983) *apud* Isepon (1990), a partir de uma tonelada de cana-de açúcar pode ser produzido, em média, 70 litros de álcool, considerando que todo o caldo extraído tenha sido destinado a essa produção, o que gera em torno de 910 litros de vinhaça.

Também chamada de vinhoto, calda, restilo, garapão, vinhote, caxixi, mosto, *still bottoms, slops, vinasse, dunder, stillage* ou *cachaza* (FREIRE 2000), a vinhaça constitui um dos grandes problemas da indústria alcooleira, em vista do volume do efluente produzido diariamente e, em conseqüência, dos problemas decorrentes da forma de descarte e do seu elevado potencial poluidor quando disposto em grandes quantidades no solo e nos corpos hídricos.

3.1.1. Caracterização da Vinhaça

Para a produção do álcool a cana-de-açúcar é lavada e moída nas moendas para a extração do caldo, que a seguir é submetido ao processo de clarificação, concentração e centrifugação, obtendo-se açúcar comercial e mel. O mel, após novo processo de cozimento a vácuo para obtenção do açúcar de segunda, transforma-se em mel final ou melaço. O melaço, após ser diluído, origina o mosto de melaço, que é enviado às dornas de fermentação para a formação do vinho. O vinho é então encaminhado para as colunas de destilação, resultando no álcool hidratado e na vinhaça (FREIRE, 2000).

Para cada litro de álcool são produzidos de oito a quinze litros de vinhaça (NAIK *et al*., 2008), que pode ser formada a partir de três origens distintas: (a) vinhaça de mosto de melaço; produzida do subproduto da produção de açúcar; (b) vinhaça de mosto de caldo; produzida através da fermentação alcoólica do caldo; (c) vinhaça de mosto misto gerada com a mistura de caldo e melaço. Em uma safra, ela pode ser apresentada nas três categorias.

Constituída principalmente de água e sais sólidos em suspensão ou solúveis, sendo que o teor de água está entre 94 a 96%, a vinhaça é um efluente com alto valor fertilizante, mas com alto poder poluente, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre da sua riqueza em matéria orgânica e mineral, com elevadas Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 65.000 mg/L e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 25.000 mg/L, de onde vem seu grande potencial poluidor. Ao lado da poluição por substâncias orgânicas, outros aspectos físicos da vinhaça são seu baixo pH (4,0 a 4,8) e a elevada temperatura em que é gerada, que resultam em seu caráter de poluente químico (expresso por elevado efeito corrosivo) e na poluição de natureza física (na forma de calor). Comparada aos outros resíduos orgânicos produzidos pela indústria sucroalcoleira, a vinhaça é a que mais contêm nutrientes em sua composição, predominando o potássio seguido de cálcio, magnésio, fósforo, manganês e nitrogênio orgânico (WADT, 2008).

Potentini e Malaver (2006) verificaram nas características da vinhaça pH de 4,4 e DQO de 40.000 mg/L. Por suas características nutritivas, a vinhaça vem sendo utilizada na fertirrigação. Para isso foram desenvolvidos tecnologias e sistemas para sua distribuição nas plantações de forma a otimizar a aplicação. Assim, tem-se hoje grande diversidade de veículos-tanque para o transporte e distribuição do resíduo nas plantações, além de sistemas de canais e tubulações, de gotejamento, veículo distribuidor de vinhaça e sistemas de aspersão (COPERSUCAR, 1979; VALSECHI, 2007). No entanto, a maioria desses sistemas é técnica e economicamente viável somente se a distância entre a destilaria e a lavoura onde é feita a aplicação não for muito extensa, do contrário pode-se gerar altos custos de transporte e inviabilizar o aproveitamento do efluente. Uma alternativa que se coloca para esses casos é a concentração da vinhaça por evaporação, o que diminui consideravelmente seu volume e aumenta o seu poder fertilizante, tornando menor o seu o custo com transporte.

3.1.2. Efeitos da Vinhaça no Meio Ambiente

Devido a sua riqueza em matéria orgânica, a aplicação da vinhaça em fertirrigação vem dando bons resultados ao longo dos anos (FREIRE e CORTEZ, 2000),

pois pode promover melhoria na fertilidade do solo, visto que favorece o aumento da disponibilidade de alguns elementos para as plantas.

No entanto, a quantidade de vinhaça fertirrigada não deve ultrapassar a capacidade de retenção de íons do solo, ou seja, as dosagens dependem das características do mesmo. Quando usadas em proporções desbalanceadas ocasionam efeitos maléficos aos solos e às plantas.

O efeito do aumento de sais sobre a estrutura do solo ocorre, basicamente, pela interação eletroquímica existente entre os cátions presente na solução e a fração argila. A característica principal deste efeito é a expansão da argila quando úmida e a contração quando seca, devido principalmente ao excesso de sódio trocável. Se esta expansão for exagerada, poderá ocorrer a fragmentação das partículas, causando a dispersão da argila, modificando a estrutura do solo. De modo geral, estes solos apresentam problemas de permeabilidade e qualquer excesso de água causará encharcamento na superfície, prejudicando o crescimento da cultura por falta de aeração e aumentando os riscos de erosão pelo escoamento superficial (UYEDA, 2009).

A vinhaça também pode causar poluição às águas subterrâneas. Ludovice (1997) afirma em seu estudo que os solos sob os canais de escoamento de vinhaça não impermeabilizados são excessivamente suscetíveis a contaminação por percolação na ordem de 91,4%, colocando em risco a potabilidade dos lençóis freáticos.

Na Tabela 1 estão expostos alguns efeitos da vinhaça no solo.

Tabela 1. Alguns efeitos da vinhaça no solo

Efeitos Positivos	Efeitos Negativos
Melhoria da fertilidade do solo	Contaminação do lençol freático
Aumento do pH	Contaminação hídrica
Aumento da CTC	Atraso na maturação da cana-de-açúcar
Aumentos da retenção de água	Aumento de sais no solubilizado do solo
Melhoria da estrutura física do solo	
Aumento da população microbiana	

CTC: capacidade de troca catiônica.

Desta forma, normas ambientais, especialmente no estado de São Paulo, têm colocado pressão nos produtores tradicionais de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar, alertando para a necessidade de criação de tratamentos do efluente gerado (vinhaça) antes do seu descarte, alem de e novos usos para o mesmo.

3.1.3. Vinhaça e Legislação Ambiental

Há uma gama enorme de resíduos orgânicos da indústria e da agricultura que podem ser usados na agricultura, como a vinhaça. A opção da disposição de resíduos orgânicos em solos agrícolas é econômica, social e ambientalmente mais sustentável, a médio e longo prazo, do que a incineração e a disposição em aterros sanitários e corpos hídricos. Deve-se respeitar as disposições legais para que seja descartada a possibilidade desses materiais contaminarem o meio ambiente.

A partir de 1978 surgiu a primeira legislação referente à destinação da vinhaça, a Portaria Minter nº 323, de 29 de novembro de 1978, que expressa: "*Proíbe, a partir da safra 1979/1980, o lançamento, direto ou indireto, da vinhaça em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias de álcool instaladas ou que venham a instalar no País*" (MMA, 1999).

Em 1984, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), com a Resolução n°0002, de 05 de junho definiu a obrigatoriedade da realização de estudos e apresentação de projeto de resolução contendo normas para controle da poluição causada pelos efluentes das destilarias de álcool e pelas águas de lavagem da cana (CONAMA, 1984).

Atualmente, em relação à disposição da vinhaça no solo para fins agrícolas, a legislação vigente é a norma da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) P4.231 "*Vinhaça - Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola*" de dezembro de 2006, que considera a necessidade de organizar o armazenamento, o transporte e a aplicação no solo da vinhaça gerada no processamento da cana-de-açúcar, passando a considerar um conjunto amplo de diretrizes que devem ser respeitadas à aplicação da vinhaça. Exige que estudos de caracterização do solo e da vinhaça sejam realizados para que se definam as taxas de

aplicação a serem utilizadas, não ocorrendo dessa maneira, saturação do solo e conseqüentemente evitando a possível poluição deste e dos mananciais (CETESB, 2006).

3.2. Biofertilizante

O biofertilizante é um adubo orgânico líquido, decorrente de fermentação aeróbia ou anaeróbia, ou seja, da atividade de micro-organismos na decomposição e complexação de uma mistura de materiais orgânicos (esterco por exemplo), minerais e água. Possui em sua composição quase todos os nutrientes, variando em suas concentrações conforme a matéria-prima utilizada na fermentação (NETO, 2006).

Possui compostos bioativos (constituintes extranutricionais que normalmente ocorrem em pequenas quantidades em plantas), resultantes da biodigestão de compostos orgânicos de origem animal e vegetal. Em seu conteúdo são encontradas células vivas ou latentes de micro-organismos de metabolismo aeróbio, anaeróbio (bactérias, leveduras, algas e fungos filamentosos) e também metabólitos e quelatos organominerais em soluto aquoso. Segundo Santos e Akiba (1996), os metabólitos são compostos de proteínas, enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos, inclusive de ação fitohormonal produzidos e liberados pelos micro-organismos.

Os adubos orgânicos ou biofertilizantes são fontes de macro e micronutrientes e além de sua composição mineral, aumentam o teor de matéria orgânica, ativando a microbiota do solo, melhorando a sua estruturação, aeração, infiltração e retenção de água (MACHADO e MACHADO, 2009). Podem ser produzidos pelo método de compostagem líquida contínua, no processo são utilizados água não clorada e o inoculante a base de esterco fresco bovino, e posteriormente enriquecido com um composto orgânico nutritivo.

O Microgeo é um composto orgânico, com registro no Ministério da Agricultura e certificado pelo IBD (empresa certificadora agropecuária e alimentícia), preparado à base de diversas fontes orgânicas e inorgânicas, sendo enriquecido com rochas moídas que contêm cerca de 48% de silicatos de magnésio, cálcio, ferro e outros oligoelementos, fundamentais para estimulação do metabolismo primário e secundário

das plantas, sendo a dose recomendada para culturas como cana-de-açúcar, café, chá, pastagem e demais culturas perenes de 300 litros / ha (D'ANDREA, 2010).

Os biofertilizantes são uma alternativa para uso em estações de tratamento biológico de efluentes, visto que, como exposto por Hammer e Hammer (2004), os efluentes tratados biologicamente devem conter suficientes concentrações de carbono, nitrogênio, fósforo e traços de nutrientes para garantir adequado crescimento da cultura microbiana. Além do efeito nutricional conhecido, os biofertilizantes apresentam efeitos de ação fungistática e bacteriostática sobre fitopatógenos, aumentando a resistência das plantas ao ataque de pragas e doenças (BETTIOL,1998).

O uso do biofertilizante foi verificado no início da década de 80 por extensionistas da EMATER-RIO, em lavouras de café e cana-de-açúcar, regado nas covas para realizar a complementação nutricional e auxiliar na irrigação, uma vez que era altamente diluído. No ano de 1985, foram iniciadas as unidades de observação em seringueira, café e maracujá. Os resultados alcançados com as pulverizações de biofertilizante líquido a 20%, em diluição com água, mostraram a redução de ataques de fitopatógenos e de pragas, devido ao equilíbrio do ecossistema das lavouras pulverizadas, além do aumento da produtividade (SANTOS, 1991).

Atualmente, vários biofertilizantes são utilizados regionalmente, preparados com resíduos animais, vegetais e agroindustriais. O emprego de biofertilizantes tem aumentado muito, devido ao seu baixo custo, à sua variada composição e especialmente à sua boa concentração de nutrientes.

3.3. Biorremediação

Micro-organismos são onipresentes, sendo amplamente distribuídos em um conjunto diversificado de habitats, desde marinhos até ambientes terrestres. Alguns destes habitats incluem aqueles que têm sido fortemente contaminados por metais pesados, bem como poluentes químicos e orgânicos provenientes de atividades humanas. A presença de micro-organismos em ambientes poluídos significa que eles possuem o metabolismo necessário para sobreviver em tais condições ambientais. Os micro-organismos podem utilizar os contaminantes como fonte de carbono e/ou como

aceptores terminais de elétrons para conservação de energia e assim ocorrendo sua eventual mineralização (VIDALI, 2001; SINGER *et al*., 2001).

A atividade de alguns micro-organismos e espécies de plantas são úteis na recuperação dos ambientes poluídos e são a base do conceito de biorremediação.

Considerando os dois processos, isto é, usando micro-organismos e plantas, a biorremediação pode ser definida como o processo pelo qual os organismos vivos (bactérias, fungos, minhocas e plantas) degradam ou transformam e desintoxicam perigosos contaminantes orgânicos e inorgânicos ou resíduos em condições naturais em compostos inócuos como o dióxido de carbono e água ou em formas menos tóxicas (PAUL *et al*, 2005; VIDALI, 2001; USEPA, 2005) . Essas transformações dos poluentes ambientais ocorrem pelas reações que fazem parte de seus processos metabólicos. Portanto, os organismos vivos com potencial para biorremediação possuem enzimas e vias que lhes permitam desintoxicar e/ou mineralizar os poluentes.

Nos solos, as bactérias e fungos são os principais degradantes de compostos orgânicos. As bactérias apresentam uma série de características que contribuem para seu uso nos processos de biorremediação, como rápido crescimento e metabolismo, plasticidade genética e habilidade de ajuste relativamente rápido às variações das condições ambientais (BAKER e HERSON, 1994), sendo eficientes na degradação de contaminantes orgânicos presentes nos solos (MELLO, 2005).

Estando os micro-organismos adequados em contato com o meio contaminado, torna-se necessário controlar e monitorar as condições ambientais de forma a otimizar o crescimento e a atividade metabólica dos mesmos (BAKER e HERSON, 1994).

O sucesso total nos tratamentos de biorremediação depende de inúmeros fatores, tais como: característica do resíduo, a seleção correta da tecnologia de biorremediação, o uso de métodos analíticos apropriados para determinar o tipo e a extensão da contaminação e a presença de condições microbiológicas ótimas, como os nutrientes essenciais para o desenvolvimento microbiano (HUESEMANN, 1994).

Desta forma, para o crescimento da população microbiana, muitas vezes torna-se necessária a adição dos nutrientes no solo. Os nutrientes utilizados na biorremediação podem ser agrupados em três categorias: inorgânicos solúveis em água, formulações oleofílicas e aqueles chamados de *slow release*, com a solubilização

lenta dos componentes. Os produtos solúveis são representados por uma grande variedade de fertilizantes agrícolas, com diferentes proporções de compostos contendo nitrogênio, fósforo e potássio. As vantagens de utilização desses produtos são a disponibilidade no mercado e o baixo custo (PRINCE, 1993; ATLAS, 1998). Desta forma pode-se estimular a biodegradação utilizando-se coadjuvantes como biofertilizantes para otimizar o processo de biodegradação.

A respirometria é uma das técnicas que pode ser utilizada para o acompanhamento das atividades realizadas pelos micro-organismos no solo, e baseia-se na análise do consumo de oxigênio ou na produção de dióxido de carbono por unidade de volume e de tempo.

O ensaio respirométrico tem como principal objetivo estimar o tempo para a estabilização de um resíduo orgânico inserido no solo, além de obter as taxas de aplicação mais convenientes, e poder detectar possível toxicidade aos micro-organismos do solo devido à presença de determinados elementos no resíduo.

O respirômetro de Bartha, segundo a ABNT-NBR 14.283 (1999), pode ser utilizado tanto para avaliar a tratabilidade de resíduos, quanto para inferir as condições de manejo de sistemas de tratamento de resíduos em solo. Tal metodologia já foi utilizada por diversos autores tais como NUVOLARI (1996); COURACCI FILHO *et al.* (1997); ALBUQUERQUE (2000); GUERRA E ANGELIS (2005); MELLO (2005); MARIANO (2006); MONTAGNOLLI *et al.* (2009), entre outros para avaliar a biodegradação de resíduos no solo.

Na Tabela 2 estão citados os trabalhos desses autores.

Tabela 2. Lista de trabalhos realizados utilizando respirômetros de Bartha e Pramer

Referência	Material Contaminado	Resíduo	Período de incubação
Nuvolari (1996)	Solo argilo-arenoso	Lodo de ETE	176 e 172 dias
Guerra e Angelis (2005)	Solo utilizado para cobertura de células de aterro	Lodo de decantadores de ETA que utilizam cloreto férrico para coagulação	118 dias
Albuquerque (2000)	Areia de moldagem	Compostos fenólicos	90 dias
Couracci Filho et al. (1997)	Solo franco-arenoso	Lodo digerido de industria cítrica	38 dias
Mello (2005)	Latossolo vermelho-escuro de textura argilosa	Fenantreno	25, 40 e 45 dias
Mariano (2006)	Solos coletados em postos de combustíveis	Óleo diesel	57, 92, 48 e 47 dias
Montagnolli (2009)	Solo arenoso	Óleos automotivos e óleos vegetais	130 dias

3.4 Biodegradação e Toxicidade

Os ensaios de toxicidade são ferramentas importantes para avaliar um processo de biodegradacao, pois pode-se verificar se o composto organico degradado teve sua toxicidade inalterada, reduzida ou aumentada (MOREIRA *et al*., 2006).

O conhecimento do grau de toxicidade de substâncias químicas permite estabelecer limites seguros para o ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Uma maneira simples e rápida de avaliar se um xenobiótico diminuiu seu potencial tóxico é mediante estudos toxicológicos utilizando sementes, no processo de germinação. Nesse processo, a água representa um dos fatores do ambiente que mais exerce influência. Com a absorção de água, por embebição, ocorre a reidratação dos tecidos e, consequentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do embrião (NASSIF *et al.,* 1998).

Os problemas de toxicidade em uma planta surgem quando certos constituintes (íons tóxicos) do solo ou da água são absorvidos e acumulados em seus tecidos em concentrações suficientemente altas para provocar danos e retardar seu desenvolvimento (AYERS e WESTCOT, 1991).

A germinação depende de uma sequência de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores) (NASSIF *et al*., 1998).

O teste com sementes é utilizado para complementar a avaliação físico-química das águas residuárias e dos resíduos que serão dispostos em solo (CETESB, 2011).

Uma substância referência de elevado grau de pureza (≥ 99%), orgânico ou inorgânico, com relação dose resposta bem caracterizada é utilizada como controle positivo de qualidade analítica.

A literatura menciona muitos compostos que podem ser usadas como substancia tóxica de referência, a USEPA (1996) cita o uso de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cádmio ($CdCl_{I2}$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), dodecil sulfato de sódio (SDS) e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Outras agências ambientais como a do

Canadá, recomendam o Zinco (II), e o fenol como, substâncias referência orgânicas e inorgânicas, entretanto, estes compostos podem ser substituídos por outros, dependendo da espécie testada, da matriz utilizada e dos parâmetros medidos (MORALES, 2004).

A espécie *Lactuca sativa* possui germinação fácil e rápida, tornando-se possível desenvolver o teste em alguns dias. Este bioensaio de toxicidade tem sido recomendado e aplicado por diferentes agências de proteção ambiental para a avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais e compostos puros, bem como avaliar o efeito fitotóxico de pesticidas em espécies não alvo (OCDE, 1984; USEPA, 1989; BOUTIN *et al*., 1993). Este teste pode ser aplicado para avaliar a toxicidade de compostos solúveis, de águas superficiais (lagos e rios), águas subterrâneas, água tratada, águas residuais domésticas e industriais, bem como a lixiviação dos solos, sedimentos, lodo ou outras matrizes sólidas (BOWERS *et al*, 1997, CHEUNG *et al*, 1989).

Na ecotoxicidade o principal instrumento é o bioensaio, o qual pode ser conduzido de diversas formas, podendo ser avaliados diferentes processos e efeitos de contaminação a fim de buscar as respostas mais rápidas, precisas e de fácil interpretação.

Dentre os testes mais frequentemente utilizados em laboratório, os bioensaios agudos ocupam posição de destaque devido a sua maior simplicidade e ao curto período de exposição dos organismos ao agente tóxico.

Testes com o cladócero *Daphnia similis* foram os primeiros a serem estabelecidos e exigidos no Brasil (década de 80), sendo esse grupo recomendado para representar os invertebrados aquáticos em estudos ecotoxicológicos (IBAMA, 1990). Ele está entre os organismos mais utilizados em bioensaios do mundo, devido sua facilidade de cultivo em laboratório, sensibilidade aos agentes tóxicos (em função de sua reprodução partenogenética, que propicia homogeneidade de seu material genético), curto ciclo de vida e outras características intrínsecas do grupo (USEPA, 2002).

Os testes de toxicidade aguda medem os efeitos dos agentes tóxicos sobre as espécies durante uma curta fase da vida, em um período de 24 a 96 horas de

exposição, fornecendo, no caso da *D. simlis*, ao final a concentração causadora da imobilização de 50% dos organismos (CE_{50}).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das Amostras de Solo, Vinhaça e Biofertilizante

4.1.1 Coleta de Solo

De acordo com os procedimentos propostos na Norma ABNT-NBR 14.283 (1999), as amostras de solo dos dois experimentos de respirometria foram coletadas em área de cultivo de cana de açúcar, na região de Piracicaba, SP, latitude 22º34'50" sul e longitude 47º31'07" oeste.

Definiu-se uma área de amostragem de 10 hectares. As amostras foram retiradas da camada superficial do solo, até a profundidade de 20 cm, sendo percorrida em ziguezague, retirando-se, com um trado, em 15 pontos diferentes e colocadas juntas em balde. As amostras foram misturadas dentro do balde, retirando-se uma amostra final de aproximadamente 200 g.

A amostra composta de solo foi transferida para o laboratório e espalhada em superfície plana e exposta a temperatura ambiente para secar, sem ocorrer secagem completa. Após a desagregação de eventuais torrões, o solo foi peneirado em peneira com malha de 2,0 mm e o material retido foi descartado, obtendo, ao final do processo, a fração de terra fina seca ao ar (TFSA).

A amostra foi acondicionada em embalagem de polietileno e armazenada a 4ºC, com o cuidado de permitir um volume significativo de ar no interior da embalagem para manter as células dos micro-organismos, presentes no solo, viáveis até o início dos testes respirométricos.

Para avaliar atividade microbiana pelo método respirométrico mediante a geração CO_2, é importante que o solo apresente umidade adequada. De acordo com ABNT-NBR 14.283 (1999), essa umidade deve estar no intervalo de 50 a 70% da Capacidade de Campo, sendo, Capacidade de Campo, a máxima umidade do solo sem

percolação da água. Assim, no presente estudo, buscou-se atingir 60% da Capacidade de Campo do solo coletado.

As amostras de solo utilizadas para o ensaio de lixiviação de íons do efluente foram coletadas no campus da FT-UNICAMP e imediatamente transferidas para os tubos de PVC utilizados no ensaio.

4.1.2 Coleta da Vinhaça

A vinhaça foi coletada ainda quente em recipiente de polietileno de 25 L em indústria sucroalcooleira na região de Piracicaba –SP de acordo com Norma P4.23 da CETESB (2006). Foram realizadas três coletas, uma para cada experimento de respirometria e outra para o teste de lixiviação e de fitotoxicidade com *Phaseolus vulgaris L.*

Os experimentos foram realizados no dia seguinte à coleta e a vinhaça armazenada à 4ºC.

4.1.3 Coleta do Biofertilizante

O biofertilizante Microgeo foi obtido da empresa Microbiol Biotecnologia localizada no município de Limeira – SP. A coleta foi realizada no mesmo dia em que os experimentos foram montados.

4.2. Métodos

4.2.1 Caracterização da vinhaça

A vinhaça foi caracterizada quanto ao pH; condutividade elétrica; densidade, resíduo seco, matéria orgânica total, carbono total, resíduo mineral total, resíduo mineral insolúveis, resíduo mineral solúvel, nitrogênio total, fósforo total, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre total, manganês total, zinco total, ferro total, relação C/N (carbono total e nitrogênio total), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e

Demanda Química de Oxigênio (DQO), seguindo recomendação da Norma P4.231 da CETESB (2006).

Os experimentos descritos abaixo foram realizados nos laboratórios do curso de Tecnologia Ambiental da Faculdade de Tecnologia/ Unicamp- Campus I de Limeira de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998):

Demanda Química de Oxigênio (DQO): A análise foi realizada em equipamento DR-2000 da HACH COMPANY conjuntamente com o digestor, modelo AC750, utilizando-se do sistema de digestão em refluxo fechado. Este método mede a quantidade de matéria orgânica na solução.

Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO): foi determinada através da medida do oxigênio dissolvido utilizado por micro-organismos na oxidação bioquímica da matéria. Foram realizadas diluições sucessivas para assegurar a quantidade de nutrientes e oxigênio necessários à digestão biológica. O período de incubação foi de cinco dias a 20°C.

Medição de pH: medida efetuada através de medidor de pH HANNA HI-221.

Medição de condutividade: determinada através de condutivímetro QUIMIS Q405M.

As demais análises foram realizadas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, no Laboratório de Solos.

4.2.2. Caracterização do Solo

As amostras de solo coletadas em campo foram enviadas ao laboratório do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O solo foi caracterizado quanto ao seu teor de matéria orgânica, pH, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, acidez potencial, soma de bases, capacidade de troca catiônica, saturação por bases, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, de acordo com IAC (2001).

A matéria orgânica total foi determinada pela perda por ignição à 430ºC durante 24h (NAVARRO *et al*., 1993) e a umidade pelo método da estufa, onde permaneceu à 105ºC por 24 h, conforme estabelecido pelo Ministério da Agricultura.

Para a realização dos testes de toxicidade foi utilizada a fração solúvel em água, segundo CETESB (1990). Foram preparadas quantidades adequadas das misturas solo-resíduo e deixadas em repouso durante 22 ± 2 horas a temperatura ambiente. Para cada taxa de aplicação foram pesados 25 ± 0,1g da mistura, em frascos de 250 mL e adicionados 100 mL de água destilada, em triplicata.

Os frascos foram mantidos sob agitação por 22 ± 2 horas, de forma a não haver separação das fases e após o período deixados em repouso por 30 minutos. Após esse período o sobrenadante foi pipetado para tubos da centrífuga, e centrifugado durante 10 minutos a 2500 rpm, a temperatura de 22 ± 2ºC para a realização do teste de toxicidade aguda de acordo com CETESB (1994).

A capacidade de retenção hídrica do solo foi determinada segundo metodologia adaptada a partir das Regras para análise de sementes, do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1999). Foram adicionados 250 g de solo previamente seco ao ar em filtro de papel do tipo comercial e 300 mL de água destilada. Após 30 minutos, mediu-se com proveta o volume de água drenada.

4.2.3. Ensaio de Lixiviação de Íons

Realizou-se o ensaio de lixiviação de íons com solo coletado no campus da FT-UNICAMP, a fim de avaliar a capacidade de percolação da vinhaça.

O experimento foi montado utilizando-se colunas de PVC com 60, 40 e 20 cm de altura e 11 cm de diâmetro. Cada coluna foi preenchida com amostras do solo coletadas em três profundidades (0 – 60, 0 – 40 e 0 – 20 cm) de modo semelhante a sequência de camadas, tais quais ocorrem no campo (Figura 1). Foi realizado no lixiviado a toxicidade utilizando o cladócero *D. similis*.

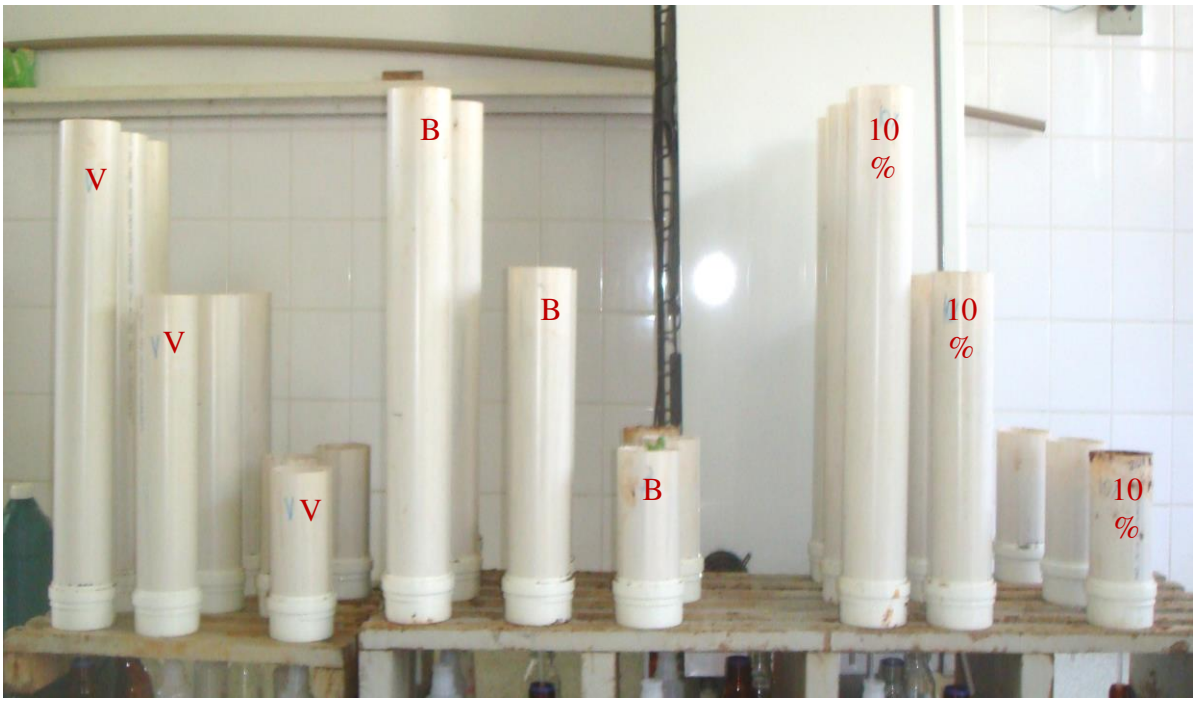

Figura 1. Ensaio de lixiviação de íons em colunas de PVC de 60, 40 e 20 cm.
Legenda: V: vinhaça; B: biofertilizante; 10%: vinhaça + 10% de biofertilizante.

4.2.4. Caracterização do Biofertilizante

As análises físico químicas utilizadas para caracterizar as amostras de biofertilizante foram as mesmas utilizadas para a caracterização da vinhaça (DQO, DBO, pH, condutividade), seguindo metodologia *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), além da caracterização de macro e micronutrientes fornecidas pela empresa Microgeo Biotecnologia.

4.2.5. Ensaios Biológicos

4.2.5.1. Respirometria de Bartha e Pramer

A avaliação da biodegradabilidade da vinhaça mediante ensaios respirométricos, seguiu metodologia sugerida na ABNT-NBR 14.283 (1999).

Para a quantificação do CO_2 no sistema, sob condições controladas, foram utilizados equipamentos denominados respirômetros, estes consistem em um sistema fechado, composto de duas câmaras interligadas, sendo uma câmara de respiração, e outra para a medição do consumo de O_2 ou produção de CO_2. Na câmara de respiração são colocados em contato o substrato a ser degradado, o coadjuvante e o oxigênio disponível, que será consumido (FERREIRA, 2002).

A medida da liberação de CO_2 por meio da sua captura é realizada por substância alcalina (normalmente hidróxido de potássio - KOH ou hidróxido de sódio - NaOH) e posterior precipitação na forma de carbonato de bário ($BaCO_3$), pela adição de solução saturada de cloreto de bário ($BaCl_2$). A soda excedente é, então, titulada com ácido clorídrico (HCl), permitindo o cálculo da produção de gás carbônico (MARIANI, 2005).

De acordo com a concentração de aplicação de vinhaça no solo utilizada pela indústria sucroalcooleira do qual coletou-se a amostra de vinhaça (300 m^3/ha), e considerando a densidade do solo igual a 1,0, a aplicação de vinhaça foi de 4 mL para todos os respirômetros que a continha.

O biofertilizante foi aplicado de acordo com suas concentrações, sendo 0,6 mL na concentração 1% (C1%) e no controle biofertilizante 1% (CB1%), 3,0 mL na concentração 5% e no controle biofertilizante 5% (CB5%) e 6,0 mL na concentração 10% e em seu respectivo controle biofertilizante 10% (CB10%).

A umidade foi ajustada com água destilada para que ficasse equivalente em todos os respirômetros. Os respirômetros foram armazenados em câmara incubadora BOD com temperatura controlada de 26 ± 2ºC durante 27 dias, período em que a quantidade de CO_2 produzida foi verificada.

Realizou-se dois experimentos de respirometria de Bartha, denominados 1 e 2, utilizando-se solo em seu estado natural no experimento 1 e solo seco em estufa a 106ºC no laboratório de microbiologia da FT-UNICAMP. As amostras e controles foram preparados em triplicata conforme a Figura 2.

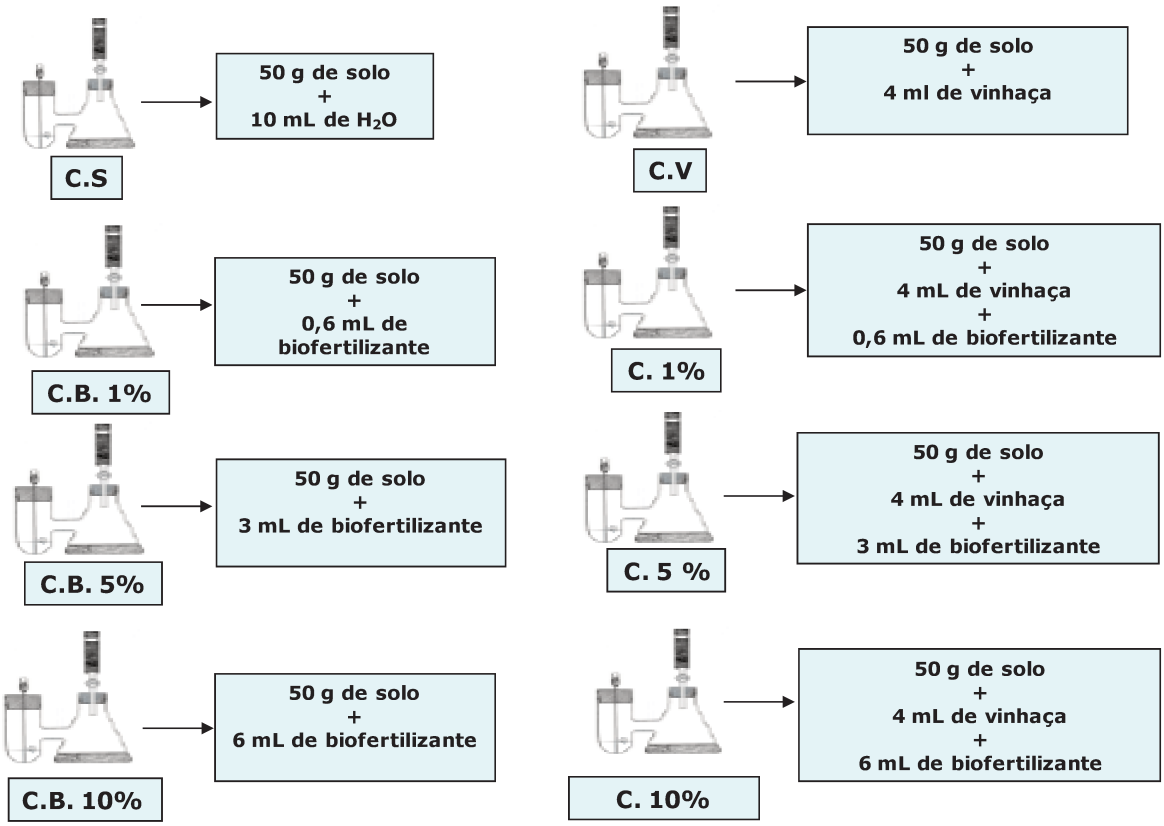

Figura 2. Tratamentos realizados no ensaio de biodegradação da vinhaça no solo acrescido de biofertilizante Microgeo pelo método respirométrico de Bartha nos experimentos 1 e 2.

Legenda:
CS: solo controle
CV: solo + vinhaça
CB 1%: solo + biofertilizante 1%
CB 5%: solo + biofertilizante 5%
CB 10%: solo + biofertilizante 10%
C1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça
C5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça
C10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça

4.2.5.2. Quantificação Microbiológica

A quantificação da microbiota do solo foi realizada avaliando-se as Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC/g), utilizando-se a técnica do plaqueamento *Pour Plate* em meio *Plate Counter Agar* (PCA) para bactérias heterotróficas e meio *Sabouraud* para fungos, conforme apresentada no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

4.2.5.3. Estimativa da Atividade Microbiana

A atividade microbiana total do solo foi avaliada pelo método da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) descrito por Boehm e Hoitinik (1992).

Para a hidrólise de FDA foram adicionadas 5 g de cada amostra de solo, em duplicata, em Erlenmeyer de 250 mL, 20 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (8,7g de K_2HPO_4, 1,3 g DE KH_2PO_4; 1000 mL de água destilada; pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA foi iniciada com a adição de 0,2 mL da solução estoque de FDA (2 mg/mL de acetona). As amostras foram agitadas a 150 rpm e incubadas a temperatura ambiente, durante 20 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 20 mL de acetona P.A. por recipiente, que permaneceram tampados até a centrifugação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos. Posteriormente, em espectrofotômetro, foi determinada a absorbância dos centrifugados a 490 ηm.

4.2.5.4. Fitotoxicidade com Sementes *Lactuca sativa*

As sementes de *Lactuca sativa* (alface), variedade Regina de Verão, utilizadas no experimento foram adquiridas comercialmente das indústria Isla Sementes LTDA, RS. A variedade utilizada foi a Regina de Verão sem agrotóxicos.

No experimento 1 os ensaios foram realizados no término da respirometria. No experimento 2 foram realizados testes antes e após a respirometria. Antes da respirometria foram analisadas a Germinação Relativa das semente das seguintes amostras: Solo Cana (SC), Solo + Vinhaça + Biofertilizante (SVB), Solo + Vinhaça (SV) e Vinhaça nas concentrações 1, 5, 7 e 10%.

Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa*, avaliando a germinação e o elongamento da raiz, segundo metodologia adaptada de Dutka (1989).

Os experimentos foram realizados em placas de Petri com papel de filtro, constituídos de controle positivo utilizando-se dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) como substância tóxica de referência, e controle negativo utilizando-se água destilada. Realizou-se o teste de fitotoxicidade com a fração solúvel dos solos contidos nos respirômetros e do solo coletado em área de cultivo de cana de açúcar.

Foram realizadas três réplicas adicionando nas placas 4,0 mL da fração solúvel dos diversos tratamentos, com posterior aplicação de 20 sementes dispostas suavemente na superfície do filtro. As placas foram então colocadas no escuro a 22ºC por 120 horas.

Ao final de cada ensaio, se uma raiz foi visível, a semente foi classificada como germinada, medindo-se o comprimento da mesma.

Os resultados foram avaliados de acordo com Tam e Tiquia (1994), sendo determinados germinação relativa de sementes, elongamento relativo de raiz e índice de germinação, de acordo com as fórmulas (1), (2) e (3):

$$\text{Germinação relativa de sementes (\%)} = \frac{\text{Número de sementes germinadas na amostra} \times 100}{\text{Número de sementes germinadas no controle}} \quad (1)$$

$$\text{Elongamento relativo de raíz (\%)} = \frac{\text{Média do elongamento da raiz na amostra} \times 100}{\text{Média do elongamento da raiz no controle}} \quad (2)$$

$$\text{Índice de germinação (\%)} = \frac{(\text{\% germinação de semente}) \times (\text{\% elongamento de raíz})}{100\%} \quad (3)$$

4.2.5.5 Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

Os organismos *Daphnia similis* utilizados para os testes são cultivados no Laboratório *de* Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Profº Dr. Abílio Lopes – LEAL da FT-UNICAMP.

Os ensaios para avaliar a toxicidade aguda da fração solúvel do solo e dos resíduos foram realizados no início e no término dos experimentos de respirometria, de acordo com a norma técnica ABNT-NBR 12713 (2004). Realizou-se ainda a toxicidade aguda para *D. similis* após o ensaio de lixiviação de íons. Foram utilizadas neonatas de *D. similis* com idade entre 6 e 24 horas, avaliando a imobilidade, determinando a concentração efetiva (CE_{50}) dos tratamentos.

Os testes foram realizados em tubos falcon com capacidade de 13 mL. Os tratamentos foram constituídos de vinhaça, biofertilizante, fração solúvel do solo coletado e dos solos dos respirômetros após a biodegradação e controle realizado com água de cultivo. Foram realizadas quatro réplicas, cada recipiente com 10 mL da amostra e 5 neonatas de *Daphnia similis*. Os recipientes foram incubados no escuro a 20ºC por 48 h. Ao final de cada ensaio, foi contado o número de neonatas imóveis por recipiente.

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico JSPEAR, método *Trimmed Spearman-Karber* (HAMILTON *et al*., 1977).

4.2.5.6. Ensaio de fitotoxicidade com *Phaseolus vulgaris L.* (feijão)

O estudo foi desenvolvido em laboratório utilizando vasos de polietileno com capacidade de 3 kg. O solo utilizado foi o mesmo dos ensaios respirométricos e a variedade de feijão foi o Carioca, obtido do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e quatro sementes por vaso. Os tratamentos foram semelhantes aos testes respirométricos.

As variáveis analisadas foram altura e peso seco médios.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados da Caracterização da Vinhaça e do Biofertilizante

A Tabela 3 expressa os resultados obtidos na análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), pH e condutividade da vinhaça e do biofertilizante coletados para os experimentos 1 e 2.

Tabela 3. Caracterização físico-química da vinhaça e do biofertilizante utilizados no experimento 1.

Parâmetros	Vinhaça	Biofertilizante
DQO (mg/L)	**13.720**	**1.978**
DBO (mg/L)	**9.140**	**142**
pH	**4,73**	**5,7**
Condutividade (ms)	**4,67**	**111,2**
OD (mg/L)	**2,67**	**3,02**

Legenda: DQO: demanda química de oxigênio; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; pH: potencial hidrogeniônico, OD: oxigênio dissolvido.

Tabela 4. Caracterização físico-química da vinhaça e do biofertilizante utilizados no experimento 2.

Parâmetros	Vinhaça	Biofertilizante
DQO (mg/L)	**36.425**	**160**
DBO (mg/L)	**4.656**	**16**
pH	**4,5**	**6,63**
Condutividade (ms)	**10,9**	**111**
OD (mg/L)	**3,5**	**4,2**

Legenda: DQO: demanda química de oxigênio; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; pH: potencial hidrogeniônico, OD: oxigênio dissolvido.

De acordo com a Tabela 3 e 4 a vinhaça apresenta alta concentração de matéria orgânica resultando em elevada DQO e DBO. Devido a esta elevada concentração de matéria orgânica, a descarga da vinhaça nos cursos d'água ameaça a fauna e a flora devido à diminuição da concentração do oxigênio dissolvido na água, sendo assim proibido seu lançamento em corpos d'água.

Os valores de DBO e DQO encontrados na literatura são muito distintos, podendo a DBO variar de 5 a 35 g/L e a DQO pode chegar até valores de 190 g/L de DQO. A grande variação entre as concentrações físico químicas da vinhaça está ligada principalmente à diferenças na produção do álcool, como fatores agronômicos, climáticos entre outros (BHARAGAVA e CHANDRA, 2010; MOHANA *et al*., 2009; NANDY *et al*., 2002; PRADA *et al*., 1998; PANT e ADHOLEYA, 2007).

Com a aplicação de vinhaça no solo, pode-se esperar elevação na concentração de sais e potencial risco de salinização ao longo dos anos. Com relação ao nitrato, um dos maiores problemas citados na literatura é a contaminação de lençol freático. A lixiviação do nitrato abaixo da rizosfera pode ser desprezível apenas quando esses compostos são aplicados em áreas vegetadas com emprego de práticas agrícolas adequadas, afastadas de áreas de nascentes ou de regiões com lençol freático superficial (MADEJÓN *et al*., 2001, MARIANGELA e MONTEMURRO, 2010)

Outros fatores limitantes para o lançamento da vinhaça em mananciais são o seu caráter levemente ácido, presença de sulfato, nitrato, fósforo total e nitrogênio amoniacal. O lançamento da vinhaça com excesso de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) pode provocar o fenômeno da eutrofização das águas (VON SPERLING, 1996).

Todos os parâmetros físico-químicos da vinhaça em questão, não se enquadram no padrão de lançamento de efluentes do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 430 de 2011 (CONAMA, 2011) e 357 de 2005 (CETESB, 2005).

Na Tabela 5 estão descritos os resultados das análises físico-químicas da vinhaça realizadas no laboratório de solos do IAC.

Tabela 5. Resultados das análises físico-químicas da vinhaça coletada para o experimento 2.

Parâmetros	Valores	CETESB
pH	4,5	
Condutividade	10,9 ms	
Densidade	0,96	
Resíduo seco a 100 – 110 C	20,85 g/L	
Matéria orgânica total (combustão)	11,90 g/L	
Carbono total (orgânico e mineral)	6,61 g/L	
Resíduo mineral total	8,95 g/L	
Resíduo mineral insolúvel	0,19 g/L	
Resíduo mineral soluves	8,76 g/L	
Nitrogênio total	0,60 g/L	
Fósforo total	0,20 g/L	
Potassio	4,65 g/L	
Cálcio	0,82 g/L	
Magnésio	0,34 g/L	
Enxofre	0,87 g/L	
Cobre total	1,0 ppm	
Manganês total	7,0 ppm	1,0 mg/L
Zinco total	1,0 ppm	5,0 mg/L
Ferro total	60,0 ppm	15,0 mg/L
Relação C/N	11/1	

De acordo com os valores da Tabela 5 verifica-se que a vinhaça utilizada nos experimentos possui valores de nitrogênio total, fósforo total, potássio, manganês e ferro dentro das faixas de valores característicos para a vinhaça. Enquanto que a

matéria orgânica total, cobre e zinco estão abaixo dos valores mínimos normalmente encontrados (Prada *et al.* 1998).

5.2 Resultados da Caracterização do Solo

Os resultados das análises físico-químicas e granulométrica do solo foram realizadas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e pelo Laboratório de Solos e Pavimentação da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (FT/UNICAMP) respectivamente, representados nas Tabelas 6 e 7 para o experimento 1 e Tabelas 7 e 8 para o experimento 2 .

Tabela 6. Resultado das análises físico-químicas do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 1.

pH		V	K	Ca	Mg	Al	H+Al	S.B	C.T.C
H_2O	$CaCl_2$	-- % --	---------- mmolc.dm^3 ----------						
6,5	6,3	82	3,5	87	< 1	-----	20	90,4	110,6

P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	M.O	
						Inicial	Final
---------- mg.dm^3 ----------						-- g.kg $^{-1}$ --	
72	2,8	31	12,6	4,8	0,16	92,5	97,5

V: Percentagem de Saturação; **SB:** Soma das Bases; **CTC:** Capacidade de Troca de Cátions; das Bases; **M.O:** Matéria Orgânica;

Tabela 7. Resultado da Análise Granulométrica do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 1.

Areia	Silte	Argila	Classe de Textura
----------% ----------			
42	25	33	Areia Argilo–Siltosa

Tabela 8. Resultado das análises físico-químicas do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 2.

pH	V	K	Ca	Mg	Al	H+Al	S.B	C.T.C
$CaCl_2$	-- % --	---------- mmolc.dm^3 ----------						
6,2	95	2,4	115	78	0	11	195,8	206,5

P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	M.O
---------- mg.dm^3 ----------						-- g.dm^3 --
30	8,2	10	16,1	2,6	0,13	25

V: Percentagem de Saturação; **SB:** Soma das Bases; **CTC:** Capacidade de Troca de Cátions; das Bases; **M.O:** Matéria Orgânica;

Tabela 9. Resultado da Análise Granulométrica do solo coletado em área de cultivo de cana-de-açúcar utilizado no experimento 2.

Areia	Silte	Argila	Classe de Textura
----------% ----------			
69	18	13	Areia Silto - Argilosa

Os solos utilizados nos ensaios respirométricos foram classificados como muito fértil, principalmente pelos altos valores de soma das bases; saturação por bases, capacidade de troca catiônica e pH entre 6 e 7, faixa em que a maioria dos elementos estão disponíveis. Além dos micronutrientes cobre e manganês (EMBRAPA, 2009).

Os solos utilizados em ambos os experimentos possuem pH elevado quando comparados ao valor de 4,1 encontrado por Crivelaro *et al* (2010) de um solo utilizado para biodegradação de óleo utilizando vinhaça como bioestimulante.

Analisando os dados das Tabelas 7 e 9 verifica-se que o solo coletado apresentou resultados da analise granulométrica diferenciados, sendo o do experimento 1 argiloso e do experimento 2 arenoso. Estes resultados estão relacionados ao local de

coleta, que embora na mesma região as coletas foram realizadas em locais diferentes, devido a disponibilidade da indústria canavieira.

5.3. Resultado do ensaio de lixiviação de íons

A Figura 3 expressa os resultados obtidos do teste de toxicidade com *D. similis* após o ensaio de lixiviação de íons.

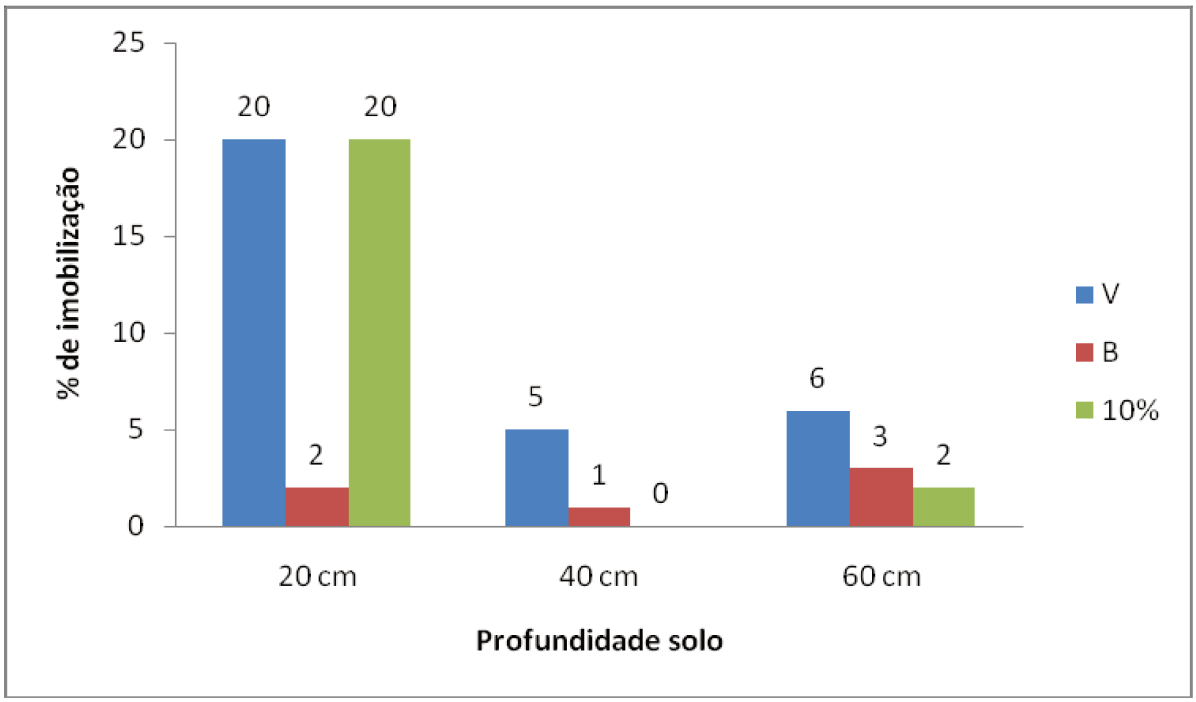

Figura 3. Resultado do teste de toxicidade com Daphnia similis após o ensaio de lixiviação de íons.
Legenda. V: vinhaça; B: biofertilizante; 10%: vinhaça + 10% de biofertilizante

O ensaio de lixiviação de íons foi realizado em solo coletado no campus da FT/UNICAMP, não sendo realizado qualquer tipo de analise. A lixiviação é dependente das características do solo e, portanto deve ocorrer variação de acordo com o tipo de solo, entretanto este ensaio mostra que a toxicidade é uma importante ferramenta de análise.

Nas colunas de PVC de 20 cm, que foram aplicadas vinhaça (V e 10%) houve 100% de morte ou imobilidade dos organismos testados, mostrando a alta toxicidade do

efluente lixiviado e a sua facilidade em atingir a profundidade de 20 cm do solo. O biofertilizante apresentou toxicidade de apenas 10% dos organismos.

Nas colunas de 40 e 60 cm houve brusca queda na toxicidade do efluente, pois a maior profundidade do solo promove a remoção da toxicidade do efluente pela ação física da filtração nas camadas do solo.

As diferentes texturas existentes de solos possuem papel muito importante na irrigação, pois tem influência direta na taxa de infiltração de água, na aeração, na capacidade de retenção de água, na nutrição, assim como na aderência ou força de coesão nas partículas do solo. Ela refere-se à proporção relativa em que se encontram, em determinada massa de solo, os diferentes tamanhos de partículas, sendo a propriedade física do solo que menos sofre alteração ao longo do tempo.

Os solos de textura arenosa possuem teores de areia superiores a 70% e o de argila inferior a 15%; são permeáveis, leves, de baixa capacidade de retenção de água e de baixo teor de matéria orgânica, enquanto que os solos de textura argilosa são solos com teores de argila superiores a 35%, possuem baixa permeabilidade e alta capacidade de retenção de água. Esses solos apresentam maior força de coesão entre as partículas, o que dificulta a penetração no mesmo (EMBRAPA, 2006).

Em vista disso se faz importante o estudo do tipo de solo para a determinação da taxa de aplicação máxima da vinhaça no mesmo.

5.4. Resultados da avaliação da respirometria do solo

A Figuras 4 expressa os resultados da geração de CO_2 acumulados, em mg/L, durante o ensaio de biodegradação da vinhaça no solo “natural” acrescida do biofertilizante Microgeo, avaliada durante 27 dias a 26 ± 2º C (Experimento 1).

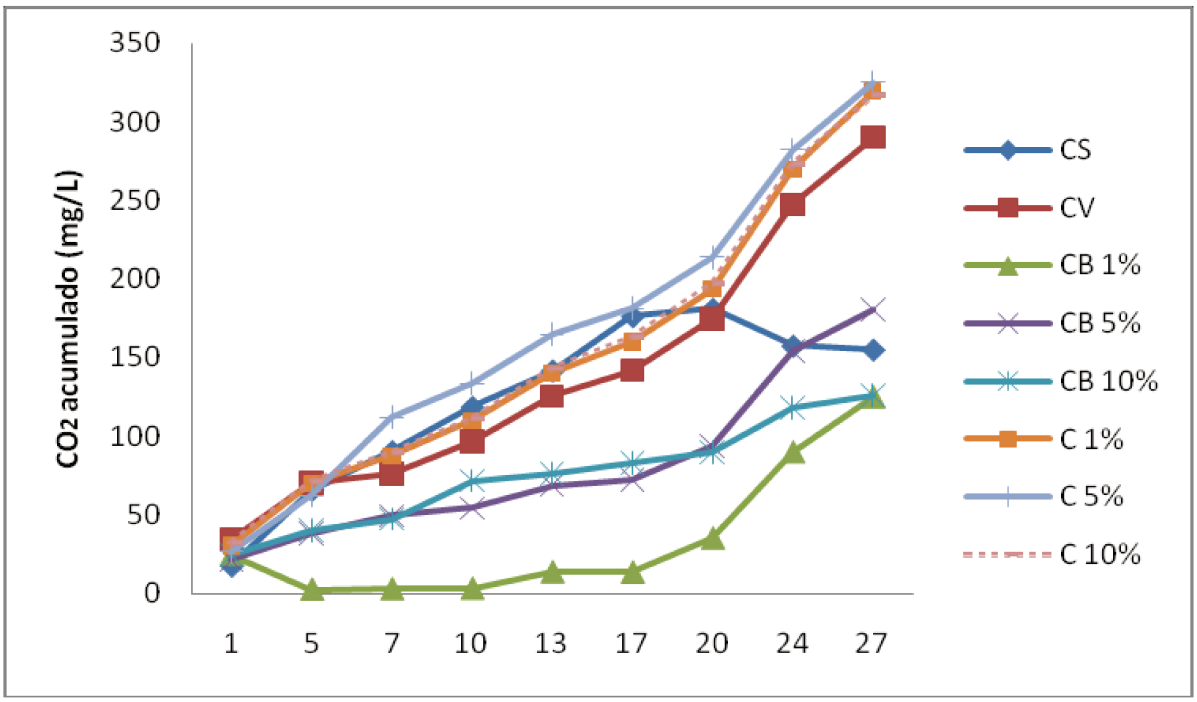

Figura 4. Resultados da geração média acumulada de CO2 em ensaio de respirometria avaliados em respirometros de Bartha, durante o período de 27 dias incubados e temperatura de 26 ± 2ºC, no experimento 1.

Legenda:
CS: solo controle
CV: solo + vinhaça
CB 1%: solo + biofertilizante 1%
CB 5%: solo + biofertilizante 5%
CB 10%: solo + biofertilizante 10%
C1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça
C5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça
C10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça

De acordo com a Figura 4 verifica-se que ocorreu aumento de 87% da produção de CO_2 quando acrescida a vinhaça no solo (controle vinhaça).

Quando adicionou-se biofertilizante no solo a quantidade de CO_2 liberada foi abaixo da emissão do controle vinhaça para todas as concentrações, sendo negativo para os controles 1 e 10% (CB1% e CB10% -19%; CB5% +16,4%), possivelmente pelo biofertilizante apresentar baixa carga orgânica.

Quando acrescido biofertilizante no solo com vinhaça houve aumento na produção de CO_2 em 10, 12 e 9,3% para a C1, C5 e C10% respectivamente, em relação ao controle vinhaça. O resultado mostra o favorecimento da biodegradação da

matéria orgânica presente na vinhaça pela adição do biofertilizante, provavelmente ocasionada pelo aumento do conteúdo orgânico e inorgânico, suplantando a capacidade ou o maior aporte de nitrogênio entre outros nutrientes para a microbiota do solo, fornecendo condições microbiológicas ótimas para o desenvolvimento microbiano conforme citado por Huesemann (1994).

Observa-se que a concentração de CO_2 tendia ao aumento, não estabilizando ao final dos 27 dias de teste, indicando necessidade de maior tempo para biodegradação dos compostos orgânicos do efluente. A menor biodegradação dos compostos no início do processo evidencia a adaptação dos micro-organismos às condições encontradas.

A Figura 5 expressa os resultados do processo de biodegradação da vinhaça em solo seco em estufa a 106ºC em respirômetros de Bartha avaliados durante o período de 98 dias a 26 ± 2ºC, no experimento 2.

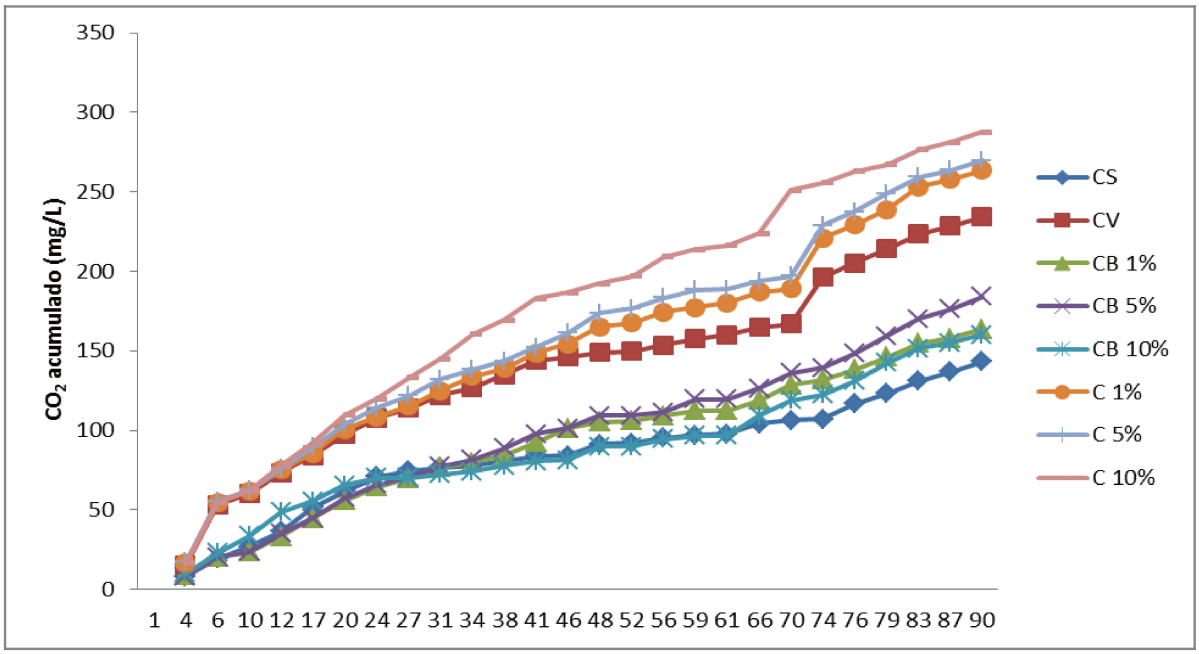

Figura 5. Resultados da geração média acumulada de CO2 em ensaio de respirometria avaliados em respirometros de Bartha, durante o período de 90 dias incubados e temperatura de 26 ± 2ºC, no experimento 2.

Legenda:
CS: solo controle
CV: solo + vinhaça
CB 1%: solo + biofertilizante 1%
CB 5%: solo + biofertilizante 5%
CB 10%: solo + biofertilizante 10%
C1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça
C5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça
C10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça

De acordo com a Figura 5 verifica-se que quando acrescida a vinhaça no solo (controle vinhaça) houve aumento de 38% na produção de CO_2.

Quando adicionou-se biofertilizante no solo também houve aumento na quantidade de CO_2 liberada, sendo de 12% na CB1, 22% na CB5 e de 10% na CB10%.

Quando acrescido biofertilizante no solo com vinhaça houve aumento na produção de CO_2 em 11, 13 e 18% para a C1, C5 e C10% respectivamente, em relação ao controle vinhaça. O que mostra o favorecimento da biodegradação da matéria orgânica presente na vinhaça pela adição do biofertilizante, provavelmente ocasionada pelo aumento do conteúdo orgânico e inorgânico, suplantando a capacidade ou o maior aporte de nitrogênio entre outros nutrientes para a microbiota que neste experimento provavelmente estava diminuída pela esterilização do solo.

Observa-se que com o tempo houve aumento da quantidade de CO_2 produzido, não estabilizando aos 90 dias de teste, o que indica maior tempo necessário para a total biodegradação dos compostos orgânicos do efluente.

Quando comparamos os dois experimentos realizados, notamos que há uma queda de 135 mg/L de CO_2 produzidos, do primeiro para o segundo experimento, quando acrescida vinhaça no solo, devido à redução da microbiota pela esterilização do solo.

Comparando os controles biofertilizantes, nota-se grande diferença no CB1 e CB10% que tiveram produção de CO_2 de 125 mg/L no primeiro experimento e produções de 163 e 160 mg/L segundo experimento. Para o CB5% nota-se aumento de apenas 4mg/L.

Nos tratamentos, o C1 e C5% apresentaram queda de 56 mg/L de produção de CO_2, e o C10% de 30 mg/L, sendo o tratamento que menos apresentou diferença entre os experimentos.

5.5. Resultados da Estimativa da Atividade Microbiana

A hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) é um método que avalia a atividade hidrolítica indiscriminada de micro-organismos sobre a molécula de FDA,

a qual é hidrolisada por várias enzimas (lipases, proteases e esterases) presentes nos micro-organismos do meio onde se encontra a molécula do FDA. Assim, a medida do grau da hidrólise serve como uma medida da atividade microbiana total do solo (SCHNURER e ROSSWALL, 1982), o que pode estar relacionado com a quantidade de matéria orgânica presente na amostra.

A Tabela 10 expressa a concentração de CO_2 acumulado no ensaio de respirometria e a estimativa microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) do experimento 1.

Tabela 10. Estimativa da atividade microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) expressa em µg de FDA hidrolisado em 5g de solo e CO2 acumulado em 27 dias no experimento 1.

Amostra	CO_2 acumulado (mg/L)	µg de FDA hidrolisado em 5 g de solo
CS	**155,14**	**26,84**
CV	**290,03**	**37,10**
CB 1%	**124,71**	**47,93**
CB 5%	**180,63**	**51,45**
CB 10%	**125,77**	**22,47**
C1%	**319,32**	**21,89**
C5%	**325,11**	**20,65**
C10%	**317,14**	**19,90**

Legenda:
CS: solo controle
CV: solo + vinhaça
CB 1%: solo + biofertilizante 1%
CB 5%: solo + biofertilizante 5%
CB 10%: solo + biofertilizante 10%
Concentração1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça
Concentração 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça
Concentração 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

As enzimas responsáveis pela hidrólise da FDA são abundantes no ambiente do solo, enzimas não-específicas como esterases, proteases e lipases, têm se mostrado capazes de hidrolisar o FDA, estando envolvidas na decomposição de muitos tipos de compostos. A capacidade de hidrólise do FDA,

assim, parece generalizada, especialmente entre os principais decompositores, bactérias e fungos (SCHNURER e ROSSWALL, 1982).

Em comparação ao solo controle, o acréscimo da vinhaça ocasionou aumento da atividade hidrolítica, o que pode ser explicado pelo fornecimento de energia e carbono aos micro-organismos por meio da matéria orgânica.O mesmo ocorreu quando acrescentou-se 1 e 5% de biofertilizante.

Quando misturados essa atividade decaiu conforme aumento da taxa de aplicação do biofertilizante, o que não corrobora com as maiores taxas de biodegradação, as concentrações 1, 5 e 10%. Isso pode demonstrar que quando colocados juntos, o biofertilizante favorece a proliferação da microbiota capaz de biodegradar a matéria orgânica presente no efluente.

A Tabela 11 expressa a concentração de CO_2 acumulado no ensaio de respirometria e a estimativa microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) do experimento 2.

Tabela 11. Estimativa da atividade microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) expressa em µg de FDA hidrolisado em 5g de solo e CO2 acumulado em 90 dias no experimento 2.

Amostra	CO_2 acumulado	µg de FDA hidrolisado em 5 g de solo
CS	**143,22**	**15,18**
CV	**234,19**	**28,84**
CB 1%	**163,65**	**13,40**
CB 5%	**184,14**	**13,81**
CB 10%	**160,12**	**10,44**
C1%	**263,45**	**25,65**
C5%	**269,61**	**37,31**
C10%	**287,45**	**34,06**

Legenda:
CS: solo controle
CV: solo + vinhaça
CB 1%: solo + biofertilizante 1%
CB 5%: solo + biofertilizante 5%
CB 10%: solo + biofertilizante 10%
Concentração1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça
Concentração 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça
Concentração 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

Novamente, quando se adicionou vinhaça no solo houve grande aumento da atividade hidrolítica, efeito que não ocorreu quando adicionou-se apenas o biofertilizante que não é rico em matéria orgânica.

Quando misturados essa atividade decaiu na taxa 1% e aumentou nas taxas 5 e 10%, o que demonstra o favorecimento da microbiota presente no solo quando aplicados juntos, novamente mostrando que o biofertilizante favorecer a proliferação da microbiota capaz de biodegradar a matéria orgânica presente no efluente, visto que as concentrações de 5 e 10% foram as que obtiveram maiores índices de biodegradação.

5.6 Resultados do teste de fitotoxicidade com Sementes *Lactuca sativa*.

A Figura 6 expressa os resultados da germinação relativa das sementes de *Lactuca sativa* realizados com os solos contidos nos respirometros, ao final do experimento 1.

Após o processo de biodegradação da vinhaça no solo, realizaram-se os ensaios de fitotoxicidade com a fração solúvel de todos os tratamentos. Em geral, após o ensaio de biodegradação a fração solúvel do solo inibiu a germinação das sementes de *L. sativa* em todos os tratamentos.

As amostras controle vinhaça, controle biofertilizante 5% e todas as concentrações obtiveram germinação de mais de 50% das sementes. Nas amostras de solo controle, controle solo inicial, controle biofertilizante 1% houve inibição de mais de 50% da germinação das sementes e no Controle 10% houve total inibição das sementes, provavelmente ocasionada pela alta salinidade presente nessa concentração.

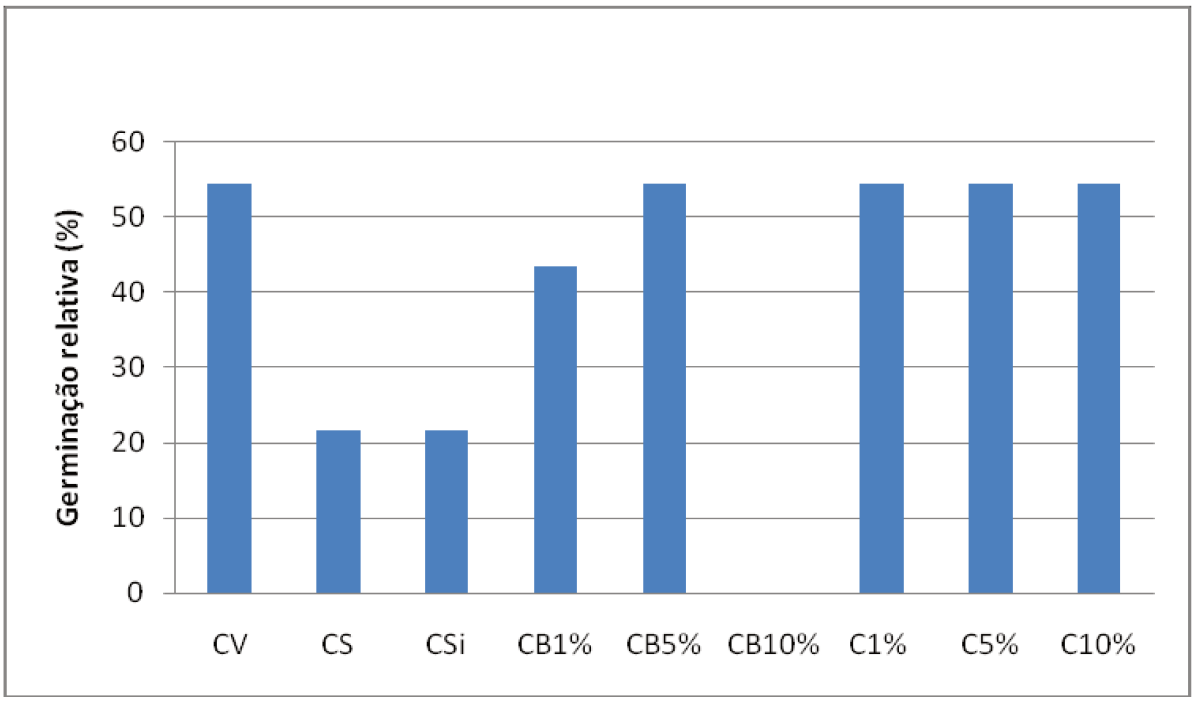

Figura 6. Germinação relativa da semente após teste respirométrico 1.
Legenda: CSi: solo controle inicial, CS: solo controle, CV: solo + vinhaça, CB1%: solo + biofertilizante 1%, CB5%: solo + biofertilizante 5%, CB10%: solo + biofertilizante 10%, C 1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça, C 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça, C 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

Foi relatado que a vinhaça reduz a alcalinidade do solo e a disponibilidade de manganês, inibindo a germinação de sementes (KUMAR *et al.*, 1997). Kannan e Upreti (2008) relatam os efeitos altamente tóxicos da vinhaça sobre o crescimento e germinação de sementes de *Vigna radiata* em baixas concentrações de resíduo (5% v/v). Outros autores verificaram a perda de proteínas e carboidratos das sementes, além de ser observado decréscimo na atividade de enzimas importantes como a fosfatase alcalina e ATPase. Sendo assim, a disposição de vinhaça no solo pode ser danosa para a vegetação.

Na Figura 7 estão representadas as Germinações relativas das sementes para solo cana, solo + vinhaça + biofertilizante, solo + vinhaça e vinhaça nas concentrações 1, 3, 5, 7 e 10%.

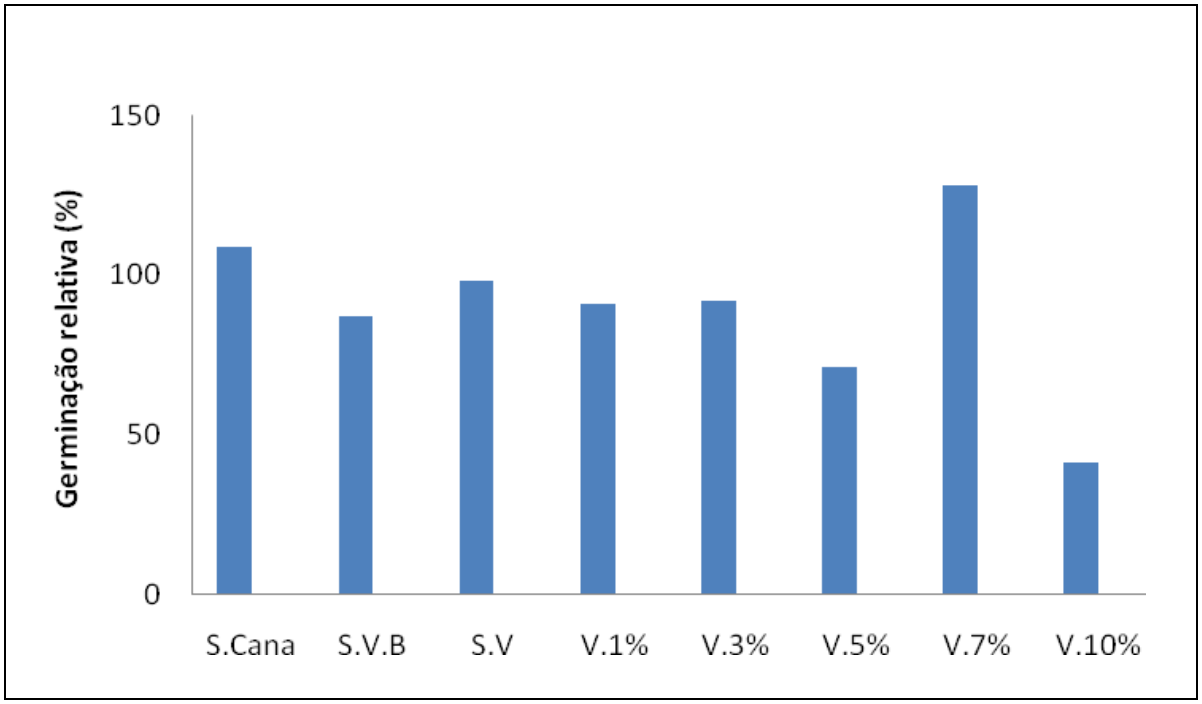

Figura 7. Germinacao relativas das sementes para as amostras Solo Cana, Solo + Vinhaça + biofertilizante, Solo + vinhaça e vinhaça nas concentrações 1%, 3%, 5%, 7% e 10%.
Legenda: S.C: solo cana, S.V.B: solo + vinhaça + biofertilizante, S.V: Solo + Vinhaça, e Vinhaça nas concentrações 1% (V.1%), 3% (V.3%), 5% (V.5%), 7% (V.7%) e 10% (V.10%).

A única concentração em que menos de 50% das sementes germinaram foi a vinhaça a 10%, mostrando essa ser altamente tóxica à semente analisada.

Na figura 8 estão representadas as germinações relativas das sementes após o segundo teste de respirometria.

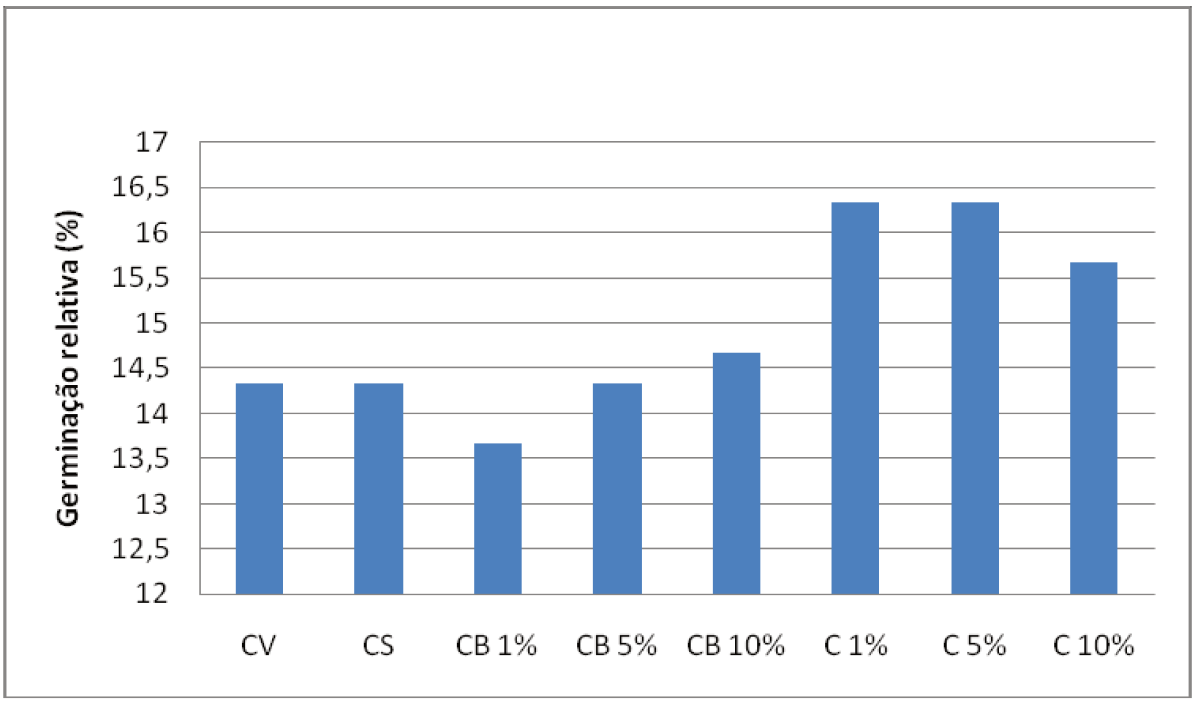

Figura 8. Germinação relativa da semente após segundo teste respirométrico
Legenda: CV: solo + vinhaça, CS: solo controle, CB1%: solo + biofertilizante 1%, CB5%: solo + biofertilizante 5%, CB10%: solo + biofertilizante 10%, C 1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça,
C 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça, C 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

Após o processo de biodegradação da vinhaça no solo, realizaram-se os ensaios de fitotoxicidade com a fração solúvel de todos os tratamentos. Em geral, após o ensaio de biodegradação a fração solúvel do solo inibiu a germinação das sementes de *L. sativa* em todos os tratamentos. As únicas amostras com germinação relativa acima de 15% foram as concentrações C1 e C5%, igualmente germinadas, e a amostra C10%, sucessivamente. Isso demonstra a diminuição da fitotoxicidade da vinhaça com o tratamento realizado.

5.7 Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

A toxicidade do efluente bruto analisado foi de 1,36%, o que indica ser este extremamente tóxico para organismos de vida aquática dulcícola. Esta toxicidade pode estar relacionada ao rápido consumo de oxigênio dissolvido, abaixando-o à concentrações a que os organismos aeróbios não sobrevivem. O oxigênio

dissolvido da concentração 1% foi de apenas 2,0 mg/L, enquanto que no controle com água mineral foi de 5,0 mg/L.

Após o teste de biodegradação nos respirometros verificou-se que o único tratamento que obteve concentração efetiva imobilizadora de 50% dos organismos foi o controle vinhaça (CE_{50} = 65) demonstrando que a aplicação da vinhaça no solo, pode ser prejudicial aos organismos aquáticos uma vez que quando aplicada ao solo pode ocorrer a entrada do resíduo em recursos hídricos.

O tratamento da vinhaça utilizando-se o biofertilizante foi eficaz na remoção de sua toxicidade para a espécie em questão. Portanto este ensaio indica a importância de se efetuar tratamento adequado da vinhaça para que o meio ambiente não sofra forte impacto.

No presente trabalho *D. similis* apresentou toxicidade de 35% quando submetida ao controle vinhaça, 75% ao controle solo, ao controle solo inicial, e às concentrações 1 e 5% e toxicidade de 60% na concentração 1%. Os resultados estão expressos na Figura 9.

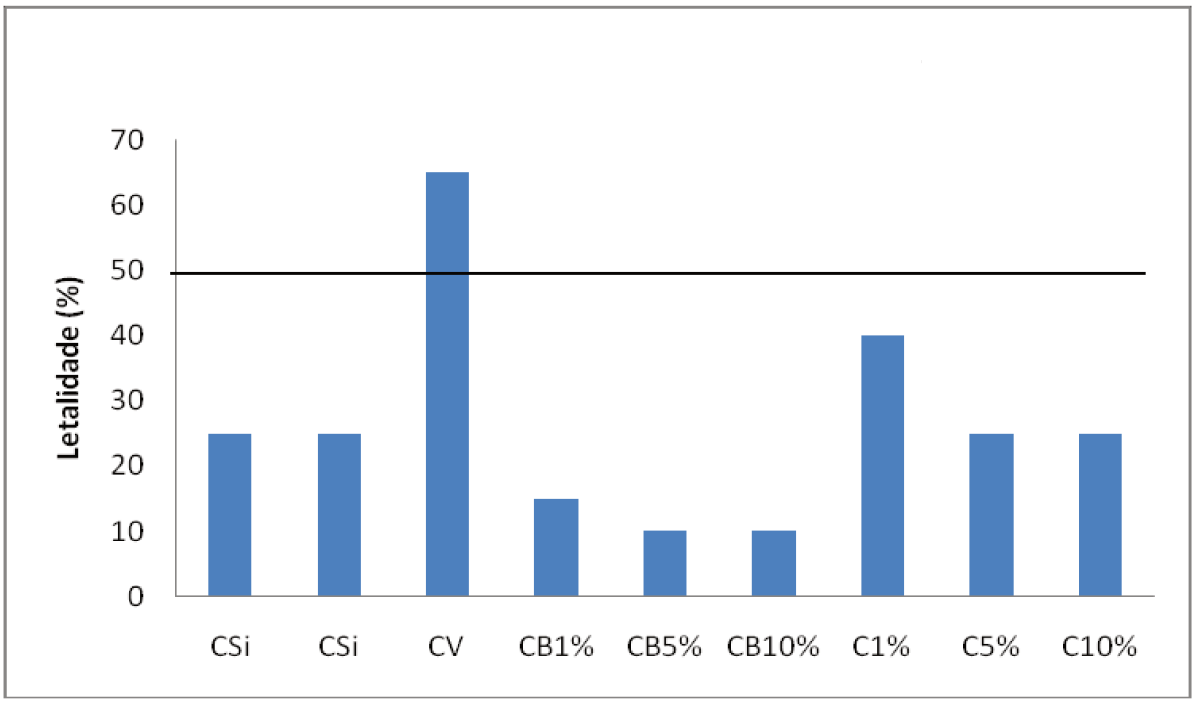

Figura 9. Ensaio de toxicidade aguda com o organismo-teste Daphnia similis após teste respirométrico, avaliado em CE50.
Legenda: CSi: solo controle inicial, CS: solo controle, CV: solo + vinhaça, CB1%: solo + biofertilizante 1%, CB5%: solo + biofertilizante 5%, CB10%: solo + biofertilizante 10%, C 1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça, C 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça, C 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

Esse resultado corrobora com da literatura, onde foi observado grande diferença de toxicidade entre a vinhaça tratada (65,95%) e a 100% (3,59%) mostrando a intensa diminuição do potencial tóxico, provocado pelos compostos da vinhaça (FREIRE, CORTEZ, 2000).

Também foram testadas as toxicidade da vinhaça, do solo coletado, da vinhaça no solo e dos solos após os testes respirométricos.

A vinhaça apresentou toxicidade de 0,95%, o solo de área de cultivo de cana não apresentou toxicidade toxicidade causadora de imobilidade de 50% dos organismos e quando misturados a mesma foi de 73,8%.

Após os testes respirométricos nenhuma amostra causou imobilidade de 50% dos organismos, o que corrobora com as altas taxas de biodegradação encontradas nos tratamento.

5.8. Resultado do ensaio de fitotoxicidade com feijão

Os resultados da altura média e peso seco médio estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12. Resultado do teste de fitotoxicidade com Phaseolus vulgaris L.. Altura e peso seco médios.

Tratamento	Altura média (cm)	Peso seco médio (g)
CS	27,13	3,36
CV	30,08	2,76
CB1%	28,49	2,56
CB5%	36,31	2,04
CB10%	27,95	3,62
C1%	31,63	1,34
C5%	30,08	3,95
C10%	31,17	2,99

Legenda: CS: solo controle, CV: solo + vinhaça, CB 1%: solo + biofertilizante 1%, CB 5%: solo + biofertilizante 5%, CB 10%: solo + biofertilizante 10%, Taxa 1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça, Taxa 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça, Taxa 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

A Tabela 12 indica que quando acrescida a vinhaça no solo, houve aumento na altura média das plantas, porém uma diminuição na massa das mesmas, o que corrobora com Rosado *et al.* (2007), que observou que a aplicação de vinhaça foi prejudicial para a braquiária (*Brachiaria Brizantha*), evidenciado pela redução da produção de matéria fresca e seca da parte aérea em função do aumento do volume de vinhaça aplicado em ambos os solos.

Quando acrescentado o biofertilizante, houve aumento da altura das plantas em todas as concentrações, sendo mais intensa no CB5%, porém com diminuição da massa das plantas nas duas primeiras concentrações, aumentando apenas na CB10%.

A massa de matéria seca acumulada nas folhas, caule e pecíolo, na parte aérea, e a área foliar foram maiores nos tratamentos que receberam biofertilizante.

Quando colocados simultaneamente a vinhaça e o biofertilizante, houve aumento da altura média em todos os tratamentos, porém o único com aumento da massa foi o C5%, o que corrobora com a maior atividade hidrolítica encontrada no segundo experimento de biodegradação da vinhaça.

Estes resultados conflitam com os obtidos por Rosado *et al*. (2007), que observou incremento de produção de matéria fresca e seca da parte aérea e perfilhos para a *Brachiaria decumbens* que recebeu a aplicação de vinhaça.

5.9. Quantificação Microbiológica

A quantificação das bactérias heterotróficas e fungos no solo tiveram como principal objetivo verificar a existência de micro-organismos consumidores de matéria orgânica, que possibilitam o processo de biodegradação.

O biofertilizante utilizado possui em sua composição de 3,5 x 10^6 a 1 x 10^8 UFC/mL até 100 milhões UFC/mL de bactérias e 0,5 x 10^7 a 1,25 x 10^7 UFC/mL até 12,5 milhões UFC/mL de fungos (D'Andrea, 2013).

Na Tabela 13 estão descritos os resultados da quantificação de bactérias e fungos para o experimento 1.

Tabela 13. Quantificação de bactérias e fungos após o processo de biodegradação em teste respirométrico durante o período de 27 dias, avaliados em Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo seco (UFC/g). Experimento 1.

AMOSTRAS	BACTÉRIAS (UFC/g)	FUNGOS (UFC/g)
CS	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
CV	$5,5 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
CB1%	$10,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
CB5%	$4,6 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
CB10%	$3,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$
C 1%	$6,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
C 5%	$1,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$
C 10%	$21,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$

Legenda: CS: solo controle, CV: solo + vinhaça, CB 1%: solo + biofertilizante 1%, CB 5%: solo + biofertilizante 5%, CB 10%: solo + biofertilizante 10%, Taxa 1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça, Taxa 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça, Taxa 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

Após o teste respirométrico, foi analisada a quantidade de bactérias e fungos nos diferentes tipos de tratamento. Assim, o controle solo apresentou a maior quantidade de unidades formadoras de colônias.

Pode-se verificar a diminuição da microbiota do solo com a adição da vinhaça e do biofertilizante, o que não corrobora com as maiores taxas de biorremediação encontradas nos tratamentos.

Com exceção à concentração de 5% e ao seu controle 5%, houve predominância de bactérias que fungos nos tratamentos realizados. A concentração de 5% obteve a menor quantidade de bactérias e baixa quantidade de fungos, o que corrobora com a baixa atividade hidrolítica evidenciada pelo FDA.

Na Tabela 14 estão descritos os resultados da quantificação de bactérias e fungos para o experimento 2.

Tabela 14. Quantificação de batérias e fungos do solo cana e do solo após o processo de biodegradação em teste respirométrico durante o período de 90 dias, avaliados em Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo (UFC/g). Experimento 2.

AMOSTRA	BACTÉRIAS	FUNGOS
SC	$3,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
CS	$6,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
CV	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
CB1%	$1,2 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$
CB5%	$1,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$
CB10%	$1,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$
C 1%	$4,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
C 5%	$2,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
C 10%	$2,6 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$

Legenda: SC: solo cana, CS: solo controle, CV: solo + vinhaça, CB 1%: solo + biofertilizante 1%, CB 5%: solo + biofertilizante 5%, CB 10%: solo + biofertilizante 10%, Taxa 1%: solo + biofertilizante 1% + vinhaça, Taxa 5%: solo + biofertilizante 5% + vinhaça, Taxa 10%: solo + biofertilizante 10% + vinhaça.

Após o teste respirométrico pode-se observar o aumento da quantidade de fungos com a adição da vinhaça e de toda a microbiota com a adição do biofertilizante.

Quando colocados juntos a maior quantidade de bactérias é encontrada na taxa C 10%, o que corrobora com a maior taxa de biodegradação da vinhaça. A maior quantidade de fungos é encontrada na C 5%, sendo esta a segunda maior taxa de biodegradação da vinhaça no solo.

De acordo com o primeiro teste respirométrico realizado houve predominância de bactérias a fungos nos tratamentos realizados.

As análises microbiológicas das amostras indicam importante presença de bactérias heterotróficas e fungos, provavelmente já adaptados ao consumo de matéria orgânica contida no resíduo, o que reforça o potencial de biodegradação do efluente no solo.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- Como citado na literatura a vinhaça apresenta diferenças significativas nas suas características mesmo sendo originadas do mesmo processo;
- O biofertilizante apresentou diferenças em suas características devido a sua produção de modo simplificado, entretanto, essas diferenças nao influenciaram nos resultados obtidos;
- As características do solo influenciam diretamente na atividade microbiana do mesmo;
- A lixiviação da vinhaça ate 20 cm no perfil do solo causou toxicidade de *D. similis*, podendo acarretar contaminação de águas subterrâneas e do lençol freático;
- Nos dois experimentos de biodegradação, tanto em solo argiloso quanto arenoso, o biofertilizante estimulou a biodegradação da vinhaça;
- O biofertilizante favorece a atividade microbiana do solo e as concentrações de 5 e 10% foram as que apresentaram melhores resultados, avaliados pela geração de CO_2 e µg de FDA hidrolisado;
- A estimativa da atividade microbiana do solo mediante o método de Hidrolise de Diacetato de Fluoresceina (FDA) é uma importante ferramenta em estudos de biodegradação de resíduos no solo;
- Após os ensaios de biodegradação avaliados pela respirometria de Bartha ocorreu inibição da germinação das sementes de *L. sativa*, o que demonstra o impacto que o excesso de vinhaça pode causar ao solo;
- A vinhaça foi extremamente tóxica para o organismo teste *D. similis*, entretanto após a biodegradacao a toxicidade foi removida;
- As concentrações de 5 e 10% de biofertilizante contribuiram para o desenvolvimento de feijao *Phaseolus vulgaris L.*

7. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). **NBR 12713**, Rio de Janeiro, 2004.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos em solo - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. **NBR 14283**. São Paulo, 1999.

ALBUQUERQUE, A. F. **Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando micro-organismos do solo**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, Área de concentração Saneamento, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 99p, 2000.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. AWWA: Washington. 1998.

ATLAS, R. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin** v. 31, n. 4, p. 178-182, 1998.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Traduzido e revisado pela Universidade Federal da Paraíba. FAO, Centro de Ciências Agrárias, 1991.

BAKER, K. H. E.; HERSON, D. S. Bioremediation. **Environmental Microbiology Associates**, p.375p, 1994

BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO, J.A.H. Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. Jaguariúna: **EMBRAPA-CNPMA: Circular Técnica**, p. 22, 1998.

BOEHM, M.J.; HOITINK, H.A.J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of *Pythium* root rot of Poinsettia. **Phytopathology**, v. 82, p.259-264, 1992.

BOWERS, N.; PRATT, J. R.; BEESON, D.; LEWIS, M. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford, v. 16, 1997, p. 207-213.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. **RAS - Regras para análise de sementes** 365p, 2009.

BHARAGAVA, R.N.; CHANDRA, R. Biodegradation of the major color containing compounds in distillery wastewater by an aerobic bacterial culture and characterization of their metabolites. **Biodegradation**, v.21, p, 703-711, 2010.

BOUTIN, S.R., ANSARI, H., CONCIBIDO, V., DENNY, R., ORF, J. & YOUNG, N.D. **RFLP analysis of cyst nematode resistance in soybean**. Soybean Genetics Newsletter 19: 1993, 123-127.

CARVALHO, G.R. O setor sucroalcooleiro em perspectiva. Embrapa Monitoramento por Satélite, Campinas. **Boletim Conjuntura Agropecuária**: Sucroalcooleiro, 2006.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providencias, **Norma técnica 357**, 2005.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. Método de Ensaio, **Norma técnica L6.350** São Paulo, 15p 1990.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Água – Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*, Claus, 1876 (CLADOCERA, CRUSTACEA). Método de Ensaio, **Norma Técnica L5.018** – São Paulo, 17p. 1994.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. **Norma Técnica P. 4.231**. São Paulo, 2006.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade do Solo**. São Paulo, 2011.

CHEUNG, W.Y., N. HUBERT. A simple and rapid DNA micro extraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Meth. Appl.** 3: 1989, 60-70.

CONAB. Companhia Nacional de Abstecimento. 2011. **Acompanhamento da safra brasileira**, Disponível em <www.conab.org.br>, acessado em 3 de fevereiro de 2013.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução Nº 002**, de 5 de junho de 1984

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução Nº 430**, de 13 de maio de 2011.

COPERSUCAR. Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Aproveitamento da vinhaça: viabilidade técnico-econômica**, 2. ed, 1979.

CORRÊA M.C.M.; CONSOLINI, F.; CENTURION, J.F. Propriedades químicas de um latossolo vermelho distrófico sob cultivo contínuo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.5, p.1159-63, 2001

COSTA, S. M. G**. Efeito da adição de vinhaça na dinâmica da microflora do solo do cerrado de Corumbataí, SP.** Dissertação de Mestrado (Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", p. 129, Rio Claro, 1983.

COURACCI FILHO, B.; SIVIERO, A. R.; SOUZA, L. C. F. E.; ALBUQUERQUE, A. F. "**Avaliação da biodegradação de lodo de indústria cítrica no solo através do ensaio de respirometria**." In: 19° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1997

CRIVELARO, S. H.R.; MARIANO, A. P.; FURLAN, L.T.; GONÇALVES, R.A.; SEABRA, P. N.; DE ANGELIS, D.F. Evaluation of the use of vinasse as biostimulation agent for the biodegradation of oily sludge in soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V.53 n.5: pp. 1217-1224, 2010.

CUTRIGHT, T. J.; LEE, S. In Situ Soil Remediation: Bacteria or Fungi? Department of Chemical Engineering, University of Akron. Akron - Ohio - USA. s/v. p. 413-419, 1994.

D'ANDREA, P.A. Processo de compostagem líquida contínua – CLC e biofertilizante. **BRN. PI0207342-0. A2**. 2010. Disponivel em < www.microgeo.com.br>, acesso em 2 de fevereiro de 2013.

D'ANDREA, P.A. Microgeo – Adubação biológica - **Manual Técnico**. 2013 Disponível em <www.microgeo.com.br >, acesso em 1 de março de 2013.

DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. **National water research institute (NWRI)**, Environment Canada, Burlington,1989.

EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; GRENNBERG, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 20 ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, p. 1082, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes,** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 627, 2009.

ROSADO, T.L.; PASSOS, R.R. & ANDRADE, F.V. **Influência da aplicação de diferentes doses de vinhaça no desenvolvimento da braquiária (*Brachiaria decumbens*) cultivada em dois solos.** CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31, Gramado, 2007.

FERREIRA, E. D. S. **Aplicação da respirometria na caracterização do esgoto doméstico afluente a uma ETE por processo de lodos ativados.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, p.140p, 2002.

FREIRE, W. J. Vinhaça de Cana-de-açúcar. **Série Engenharia Agrícola**, v1, 2000

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

GUERRA, R. C.; ANGELIS, D. F. Classificação e biodegradação de lodo de stações de ratamento de água para descarte em aterro sanitário. **Arquivos do Instituto Biológico**, 72 (1), p. 87-91, 2005.

GLÓRIA, N.A.; ORLANDO FILHO, J. Aplicação de Vinhaça como Fertilizante. São Paulo: **Coopersucar**, p. 38, 1983.

HAMILTON, S.L.; MCLAUGHLIN, M.; KARLIN, A.Disulfide bond cross-linked dimmer in acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 79, p. 692-699, 1977.

HAMMER, M.J.; HAMMER Jr., M.J. Water and wastewater tecnology. 5th.ed. New Jersey: **Prentice Hall International**, p. 540, 2004.

HUESEMANN, M.H. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils - **Journal of Contamination**, v. 3, n. 3, p. 299-318, 1994.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (1990). **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.** Brasília, Segunda edição, IBAMA.

ISEPON, O. J. **Efeito da aplicação de vinhaça, do nitrogênio a da idade de corte sobre a produção e valor nutritivo do capim Braquiária (*Brachiaria decumbens* stapf.).** 137f. Tese de Doutorado (Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1990.

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

MACHADO, A.T.; MACHADO, C.T.T. **Manejo da diversidade genética do milho em sistemas agroecológicos**. EMBRAPA Cerrados. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Planaltina-DF. 2009.

MADEJÓN, E.; LOPEZ, R.; MURILLO, J. M.; CABRERA, F. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain*).* **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 84, n. 1, pp. 55-65, 2001.

MANISANKAR, S.; VISWANATHAN, C.; RANI, Electrochemical treatment of distillery effluent using catalytic anodes, **Green Chemistry**, v.5, p. 270–274, 2003.

MARIANGELA, D.; MONTEMURRO, F. Long – term effects of organic amendments on soil fertility. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, n.2, pp. 401- 422, 2010.

MARIANI, P. D. S. C**. Estudo da biodegradação da blenda de Poli (ε caprolactona) e amido modificado em meios sólido e líquido.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 77p, 2005.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de Doutorado, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, 162p, 2006.

MARJOTTA-MAISTRO, M.C. **Ajustes nos mercados de álcool e gasolina no processo de desregulamentação.** Tese de Doutorado em Ciências. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 180p, 2002.

MEDEIROS, M.B.; LOPES, J.S. Biofetilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, 2006.

MELLO, G. S. L. **Avaliação da viabilidade da utilização do teste respirométrico de Bartha para determinar a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares em solo tropical: caso do Fenantreno**. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. 191p, 2005.

MOHANA, S.; ACHARVA, B.K.; MADAMWAR, D.Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications, **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 12-25, 2009.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p.297–305, 2009.

MORALES, G.C. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. México: IMTA, 2004.

NAIK, B.S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Host growth characteristics influenced by seed inoculation with microorganisms. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.4, p.891-895, 2008.

NANDY, T.; SHASTRY, S.; KAUL, S.N. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery, **Journal of Environmental Management**, v. 65, p. 25-38, 2002.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. (LARGEA/). Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. Piracicaba: IPEF/LCF/ESALQ/USP, **Informativo Sementes IPEF**, Abr-1998. Disponível em: <http://www.ipef.br/sementes/>, acesso em dezembro de 2012.

NAVARRO, A.F.; CEGARRA, J.; ROIG, A.; GARCIA, D. Relationships between organic matter and carbon contents of organic wastes. **Biossource Technology**, v. 44, p. 203-207, 1993.

NETO, E.A.T.N. **Biofertilizantes: caracterização química, qualidade sanitária e eficiência em diferentes concentrações na cultura da alface.** Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo - Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. 2006.

NUVOLARI, A. **Aplicação de Lodo de Esgotos Municipais no Solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo.** Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia Civil - Universidade Estadual de Campinas, 1996.

OECD. OECD **Guidelines for Testing of Chemicals:** Alga, Growth Inhibition Test. OECD TG 201. In: Annex I: OECD Test Guidelines for Studies Included in the SIDS. 1984.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation, **Biodegradation**, v. 18, p. 647-659, 2007.

PAUL, D.; PANDEY, G.; PANDEY, J.; JAIN, K.R. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. **Trends in Biotechnology**, v.23, p. 135–114, 2005.

PENA, M.; COCA, M.; GONZALEZ, G.; RIOJA, R.; GARCIA, M.T. Chemical oxidation of wastewater from mollasses fermentation with ozone, **Chemosphere**, v. 51, p.893–900, 2003.

POTENTINI, M.F. e A.J. RODRIGUEZ-MALAVER: Vinasse biodegradation by Phanerochaete chrysosporium. **J. Environ. Biol**., 27, 661-665. 2006.

PRADA, S.M.; GUEKEZIAN, M.; ENCÁRNACIÓN, SUÁREZ-IHA, M.E.V. 1998. Metodologia análitica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, 21:3.

PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments, **Critical Reviews in Microbiology**, v.19, p.217-242, 1993.

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

SANTOS, A. C. V. Efeitos nutricionais e fitossanitarios do biofertilizante liquido a nivel de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, n. 4, p. 275 – 279, 1991.

SANTOS, A.C.V; AKIBA, F. Biofertilizantes líquidos: uso correto na agricultura alternativa. **Soropédia**: UFRRJ, p. 35, 1996.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Removal of color from biomethanated distillery spent wash by treatment with activated carbons, **Bioresource. Technology**, v. 98, p. 2629–2635, 2007.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology***,* v. 43, p.1256-1261, 1982.

SINGER,C.A.; LUEPROMCHAI,E.J.; YAHNG, S.C, CROWLEY,E.D. Contribution of earthworms to PCB bioremediation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 765–776, 2001.

SINGH, P.N.; ROBINSON, T.; SINGH, D. Treatment of industrial effluents—distillery effluent, in: A. Pandey (Ed.), **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology, Food Products Press**, New York, USA, pp. 135–141, 2004.

TAKESHITA, E.V. 2006. **Adulteração da gasolina por adição de solventes: análise dos parâmetros físico-químicos.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, p.113, 2006.

TAM, N. F. Y.; TIQUIA, S. M. Assessing toxicity of spent litter using germination technique. **Resources Conservation and Recycling**, v. 11, p. 261-274, 1994.

USEPA 712-C-96-167. (OPPTS 850.6200). **Earthworm subchronic toxicity test**. Ecological effects test guidelines. Washington DC, 1989.

USEPA 712-C-96-154. (OPPTS 850.4200). **Seed germination / root elongation toxicity test.** Ecological effects test guidelines. Washington DC, 1996.

USEPA 600-F-90-027. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.** Washington DC, 2002.

USEPA. Environmental Protection Authority. **Guidelines Soil bioremediation**. U.S. Environmental Protection Agency,Washington, DC, pp 1–9. 2005.

UYEDA, C. A. **Influência da aplicação de vinhaça na condutividade hidráulica do solo saturado e no escoamento superficial.** Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", p. 67, 2009.

VACCARI, G.; TAMBURINI, E.; SGUALDINO, G.; URBANIEE, K.; KLEMES, J. Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. **Journal of Cleaner Production**, v. 13, p. 499-507, 2005.

Valsechi, O. **Manejo de vinaza en Brasil: experiencias y lecciones aprendidas**. 2007. Seminario de Vinazas Usos y Tratamientos. Guatemala. Disponible en: <www.cca.ufscar.br>. Acesso em 10 de janeiro de 2013

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p. 1163–1172, 2001.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2ª ed. Belo Horizonte – MG: DESA-UFMG, p. 243, 1996.

WADT, L.C. **Cultivo de *Pleurotus spp*. em vinhaça visando `a produção de biomassa e exopolissacarídeos.** Dissertação de mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba,p. 72, 2008.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2008.