

**MARCAÇÃO DE VINHAÇA COM ^{15}N E AVALIAÇÃO DE PERDAS
GASOSAS DE NITROGÊNIO DA VINHAÇA- ^{15}N E URÉIA- ^{15}N EM
SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*).**

WALDO ALEJANDRO RUBÉN LARA CABEZAS

ENGENHEIRO AGRÔNOMO, M.S.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1991.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Lara Cabezas, Waldo Alejandro Rubén

L318m Marcação de vinhaça com 15N e avaliação de perdas gaso-
sas de nitrogênio da vinhaça-15N e uréia-15N em solos cul-
tivados com cana-de-açúcar (Saccharum spp.). Piracicaba,
1991.

85p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Adubação nitrogenada 2. Nitrogê-
nio 15 3. Nitrogênio - Perda - Avaliação 4. Vinhaça como
adubo 5. Uréia - Perda - Avaliação I. Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.61

**MARCAÇÃO DE VINHAÇA COM ^{15}N E AVALIAÇÃO DE PERDAS
GASOSAS DE NITROGÊNIO DA VINHAÇA- ^{15}N E URÉIA- ^{15}N EM
SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*).**

WALDO ALEJANDRO RUBÉN LARA CABEZAS

Aprovada em : 28.12.1991

Comissão julgadora :

Prof. Dr. Euripedes Malavolta

CENA/USP

Prof. Dr. Jose Oriando Filho

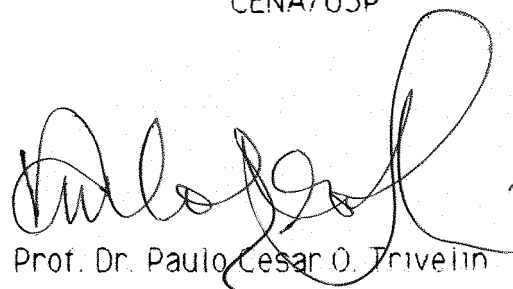
UF/São Carlos

Prof. Dr. Gaspar Henrique Korndörfer

UFU/MG

Prof. Dr. Antonio Eneidi Boaretto

CENA/USP



Prof. Dr. Paulo Cesar O. Trivelin

Orientador

A mi querida madre, con
profunda añoranza
OFEREÇO

A mi adorada hijita
María del Pilar
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Ciência por ter-me permitido compartilhar excelentes momentos com ela.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar O. Trivelin, pelo incentivo, apoio e orientação na realização deste trabalho.

Ao Dr. Luis Carlos Basso pela valiosa colaboração e sugestões apresentadas na área de fermentação, assim como, pelas facilidades outorgadas na utilização dos laboratórios do Dpto. de Química Analítica, ESALQ/USP.

Ao Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, pelas sugestões na etapa de fracionamento nitrogenado dos componentes da fermentação e pelas facilidades concedidas na utilização do laboratório de Bioquímica de Plantas, CENA/USP.

A Rafaela Rosetto, colega de estudos, pela sua entusiasta participação nos inúmeros testes realizados na etapa preliminar deste estudo.

Aos técnicos João Jurandir Isaque, Geraldo de Arruda Jr e a

estagiária Dulcimara de Souza da Seção de Isótopos Estáveis do CENA/USP pela colaboração nas determinações analíticas e a Sr. Miguel Luiz Baldessin pelos seus serviços datilográficos.

A FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) pela contribuição financeira ao estudo e pela bolsa concedida.

Ao pessoal técnico da COOPERATIVA DE PRODUTORES DE AÇUCAR e ALCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO, Piracicaba, pela orientação na área de fermentação etanólica, apoio analítico e financeiro para a produção de vinhaça-¹⁵N.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

	Página.
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Efeito da complementação mineral da vinhaça aplicada em cana-de-açúcar	4
2.2 Efeitos da aplicação da vinhaça na dinâmica do solo e suas alterações microbiológicas	15
2.3 Marcação de vinhaça com ^{15}N	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Processo de marcação da vinhaça com o isótopo estável ^{15}N	21
3.1.1 Seleção do procedimento de marcação	21
3.1.2 Procedimento de fermentação etanólica para produção de vinhaça- ^{15}N em condições de laboratório	23
3.1.3 Determinações analíticas dos componentes do proce- sso fermentativo	24
3.1.4 Composição isotópica do material fermentado	25
3.2 Estudo de perdas gasosas de N da vinhaça- ^{15}N e uréia- ^{15}N em condições de laboratório	27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Processo de marcação da vinhaça com o isótopo estável ^{15}N	33
^{15}N	33
4.1.1 Seleção do procedimento de marcação	33
4.1.2 Composição isotópica do material fermentado	45
4.1.3 Distribuição do nitrogênio do s.a.- ^{15}N e do mosto nos componentes: lêvedo centrifugado e vinho delevurado, da fermentação etanólica	50
4.2 Estudo de perdas gasosas de nitrogênio da vinhaça- ^{15}N e uréia- ^{15}N em condições de laboratório	52
4.2.1 Precisão da estimativa do NrSPV (balanço- ^{15}N) e do NvtPV (extrato por digestão-destilação) em relação a variabilidade experimental e de composição isotó- pica da vinhaça- ^{15}N	67
5. CONCLUSÕES	73
6. LITERATURA CITADA	74
APÉNDICE: Glossário de Termos	84

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Distribuição do N fornecido à fermentação pelo s.a.- ¹⁵ N e do mosto no procedimento FESE de marcação da vinhaça- ¹⁵ N	51
2. Distribuição do N enriquecido das assimilado pelo lêvedo e do mosto adicionado à fermentação segundo o procedimento FELE de marcação da vinhaça- ¹⁵ N	53
3. Taxa de evaporação da água e de N-NH ₃ volatilizado dos tratamentos com incorporação de uréia e da vinhaça complementada com uréia no solo LR.-valores médios de três repetições-	54
4. Taxa de evaporação da água e de N-NH ₃ volatilizado dos tratamentos com incorporação de uréia e da vinhaça complementada com uréia no solo PV.-valores médios de três repetições-	54
5. Perdas gasosas de N proveniente da incorporação da uréia (2 cm) e da vinhaça complementada com uréia nos solos LR e PV.- Balanço- ¹⁵ N-	58

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Resposta de cana-de-açúcar a complementação nitrogenada da vinhaça em solos de diferente classe textural	7
2. Caracterização física e química da camada arável (0-20 cm.) do solo latossolo roxo (LR) e podzólico vermelho amarelo (PV).	28
3. Balanço de massa dos ciclos fermentativos correspondentes ao procedimento FESE de marcação da vinhaça com ^{15}N	34
4. Massa seca, nitrogênio total, concentração de ^{15}N , nitrogênio no lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N (NIPSA) e nitrogênio assimilado proveniente do s.a.- ^{15}N (NaPSA), nos 7 ciclos fermentativos do procedimento FESE de marcação da vinhaça- ^{15}N	36
5. Nitrogênio total, concentração de ^{15}N e nitrogênio na vinhaça proveniente do s.a.- ^{15}N (NVPSA) nos 7 ciclos fermentativos do procedimento FESE de marcação da vinhaça- ^{15}N	37
6. Caracterização química das vinhaças produzidas nos procedimentos FESE e FELE de marcação	39

	Página
7. Balanço de massa dos ciclos fermentativos correspondentes ao procedimento FELE de marcação da vinhaça com ^{15}N	40
8. Massa seca, nitrogênio total, concentração de ^{15}N , nitrogênio no lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N (NIPSA) e nitrogênio desassimilado proveniente do s.a.- ^{15}N absorvido pelo lêvedo (NdPSA) nos 3 ciclos fermentativos do procedimento FELE de marcação da vinhaça- ^{15}N	42
9. Nitrogênio total, concentração de ^{15}N e nitrogênio na vinhaça proveniente do s.a.- ^{15}N (NvPSA) nos 3 ciclos fermentativos do procedimento FELE de marcação da vinhaça- ^{15}N	43
10. Comparação dos procedimentos FESE e FELE na marcação da vinhaça- ^{15}N	44
11. Fracionamento nitrogenado nos componentes do processo de fermentação etanólica, segundo procedimento FESE de marcação da vinhaça- ^{15}N	46
12. Concentração isotópica de ^{15}N (átomos % ^{15}N) determinada nas frações de nitrogênio do caldo de cana e inóculo e nos componentes lêvedo centrifugado e vinhaça no processo FESE de marcação	47

	Página
13. Nitrogênio total do solo (Nt), concentração de ^{15}N , nitrogênio no solo proveniente da fonte marcada (NSPF) e nitrogênio residual no solo proveniente da fonte marcada (NrSPF)	56
14. Procedência no N-volatilizado total (Nvt), do nitrogênio proveniente da fonte (NvtPF) e do solo (NvtPS), para o tratamento com uréia complementada à aplicação da vinhaça (V-U), nos solos LR e PV.....	59
15. Procedência no N-NH ₃ volatilizado total (N-NH ₃ v), do nitrogênio proveniente da fonte (NvtPF) e do solo (NvtPS), para os tratamentos com uréia complementada a aplicação da vinhaça (V-U), nos solos LR e PV.....	61
16. Balanço geral de perdas nitrogenadas do tratamento V-U para o solo LR, segundo sua procedência (da vinhaça, da uréia e do solo) e segundo sua natureza (amoniaca e orgânica).....	63
17. Balanço geral de perdas nitrogenadas do tratamento V-U para o solo PV, segundo sua procedência (da vinhaça, da uréia e do solo) e segundo sua natureza (amoniaca e orgânica).....	64

18. Comparação da variabilidade experimental do tratamento V* nos solos LR e PV, em relação a variabilidade da composição isotópica nas frações nitrogenadas da vinhaça- ¹⁵ N, na determinação do nitrogênio residual no solo proveniente da vinhaça (NrSPV) segundo o balanço- ¹⁵ N	69
19. Comparação da variabilidade experimental do sub-tratamento V*-U nos solos LR e PV, em relação a variabilidade da composição isotópica nas frações nitrogenadas (Nt, Ns e Ni) da vinhaça- ¹⁵ N, na determinação do nitrogênio volatilizado total proveniente da fonte (NvtPV) nos extratos por digestão-destilação ...	71

MARCAÇÃO DE VINHAÇA COM ^{15}N E AVALIAÇÃO DE PERDAS GASOSAS DE NITROGÊNIO DA VINHAÇA- ^{15}N E URÉIA- ^{15}N EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp*).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

AUTOR: Waldo Alejandro Rubén Lara Cabezas

RESUMO

Foi definida em condições de laboratório, o procedimento de marcação da vinhaça com ^{15}N por meio do processo fermentativo. O crescimento do levedo em meio contendo $^{15}\text{N-NH}_4^+$, antes de sua utilização na fermentação etanólica (fermentação com levedo marcado com ^{15}N (FELE)) mostrou ser o mais viável. Nesse processo, a recuperação metabólica do traçador na vinhaça foi de 8,6% em média por ciclo, com recuperação acumulada em três ciclos de 20,1%. A adição direta de sulfato de amônio- ^{15}N (90,39 átomos %) à dorna de fermentação (fermentação cíclica com adição de sulfato de amônio- ^{15}N (FESE)), mostrou recuperação inferior ao processo FELE, sendo de 1,4% em média por ciclo e a acumulada em sete ciclos de 3,4%. A distribuição quantitativa do traçador entre o levedo reciclado e o vinho após a fermentação, evidenciou o potencial de

utilização da técnica isotópica em estudos do metabolismo nitrogenado no processo de fermentação etanólica.

A vinhaça- ^{15}N produzida segundo o procedimento FESE de marcação, foi utilizada na avaliação de perdas gasosas de N quando aplicada a solos de características texturais diferentes e complementada com uréia num experimento de laboratório. Em extratos acidulados contendo N-volatilizado dos solos incubados com as fontes marcadas (uréia e vinhaça), em sistemas fechados com arraste de ar, foi determinada a natureza das perdas (N-amoniacal e N-orgânico volátil) e sua procedência (N-uréia, N-vinhaça e N-solo). Ao final do experimento, o balanço- ^{15}N no solo permitiu estimar as perdas totais das fontes. Em relação ao N aplicado, foram estimadas perdas gasosas da uréia de 11,2 e 15,3% no solo LR e de 17,5 e 25,2% no solo PV, quando efetuada a simples incorporação em relação a complementação da vinhaça, respectivamente. No tratamento de complementação mineral, as perdas gasosas de N-vinhaça foram de 59,1 e 13,5% nos solos LR e PV respectivamente. Os resultados mostraram que as perdas de N-orgânico volátil foram exclusivamente provenientes do solo, sendo as de caráter amoniacal provenientes da uréia e vinhaça. Foi comparada a variabilidade experimental em relação a variabilidade isotópica das frações nitrogenadas marcadas nas vinhaças- ^{15}N .

A luz dos resultados obtidos e antecedentes da literatura, discutiu-se uma hipótese que contribua a explicar resultados de resposta na produtividade de soqueiras de cana-de-açúcar, em estudos com complementação nitrogenada.

**LABELLING OF VINASSE WITH ^{15}N AND EVALUATION OF GASEOUS
NITROGEN LOSSES OF ^{15}N -VINASSE AND ^{15}N -UREA IN SOILS
CULTIVATED WITH SUGAR-CANE (*Saccharum spp*).**

ADVISER: Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

AUTHOR: Eng. Agr. Waldo Alejandro Rubén Lara Cabezas.

SUMMARY

A procedure of ^{15}N -vinasse labelling was developed under laboratory conditions through a fermentative process. The growth of yeast in $^{15}\text{N-NH}_4^+$ medium before its use in ethanolic fermentative process (FELE procedure of labelling) was the most successful. The mean metabolic recovery of the label from the vinasse by this procedure, after fermentation, was 8.6% per cycle and the cumulative recovery for three cycles was 20.1%. The direct addition of ^{15}N -ammonium sulphate (90.39 atoms%) to the vintage tub (FESE procedure of labelling), showed less mean recovery per cycle and cumulative of 3.4% for seven cycles, in relation to FELE procedure. Quantitative distribution of the tracer between recycled yeast and wine after fermentation, showed the potential use of the isotopic technique in nitrogen metabolism studies in the ethanolic fermentation process.

The ^{15}N -vinasse produced according to FESE labelling procedure was utilised to evaluate the potential losses of gaseous nitrogen when applied to different textural soils and complemented with urea under laboratory conditions. Acidulated extracts containing volatilised nitrogen from soils incubated with the labelled sources (urea and vinasse) were obtained from a forced-draft system. The nature of the lost nitrogen (volatile organic-N and volatilised NH_3 -N) and its origin (urea-N, vinasse-N and soil-N) were determined in these extracts. At the end of the experiment the soil ^{15}N -balance allowed the estimation of total losses of the sources. In relation to the applied nitrogen, the gaseous losses of urea were estimated as 11.2 and 15.3% in the LR soil and 17.5 and 25.2% in the PV soil, when urea was applied once and complemented to vinasse, respectively. The gaseous losses of N-vinasse were 59.1 and 13.5% in the LR and PV soils, respectively, when treated with vinasse complemented with urea. The results also show that volatile organic-N losses were only from the soil and NH_3 -N losses from both sources applied. Comparison was made between experimental and isotopic variability of nitrogen fractions of labelled ^{15}N -vinasse.

From these results and from others found in the literature a hypothesis was discussed which contributes to explain productivity responses of ratoon sugar-cane to nitrogen complementation studies.

1. INTRODUÇÃO

A escolha de produzir álcool combustível como alternativa ao petróleo, trouxe como consequência para o Brasil resíduos de significativa importância sócio-política e ecológica, entre os quais, a vinhaça passou a se constituir no subproduto mais volumoso e de maior poder contaminante, produzido pela indústria sucro-alcooleira. De todas as possibilidades de utilização da vinhaça estudadas, a aplicação "in natura" aos solos cultivados com soqueiras de cana-de-açúcar e sua potencial utilização em outras culturas, continua sendo ainda a mais viável economicamente. A vinhaça constitui-se num verdadeiro fertilizante orgânico-mineral e melhorador de características físicas do solo. Não deve ser esquecido que esta forma de utilização foi devida a valiosa contribuição do Professor Jayme Rocha de Almeida com seus estudos pioneiros no início da década de 50 (Almeida, 1952). Esses estudos mostraram que a vinhaça, longe de acidificar os solos, produzia uma reação alcalinizante, "contra todos os ensinamentos dos grandes mestres" tornando "realidade a solução definitiva do angustiante problema do escoamento da vinhaça", e colocou fim a um dogma da época. Decorridos 40 anos desde a execução desses estudos, a caracterização da vinhaça pelo Professor Almeida como um

N-fertilizante. Avaliar esses aspectos levarão à solução não conseguida pela pesquisa convencional, no exemplo citado anteriormente. É convicção do autor a necessidade de introduzir modificações no enfoque experimental atualmente utilizado, assim como, utilizar a valiosa contribuição do isótopo estável ^{15}N para a solução desse importante problema, dada as implicações de carácter econômico (substituição de adubação mineral), acadêmicas (conhecimento da dinâmica do N no sistema solo-planta), sócio-políticas e ecológicas. Com a finalidade de auxiliar a pesquisa neste e outros estudos, surgiu a idéia de produzir vinhaça marcada bioquimicamente com o isótopo estável ^{15}N , buscando soluções próprias para problemas brasileiros. Sendo assim, os principais objetivos deste estudo são:

1. obtenção de vinhaça marcada bioquimicamente com o isótopo estável ^{15}N , a partir de mosto de caldo de cana.
2. Avaliar o potencial de perdas gasosas de N da vinhaça e do N-uréia complementar em dois solos de características texturais diferentes, em condições de laboratório.

fertilizante "em virtude do teor em nitrogênio, fósforo e potássio", tem sido desvirtuada, sendo considerada, em forma um tanto simplista como fertilizante potássico quase que exclusivamente. Não teria sido criado um novo "dóγμα" em torno da vinhaça? Pode-se afirmar "a priori" que entre os nutrientes desprezados da vinhaça, o nitrogênio é o principal, dado sua importância na nutrição mineral das plantas. A melhor prova desta afirmação se constitui na escassa pesquisa realizada visando compreender os efeitos da aplicação da vinhaça na dinâmica do nitrogênio no solo como dos outros nutrientes e a ausência absoluta de trabalhos relativos as transformações no solo desse nutriente contido na vinhaça, e seu aproveitamento pela cultura. -

Tomando como exemplo o grande número de estudos efetuados nas duas últimas décadas, visando determinar a necessidade de complementação nitrogenada via fertilizante após aplicação da vinhaça em soqueiras de cana-de-açúcar, pode-se concluir como balanço geral, que esse objetivo não foi atingido. Ao modo de ver do autor, ao considerar a vinhaça exclusivamente como adubo potássico, associado as limitações da própria metodologia experimental utilizada nesse tipo de estudos, são os principais responsáveis por resultados tão pouco esclarecedores. É reconhecida a alta complexidade dessa "caixa preta" e sabe-se de fonte de diversos estudos que a adição de material orgânico ao solo acarreta profundas alterações do meio, de maior ou menor reversibilidade, segundo o material e as condições ambientais existentes. Não deve ser ignorado que o nitrogênio aproveitado pela soqueira é a soma de 4 fontes nitrogenadas principais: N-vinhaça, N-nativo do solo, N-fixado biologicamente e

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os numerosos estudos de complementação mineral da vinhaça aplicada "in natura" em solos cultivados com soqueiras de cana-de-açúcar desenvolvidos nos últimos anos, mostram a preocupação de diversos pesquisadores da área no sentido de definir as condições determinantes de resposta da cultura em termos de produtividade e qualidade tecnológica da matéria prima industrializada. Além de algumas hipóteses levantadas tentando explicar os conflitantes resultados avaliados até o presente, não estão definidas essas condições, colocando em manifesto as limitações do enfoque metodológico tradicionalmente utilizado em estudos de nutrição de plantas. Por outra parte, trabalhos visando compreender melhor os efeitos da vinhaça na dinâmica do nitrogênio no solo são escassos, sendo determinantes na solução do problema.

2.1. Efeito da complementação mineral da vinhaça aplicada em soqueiras de cana-de-açúcar.

Até o presente, parece existir consenso quanto a dose de vinhaça a ser aplicada segundo sua procedência. Os resultados disponíveis

vêm demonstrando que entre 35 a 50 m³/ha da vinhaça de mosto de melaço e 80 a 150 m³/ha da vinhaça proveniente de mosto misto e de caldo, não representam perigo de salinização dos solos, assim como, não prejudicam a qualidade da matéria prima em termos de atraso na maturação, diminuição no teor de pol do caldo e maiores aumentos no teor de cinzas. (GLORIA & ORLANDO F^o, 1984 e KIEHL, 1985).

Os numerosos estudos de composição química da vinhaça foram determinantes para a definição da dose, mostrando como já havia sido indicado por ALMEIDA (1966), que a variabilidade da sua composição está sujeita a natureza da matéria prima, mosto e vinho, assim como, do funcionamento do aparelho destilador após processo fermentativo e sua posterior concentração ou diluição com águas residuais do processo agro-industrial. Portanto, sua aplicação continua subordinada a determinação analítica prévia. Também tem sido recomendada sua aplicação em função do equivalente a 200 kg de K₂O/ha (equivalente a adubação mineral) sendo possível aplicar teores mais elevados ao solo, dada a distribuição da vinhaça em área total e não em faixas, como acontece com a adubação mineral (COPERSUCAR, 1979).

A complementação mineral (especialmente nitrogenada) tem sido cogitada pelo desbalanceamento de nutrientes como nitrogênio e fósforo em relação ao potássio da vinhaça. Essa deficiência, suprida por uma complementação, deveria melhorar em teoria a resposta de produtividade de colmos e não afetar a qualidade tecnológica da cultura, (SILVA et alii, 1981; MONTEIRO et alii, 1981; RODRIGUES et alii, 1984; PEREIRA et alii, 1985; ALONSO et alii, 1987; SOBRAL et alii, 1988).

Resultado desse tipo de experimentos, apresentados na Tabela 1, foram ordenados segundo o indicador de resposta definido por PLANALSUCAR (1979): solos com mais de 35% de argila apresentam maior possibilidade de êxito de resposta, sem necessariamente o autor deste estudo concordar com esse controverso critério. Os experimentos foram caracterizados levando em consideração aqueles parâmetros explicitados pelos autores, sendo salientada a quantidade de N adicionado aos solos via vinhaça e os acréscimos de produtividade e qualidade tecnológica (Δ Prod. e Δ Q.T.) em relação à testemunhas com aplicação unicamente da vinhaça. Ainda assim, muitos autores não explicitam a época da complementação após a aplicação da vinhaça, a sua procedência (mosto de melação, misto ou caldo), em alguns casos a época de corte da soqueira (SOBRAL et alii, 1988), a caracterização química completa da vinhaça utilizada (PEIXOTO & COELHO, 1981 e GLORIA et alii, 1984), assim como a classe textural do solo (MONTEIRO et alii, 1981; ALBUQUERQUE & MARINHO, 1984; SILVA & GURGEL, 1981 e SILVA et alii, 1981).

Dos 61 tratamentos considerados, 41% apresentam acréscimos de produtividade a partir de 10 t/ha, sendo 46% em solos com conteúdo de argila superior a 35%, e de 36% em solos com argila inferior a 35%. Embora não seja conclusivo o parâmetro utilizado por Planalsucar (1979), na definição da resposta, os acréscimos mais expressivos se apresentam em solos argilosos (20 a 30 t/ha de cana). Resulta-se perigoso referenciar um único parâmetro, embora seja reconhecida sua importância na qualificação da fertilidade de um solo, na procura de justificar respostas, dada a complexidade do sistema e o exíguo controle experimental de campo que é

Tabela 1 - Resposta de cana-de-açúcar a complementação nitrogenada da vinhaça em solos de diferente classe textural.

Solo	Argila —%	Tratamento		Ciclo	Δ Prod. t/ha	Δ Q.T. pol/cana	Referência
		Fonte (1) Dose/ha —m ³ —	Forma (2) Aplicação				
Solos < 35% argila							
AQ	10	1 Vinhaça	42	V + SA	NA 56-79	1º	Alonso et alii, (1987)
		SA	60				
	2	1 Vinhaça	42	V + U	NA 56-79	1º	
		U	60				
	3	1 Vinhaça	42	V + Ur	NA 56-79	1º	
		Ur	60				
	4	1 Vinhaça	42	V → SA	NA 56-79	1º	
		SA	60				
	5	1 Vinhaça	42	V → U	NA 56-79	1º	
		U	60				
	6	1 Vinhaça	42	V → Ur	NA 56-79	1º	
		Ur	60				
	7	1 Vinhaça	42	V → Aq	NA 56-79	1º	
		Aq	60				
LVe	19	8 Vinhaça	87	V → U	CB 45-3	---	Sobral et alii, (1988)
		U	45				
	9	1 Vinhaça	87	V → U	CB 45-3	---	
		U	90				
	10	1 Vinhaça	348	V → U	CB 45-3	---	
		U	45				
	11	1 Vinhaça	348	V → U	CB 45-3	---	
		U	90				
LEa	16	12 Vinhaça	43	V → U(30)	CB 41-76	2º	Silva et alii, (1980)
		U	48				

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Solo	Tratamento		Ciclo	Variedade	Forma (2)	Aplicação	Q.T.	Prod.	Referência		
	Fonte (1)	Dose/ha								Variedade	Corte
Legenda	Argilla	—m ³ —	kgN/ha				Δ				
LEa	16	13	Vinhaça	80	43	V → U(1)	CB 41-76	2º	1.0	1.0	Silva et alii, (1980)
			U	48							
LEa	16	14	Vinhaça	60	38	SA → V	CB 41-76	1º	6.0	1.1	Espirionello et alii, (1981)
			SA	80							
PVIs	4	15	Vinhaça	86	20	SA → V	CB 41-76	1º	11.2	1.8	
			SA	80							
LEa	32	16	Vinhaça	40	17	SA → V	CB 41-76	1º	10.8	1.8	
			SA	80							
LEa	—	17	Vinhaça	80	68	V → M.gr.	NA 56-79	3º	7.6	0.96	Silva & Gurgel, (1981)
			Mist. Gran.	36							
—	—	18	Vinhaça	120	102	V → M.gr.	NA 56-79	3º	10.0	1.77	
			Mist. Gran.	36							
PVIs	4.8	19	Vinhaça	150	—	V → N/P	CB 45-3	c.p.	14.9	—	Peixoto & Coelho, (1981)
			N/P	40/80							
			Vinhaça	150	—	V → N/P	CB 45-3	c.p.	18.8	—	
			N/P	120/240							
LEa	14	21	Vinhaça	60	10	V → U	IAC 48-65	3º	8.0	-0.4	Magro et alii, (1981)
			U	90							
			Vinhaça	60	10	V → A.f	IAC 48-65	3º	-6.0	-0.2	
			Ad foliar	16							
LVe	12.6	23	Vinhaça	90	—	V → U	NA 56-79	2º	9.4	0.9	Gloria et alii, (1984)
			U	45							
LEa	—	24	Vinhaça	228	71	V → U	CB 45-155	1º	-22.0	0.3	Silva et alii, (1981)
			U	90							

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Solo	Argila -%	Tratamento		Ciclo	Variedade	Corte	Δ Prod. t/ha	Δ Q.T. pol%cana	Referência
		Fonte(1) -m ³	Dose/ha kgN/ha						
LEa	-	25 Vinhaça	228	71	CB 45-155	1º	-7.0	0.6	Silva et alii, (1981)
		SA		90					
LYa	4	26 Vinhaça	400	256	CB 45-3	c.p.	3.3	0.8	Coelho et alii, (1986)
		N parcelado		50					
		27 Vinhaça	400	256	CB 45-3	c.p.	2.6	0.4	
		N parcelado		100					
		28 Vinhaça	400	256	CB 45-3	1º	5.7	0.1	
		N parcelado		50					
		29 Vinhaça	400	256	CB 45-3	1º	16.0	0.0	
		N parcelado		100					
		30 Vinhaça	400	256	CB 45-3	2º	-6.3	-1.3	
		N parcelado		50					
		31 Vinhaça	400	256	CB 45-3	2º	-8.3	-1.7	
		N parcelado		100					
LV	22	32 Vinhaça	100	40	IAC 52-150	1º	-1.6	-0.4	Pereira et alii, (1985)
		U		45					
		33 Vinhaça	100	40	IAC 52-150	1º	3.7	0.7	
		U		90					

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Solo	Tratamento		Ciclo	Variedade	Forma (2)	Aplicação	Δ Prod. t/ha	Δ Q.T. pol%cana	Referência		
	Fonte (1)	Dose/ha -m ³ -									
Solos > 35% argila											
LR	56.6	34	Vinhaça U	100	14	V → U	IAC 51-205	1º	-6.3	-0.8 (3)	Pereira et alii, (1985)
				45							
		35	Vinhaça U	100	14	V → U	IAC 51-205	1º	-7.7	-1.3 (3)	
				90							
LR	35.2	36	Vinhaça U	100	17	V → U	IAC 51-205	1º	1.3	-0.1 (3)	
				45							
		37	Vinhaça U	100	17	V → U	IAC 51-205	1º	8.3	2.1 (3)	
				90							
PV	47	38	Vinhaça U	50	27	V → U	CO 997	-	19.0	0.3	Sobral et alii, (1988)
				45							
		39	Vinhaça U	50	27	V → U	CO 997	-	17.0	0.6	
				90							
		40	Vinhaça U	100	54	V → U	CO 997	-	18.0	0.5	
				45							
		41	Vinhaça U	100	54	V → U	CO 997	-	22.0	0.0	
				90							
LE	44	42	Vinhaça SA	84	40	SA → V	CB 71-76	1º	6.7	0.8	Espironello et alii, (1981)
				80							
TE	52	43	Vinhaça U	80	43	V + U	CB 41-76	2º	12.0	-0.8	Silva et alii, (1980)
				48							
		44	Vinhaça U	80	43	V → U(30)	CB 41-76	2º	23.0	-0.4	
				48							
TE	50	45	Vinhaça U	100	21	V + U	CB 47-355	4º	14.0	0.1	Silva et alii, (1981)
				90							

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Solo	Tratamento		Ciclo	Δ Prod. t/ha	Δ Q.T. pol%cana	Referência					
	Fonte (1) -m ³ -	Dose/ha kgN/ha									
Legenda	Argila -%	(1) Dose/ha -m ³ -	Forma (2) Aplicação	Variedade	Corte						
TE	50	46	Vinhaça U	100	21	V → U(7)	CB 47-355	4º	32.0	-0.6	Silva et alii, (1981)
					90						
TE	46	47	Vinhaça U	100	58	Y + U	NA 56-79	4º	31.0	-0.4	
					90						
		48	Vinhaça U	100	28	V → U(7)	NA 56-79	4º	32.0	-0.7	
					90						
LE	-	49	Vinhaça SA	35	25	V → SA	CB 41-76	4º	3.0	0.8	Monteiro et alii, (1981)
					46						
LE	-	50	Vinhaça SA	35	25	V → SA	CB 41-76	3º	3.4	0.3	
					46						
LE	59	51	Vinhaça N foliar	60	10	V → Nf	NA 56-79	2º	-5.0	0.2	Magro et alii, (1981)
					16						
		52	Vinhaça U	60	10	V → U	NA 56-79	2º	18.0	0.1	
					90						
LR	58.9	53	Vinhaça U	90	-	V → U	NA 56-79	2º	5.1	1.61	Gloria et alii (1984)
					45						
TE	50.3	54	Vinhaça U	90	-	V → U	NA 56-79	2º	25.2	3.2	
					45						
LV	-	55	Vinhaça N/P	45	40	V → N/P(60)	CB 45-3	1º	8.1	-1.9	Albuquerque & Marinho, (1984)
					80/90						
		56	Vinhaça N/P	45	40	V → N/P(60)	CB 45-3	2º	7.8	0.7	
					80/90						
		57	Vinhaça N/P	45	40	V → N/P(60)	CB 45-3	3º	28.7	-0.5	
					80/90						
LV	-	58	Vinhaça N/P	45	33	V → N/P(60)	RB 70194	1º	-15.3	-0.2	
					57/41						

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Sola Legenda	Argila —g—	Tratamento		Ciclo	Variedade	Corte	Δ Prod. t/ha	Δ Q.T. pol%cana	Referência	
		Fonte(1) Dose/ha —m ³ —	kgN/ha Forma (2) Aplicação							
LV	59	Vinhaça N/P	45 57/41	33	V→N/P(60)	RB 70194	2º	-13.7	0.2	Albuquerque & Marinho, (1984)
	60	Vinhaça N	45	33	V→N(60)	RB 70194	1º	-15.1	-1.1	
	61	Vinhaça N	45	33	V→N(60)	RB 70194	2º	-4.5	-1.1	

(1) SA = sulfato de amônio, U = uréia, Ur = uran, Aq = aquamônia

(2) V + Fertilizante = vinhaça com fertilizante dissolvido, V → Fertilizante = vinhaça complementada com fonte nitrogenada em época diferente. Valor entre parenteses indica dias da aplicação da fonte após distribuição da vinhaça.

(3) Os resultados referem-se a ART/ha.

possível de ser efetuado. Normalmente entre a instalação dos tratamentos e a avaliação de produtividade e qualidade tecnológica da matéria prima, transcorrem 10 a 12 meses, e sem dúvida, os efeitos pretensamente estudados podem ser mascarados por fatores de caráter climático, de manejo e ainda inerentes ao sistema solo-planta, que são pouco conhecidos. Entretanto, nos trabalhos revisados, a qualidade tecnológica da matéria prima parece não ser afetada pelas doses de vinhaça e do N mineral complementar. Na literatura encontra-se outras hipóteses para explicar esses resultados. GLORIA et alii (1984) - experimentos 22, 53 e 54 da Tabela 1 - relacionam a maior intensidade de resposta a complementação nitrogenada em solos com maior CTC, sendo confirmado por RODRIGUES et alii (1984) para solos com CTC acima de 7,0 meq/100g solo. Por sua vez, ESPIRONELLO et alii (1981) - experimentos 14, 15, 16 e 42 - sugerem que a resposta a complementação apresente-se como função do teor de N na vinhaça, afirmando como provável, que a complementação não seja necessária para quantidades acima de 60 kg/ha de N contido na vinhaça. Por outro lado, enquanto estudos do fracionamento nitrogenado nos diferentes tipos de vinhaça não sejam efetuados e publicados, a disponibilidade do nitrogênio desse fertilizante fica sujeita a questionamento.

Por outra parte, estudos de taxa de mineralização do N-vinhaça e os próprios efeitos da vinhaça na taxa de mineralização do N do solo são indispensáveis para entender a necessidade de complementação. Segundo NUNES et alii (1981), sendo aproximadamente 50% do N-total da vinhaça de mosto misto prontamente mineralizável e usado pelo metabolismo

microbiano, sua disponibilidade para a cultura poderia ainda ser uma realidade, logo após sua liberação.

Segundo SILVA et alii (1980) complementações nitrogenadas defasadas da época de maior demanda pela cultura poderiam explicar os resultados diferentes dos esperados. Nesse sentido, a falta de informação em relação a época da complementação, não explicitada em alguns trabalhos, não permite analisar este importante aspecto.

Considerando somente os experimentos que explicitam o teor de N da vinhaça com resposta acima de 10 t/ha (25) pode-se apreciar uma frequência importante de resposta (73%), quando a vinhaça procede de mosto misto ou caldo, e a adição de N via vinhaça é menor que a complementação, independente da classe textural do solo. Teoricamente, parece lógico supor que a resposta da complementação nitrogenada seja mais expressiva quando a quantidade de N via vinhaça for inferior a dose de complementação, e com um tipo de vinhaça com efeitos no solo menos intensos e duráveis (menor teor de matéria orgânica em relação a vinhaça de mosto melaço), permitindo deixar disponível o N para a cultura, ainda no período de maior demanda. Obviamente que esta e as hipóteses anteriormente levantadas não vão além de conjecturas, e que, a definição do problema na procura das causas que realmente estão determinando resposta, requer que se efetue mudanças de enfoque experimental, lançando mão de metodologias que permitam compreender melhor as drásticas alterações do ciclo do N no sistema solo-planta. Nesse sentido a literatura mostra esforços isolados (CARNAUBA et alii, 1989; ALMEIDA et alii, 1982), visando determinar o destino do N complementado à vinhaça,

utilizando a técnica isotópica com ^{15}N . Esses resultados serão discutidos no item 2.2.

2.2. Efeitos da aplicação da vinhaça na dinâmica do N no solo e suas alterações microbiológicas.

Sabe-se que o grande reservatório de nitrogênio no solo é a matéria orgânica e que a liberação do N mineral à solução do solo é determinada pela atividade microbiana, assim como, diversos fatores estarão determinando o aproveitamento pela cultura (drenagem, topografia, textura do solo, práticas culturais, umidade e temperatura). Ao se tratar de definir a necessidade de substituir ou complementar a vinhaça com fertilizante é obrigatório avaliar os efeitos de sua aplicação na dinâmica do nitrogênio no solo e na massa microbiana, assim como avaliar o próprio destino no solo do nitrogênio da vinhaça dado que em última instância, a resposta efetiva da soqueira será o produto da interação de quatro fontes nitrogenadas principais: N-nativo do solo, N-fixado biologicamente, N-vinhaça e N-fertilizante. Nesse sentido, o isótopo estável ^{15}N através da utilização de fertilizantes- ^{15}N assim como da vinhaça- ^{15}N mediante o estabelecimento de delineamentos experimentais adequados, permitirão contribuir valiosamente ao esclarecimento desses aspectos mencionados.

Até o presente, poucos trabalhos foram desenvolvidos nesse sentido, sendo limitados à condições de laboratório, utilizando altas doses de vinhaça muito acima das recomendações indicadas para condições de

campo. (VELLOSO et alii, 1982; NUNES et alii, 1981; AMARAL SOBRINHO, 1983; NEVES et alii, 1983 e TAUKE & RUEGGER, 1987). Embora esses estudos não permitam efetuar extrapolações principalmente em termos quantitativos dos fenômenos estudados, são válidos sob o ponto de vista qualitativo e portanto representam os fenômenos que devam estar acontecendo em condições de campo, sob influência da vinhaça aplicada.

Material de solos incubados com doses crescentes de vinhaça acompanhado da adição de N-NO_3^- mostraram acréscimos no teor de N-NH_4^+ em função do período de incubação e das doses de vinhaça utilizada (AMARAL SOBRINHO et alii, 1983 e NUNES et alii, 1981). Em condições de campo VIETES & BRINHOLI, (1990) observaram também acréscimos de N-NH_4^+ entre 98 e 220 dias após a aplicação da vinhaça na profundidade até 20 cm. Nesse sentido é sugerido a amonificação do N-orgânico nativo do solo e/ou do N-orgânico da vinhaça dada a alta proporção de N-solúvel prontamente mineralizável. Também é sugerido que parte do N-NO_3^- contribua através do processo de redução dissimilatória. Por outra parte, o N-NO_3^- desaparece logo após a incubação do solo com vinhaça. AMARAL SOBRINHO et alii (1983) sugerem que esse fenômeno seja devido a desnitrificação, dado a expressão de pulsos de N-NO_2^- e de N_2O verificados. A presença de material energético no solo fornecido pela vinhaça demandaria O_2 para atender as necessidades metabólicas microbianas e portanto o N-NO_3^- seria reduzido.

Estudando a lixiviação de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , VELLOSO et alii (1982) observaram que a aplicação de vinhaça ao solo gerou expressivos

efluentes de N-NH_4^+ devido provavelmente a concorrência com o K^+ pelos sítios de troca, que deve ser preferencialmente adsorvido. O N-NO_3^- diminuiu nos efluentes sendo também sugerida a desnitrificação.

Observações de acréscimos no teor de N-orgânico do solo também tem sido efetuados em solos incubados, em função de doses crescente de vinhaça (AMARAL SOBRINHO et alii, 1983; 1987 e CARNAUBA et alii, 1989).

Em relação ao destino do N-fertilizante, CARNAUBA et alii (1989) utilizando sulfato de amônio- ^{15}N (100 kgN/ha eqüivalente) complementando a aplicação de 120 m^3 /ha eqüivalentes de vinhaça, por um período de 108 dias, observaram decréscimo gradual do N-NH_4^+ fertilizante acompanhado por um acréscimo correspondente no teor de N-orgânico devido a imobilização, e mais baixa recuperação do N-fertilizante no solo nos tratamentos com adição de vinhaça até os 70 dias de incubação. São atribuídas perdas de tipo gasosa, mais também poderia ter acontecido lixiviação as quais, não foram determinadas. Por sua vez ALMEIDA et alii, (1982) utilizando a mesma fonte enriquecida com ^{15}N em solo latossolo vermelho escuro, textura média, incubado com dose eqüivalente a 200 m^3 /ha de vinhaça, já tinham verificado a estimulação do processo de imobilização do N-fertilizante nos primeiros 15 dias de incubação, ficando ao final do período, 38% em média do N-fertilizante na fração orgânica. Também atribuem perdas de N no balanço final em virtude de um processo desnitrificante.

Estimulação da atividade de nitrogenase foi observada por

NEVES et alii (1983) em solo incubado com doses crescentes de vinhaça até 1200 m³/ha complementada com Mo e fosfato, permitindo calcular eqüivalente de fixação em torno de 25 kgN/ha. A atividade dos microrganismos fixadores foi acentuada após a precedente dos microrganismos não fixadores, estimulados pela presença de N-solúvel da vinhaça.

Estudos efetuados por CAMARGO (1954) mostraram que o efeito acidificante inicial da vinhaça favorecia o crescimento de fungos do genero *Neurospora* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. entre outros, sendo mais expressivo em solos mais argilosos. Posteriormente com a diminuição da acidez pelo ataque fúngico da matéria orgânica coloidal da vinhaça, seria favorecido o crescimento bacteriano. TAUKE & RUEGGER (1987) observaram esses efeitos até cinco meses após a aplicação de 200 a 500 m³/ha eqüivalentes da vinhaça. Segundo NEVES et alii (1983) todas as mudanças nos processos biológicos, provocados pela adição de vinhaça ao solo são temporárias, desaparecendo com a exaustão dos substratos energéticos presentes na vinhaça.

Embora seja facilitado esse tipo de estudos em condições de laboratório, tanto por motivos de ordem econômica como de controle dos parâmetros avaliados, esforços devem ser feitos no sentido de realizar estudos desse tipo em condições de campo, em forma integrada aos trabalhos de complementação mineral, dado que o sistema radicular e a rizosfera do solo interagem com as formas de N do solo e afetam suas transformações, assim como, a intensidade dos processos envolvidos (desnitrificação, volatilização de amônia, lixiviação, imobilização e

nitrificação).

Assim, estudos da dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta associado a parâmetros de solo bem definidos e integrados aos estudos de complementação mineral à aplicação da vinhaça, são fundamentais para definir as causas determinantes da resposta pela soqueira. Para abandonar o terreno das hipóteses, o uso da vinhaça marcada com ^{15}N , associado a utilização de fertilizante enriquecido com esse isótopo, viria possibilitar a definição de questões como:

- destino do N-vinhaça no sistema solo-planta, sua interação com os processos de imobilização, mineralização, lixiviação, perdas gasosas e sua disponibilidade para a cultura.

- efeito no N-orgânico do solo e mineral e sua disponibilidade para a cultura.

- destino do N-fertilizante no sistema solo, sua interação com os mesmos processos e sua disponibilidade para a cultura.

- discriminação na cultura, do N proveniente do solo, da vinhaça e do fertilizante complementado.

- quantificação do N residual no solo, da vinhaça e do fertilizante e seu efeito residual para o próximo corte da soqueira.

Cabe salientar que a possibilidade de quantificar esses fenômenos, permitirão compreender a vantagem da complementação nitrogenada ou sua substituição, com os evidentes benefícios econômicos.

2.3 Marcação de vinhaça com ^{15}N .

A utilização do isótopo ^{15}N tem sido essencial no estudo dos processos de transformação do N e suas interações no solo. Vários aspectos relacionados com o *turnover* desse nutriente tem sido estudados: a natureza química da matéria orgânica do solo, decomposição de resíduos vegetais, atividade enzimática, valor residual do N imobilizado, taxa e extensão do *turnover* afetado por diferentes formas de N-mineral, outras sais, inibidores de nitrificação, conteúdo de água no solo, temperatura, etc (HAUK & BREMNER, 1976).

Na marcação de vinhaça- ^{15}N , a utilização da matéria prima marcada com esse traçador sugere a utilização de material vegetal previamente marcado (colmo) do qual seria extraído o caldo, sendo posteriormente submetido a fermentação. Entretanto, estudos de adubação em cana-de-açúcar com a utilização de fertilizante- ^{15}N , em condições de campo, tem mostrado que a marcação do colmo dificilmente supera a concentração de ^{15}N acima de 1,0 átomo %, embora esse valor seja flutuante em função de diversos fatores que não cabe nesse caso analisar. Por outra parte, a transformação em vinhaça do caldo, requer a presença obrigatória do levedo, que apresenta teor de nitrogênio (7 a 8%) suficiente para produzir drástica diluição isotópica no N-vinhaça, o que inviabilizaria sua utilização como material marcado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Processo de marcação da vinhaça com o isótopo estável ^{15}N .

3.1.1. Seleção do procedimento de marcação.

A semelhança de outros compostos nitrogenados enriquecidos com ^{15}N , o nível de marcação da vinhaça, assim como, o volume produzido devem ser compatíveis com o tipo de estudo que irá fazer uso do produto. Porém, a diferença da natureza físico-química dos processos que originam esses compostos, com a conseqüente homogeneidade da composição isotópica, a natureza complexa e seletiva do processo bioquímico envolvido na produção de vinhaça (fermentação etanólica), é determinante da sua heterogeneidade na composição isotópica, independente do procedimento de marcação a ser selecionado. Deve-se estar ciente que na fermentação vão coexistir formas nitrogenadas susceptíveis de transformação microbiológica, e conseqüentemente susceptíveis de marcação, assim como, formas nitrogenadas que vão sofrer escassa ou nenhuma alteração metabólica, e portanto, constituem formas mais resistentes de serem marcadas com o isótopo.

a) *Adição de sulfato de amônio- ^{15}N (s.a.- ^{15}N) ao substrato fermentativo.* Para obtenção de vinhaça- ^{15}N foram testados dois procedimentos através do processo fermentativo de caldo de cana-de-açúcar: adição de s.a.- ^{15}N ao mosto fermentescível e fermentação

com lêvedo previamente marcado com ^{15}N na etapa de multiplicação celular.

a-1) *Fermentação cíclica com adição de s.a.- ^{15}N (FESE)*. Foi adicionado ao mosto no início de cada ciclo fermentativo, 0,2 g/l de s.a. enriquecido a 90,39 átomos% ^{15}N (44,5 ppm de N) à dorna de fermentação, até completar sete ciclos, com a reutilização do lêvedo centrifugado, gerando duas fontes simultâneas de enriquecimento da vinhaça: a própria fonte amoniacal e o lêvedo reciclado. Nesses ciclos foi utilizado caldo de cana que apresentou pol de 16,0%, 86,0% de pureza, 18,0% de ART, pH 5,1 e 178,3 ppm de N-total.

a-2) *Fermentação com lêvedo marcado com ^{15}N (FELE)*. Este procedimento foi desenvolvido no Departamento de Química, ESALQ/USP, Piracicaba⁽¹⁾. Aproximadamente 100 mg de lêvedo foi multiplicado num meio de cultivo inicial (11, durante 12hs) sem arejamento, e posteriormente, transferido a meio com aeração (41) em banho-maria (32°C) durante 18 a 20 hs. Durante o período de multiplicação celular (meio com arejamento), foi adicionado por gotejamento 1,5 l de solução de sacarose 15% m/v. Após multiplicado e decantado, o inóculo foi separado por centrifugação (780g/15 min), ressuspenso em água destilada e guardado em geladeira até sua utilização na fermentação. Os meios de cultivo foram previamente esterelizados em autoclave (120°C durante 20 min e 1 atm de pressão) e adicionado 1 g/l de s.a. a 90,39 átomos% ^{15}N e a

(1) Dr. Luis C. Basso - Depto. Química, ESALQ/USP. Comunicação pessoal.

solução nutritiva preparada segundo recomendação do Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz": 1,37 g/l de $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$; 0,24 g/l de $MgSO_4$ anidro; 0,02 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,03 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1 g/l de extrato de levedura. Foram executados três ciclos fermentativos utilizando caldo de cana extraído com prensa hidráulica (250kg/cm²) que apresentou 18,46% de ART, pH 4,7 e teor de 695 ppm de N-total, sem adição de outros nutrientes à dorna que os fornecidos via mosto.

3.1.2. Procedimento de fermentação etanólica para produção de vinhaça-¹⁵N em condições de laboratório.

O procedimento fermentativo utilizado em laboratório foi aquele empregado pelo Departamento de Fermentação da Cooperativa de Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR), Piracicaba⁽¹⁾.

Como substrato fermentescível foi utilizado caldo de cana-de-açúcar extraído com prensa hidráulica automática "Pinette Emidecau" da CODISTIL (250kg/cm²), fornecido pela COPERSUCAR. No procedimento FESE de marcação, foi utilizado lêvedo prensado Fleischmann numa concentração de 30 g/l(m/v), sendo alimentada a dorna (erlenmeyer 2l) com s.a.-¹⁵N; 0,10 g/l de superfostato simples e 0,11 g/l de sulfato de magnésio. A adição de caldo à dorna (700 ml, 31°C), contendo o lêvedo em suspensão (300 ml), foi efetuada por batelada alimentar em intervalos

(1) Dr. Luis Hiroshi - CTC, Piracicaba, S.P. Comunicação pessoal.

regulares de 15 minutos com agitação contínua, e colocada em banho-maria (32°C). Após o término da fermentação (12 a 15 hs), o vinho foi centrifugado a 780g durante 15 minutos e destilado para a obtenção da vinhaça a metade do volume inicial. O lêvedo centrifugado foi ressuspensão em água acidulada a pH 2,5 até sua nova utilização.

No procedimento FELE, na suspensão do inóculo contido na dorna (120 ml) foi adicionado 300 ml de caldo por batelada alimentar, determinando uma concentração do lêvedo em torno de 9,0% (m/m) e destilando o vinho a 1/3 do volume inicial para a obtenção de vinhaça-¹⁵N. O restante do procedimento fermentativo foi similar ao utilizado no procedimento FESE.

3.1.3. Determinações analíticas dos componentes do processo fermentativo

Para efeito de balanço nitrogenado foram pesados os volumes respectivos dos componentes da fermentação de ambos os procedimentos de marcação.

O etanol do vinho delevurado, foi determinado pelo método de dicromato adotado pelo Instituto de Tecnologia Rural da ESALQ, e por destilação seguida de densitometria eletrônica (densímetro A. PAAR, DMA 46), nos procedimentos FESE e FELE, respectivamente. Os cálculos de eficiência dos ciclos fermentativos levaram em consideração a relação estequiométrica de produção de 64,75 ml de etanol a partir de 100g de açúcares redutores totais (ART) e o rendimento, calculado pela relação do volume de etanol produzido a partir de 100 kg de ART. A concentração de

nitrogênio no inóculo e lêvedo centrifugado foi referida com base em massa seca em estufa a 102°C durante 5 hs.

A determinação de nitrogênio total (Nt) no lêvedo e vinhaça foi efetuada por digestão sulfúrica com peróxido de hidrogênio de acordo com PARKINSON & ALLEN (1975). A seguir os extratos foram destilados, titulados e preparados pelo método de Rittenberg para análise da concentração isotópica de ^{15}N mediante espectrometria de massas, segundo procedimento adotado pela Seção de Isótopos Estáveis do CENA/USP. (TRIVELIN et alii, 1973).

3.1.4. *Composição isotópica do material fermentado.*

Nos componentes: caldo de cana, inóculo, lêvedo centrifugado e vinhaça do procedimento FESE efetuaram-se o fracionamento nitrogenado e a seguir, análise da composição isotópica com a finalidade de verificar a homogeneidade isotópica dessas frações. Uma variação grande dessa composição dificultaria a interpretação de resultados de estudos com a utilização de vinhaça- ^{15}N . De fato, espera-se que a composição isotópica fosse variável nas diferentes frações, devido a própria natureza complexa dos agentes principais da fermentação (caldo e lêvedo), com composição nitrogenada variável (N-proteico, aminas, amidas, vitaminas, amino açúcares, etc), assim como, da dinâmica do próprio processo fermentativo dada a assimilação incompleta dos compostos nitrogenados do mosto pelo lêvedo.

No fracionamento nitrogenado foi adotado o procedimento anteriormente utilizado por LARA et alii, (1990). Foi isolada a fração

denominada N-solúvel (Ns) pela extração com solução de etanol 80% (v/v) em banho maria a 35°C durante 20 minutos, segundo o procedimento de KABAT & MAYER (1967) para determinação colorimétrica de N-amino solúvel. Os extratos foram centrifugados a 780 g durante 10 minutos, e efetuada posterior digestão-destilação Kjeldahl, e análise da concentração isotópica. A fração de N-insolúvel (Ni) foi calculada pela diferença de Ns do Nt, e sua concentração isotópica (B) estimada através da equação de diluição isotópica:

$$Ns (A) + Ni (B) = Nt (C) \quad (1)$$

sendo A e C os valores de concentração isotópica de ^{15}N de Ns e Nt, respectivamente.

A proporção do nitrogênio no componente da fermentação (x = lêvedo centrifugado, inóculo ou vinhaça) proveniente do s.a.- ^{15}N (%NxPF) foi calculado pela expressão geral de diluição isotópica:

$$\% \text{NxPF} = [(at\%^{15}\text{N}_{\text{exc}})_a / (at\%^{15}\text{N}_{\text{exc}})_f] \cdot 100 \quad (2)$$

onde $(at\%^{15}\text{N}_{\text{exc}})_a$ constitui a concentração de ^{15}N da amostra expressa em excesso do isótopo no componente da fermentação obtida, subtraindo-se a abundância de ^{15}N do componente da fermentação (átomos% ^{15}N) à aquela de abundância natural dos componentes correspondentes (0,375 e 0,380 átomos% ^{15}N para o caldo e 0,376 e 0,370 átomos% ^{15}N para o lêvedo, nos procedimentos FESE e FELE, respectivamente.) A expressão $(at\%^{15}\text{N}_{\text{exc}})_f$

constitui a concentração de ^{15}N em excesso da fonte s.a.- ^{15}N , obtida subtraindo os valores absolutos de s.a. (átomos% ^{15}N) dos respectivos valores de abundância natural de ^{15}N nos componentes da fermentação. Tanto para o Nt como para a fração Ns de cada componente, foi calculado esse parâmetro pela expressão acima. Logo, pela diferença em relação ao Nt é possível calcular a proporção e quantidade (% e mg) do nitrogênio nativo no levedo e vinhaça, respectivamente.

3.2. Estudo de perdas gasosas de N da vinhaça- ^{15}N e uréia- ^{15}N em condições de laboratório.

Foram utilizadas amostras de terra seca ao ar tamisadas a 2mm, provenientes de áreas com solo latossolo roxo (LR) de textura muito argilosa e podzólico vermelho amarelo (PV) de textura arenosa, da camada 0-20 cm de profundidade, cultivados com cana-de-açúcar, das usinas Santo Antonio e Modelo do Município de Piracicaba, SP. A caracterização físico-química efetuada nos laboratórios da COPERSUCAR consta da Tabela 2. A vinhaça- ^{15}N utilizada neste estudo foi produzida em laboratório de acordo com o procedimento FESE descrito anteriormente. A vinhaça de composição natural de ^{15}N também foi produzida em laboratório. Como complementação nitrogenada foi utilizada uréia comercial granulada (2,1 mm ϕ), sendo que a uréia- ^{15}N (10,253 átomos% ^{15}N) foi produzida (BENDASSOLLI et alii, 1988) e granulada (BENDASSOLLI,1992) no laboratório de produção de isótopos estáveis do CENA/USP. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constando de quatro tratamentos para cada solo incluindo um controle, com três repetições,

Tabela 2. Caracterização física e química da camada arável (0-20 cm) do solo latossolo roxo (LR) e podzólico vermelho-amarelo (PV) (1)

solo	pH água	Textura			Ca	Mg	K	H+Al	T	V	Matéria orgânica
		argila	areia	silte							
		-----%			-----meq/100g TFSA-----			-----%			
LR	5.40	62.5	20.8	16.7	3.23	0.50	0.44	7.20	11.37	36.7	6.65
PV	5.30	8.0	88.4	3.6	1.19	0.57	0.19	2.71	4.66	41.9	1.48

(1) Análises realizadas nos laboratórios da Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR)

como detalhado a seguir:

T_0 = controles sem aplicação de vinhaça e uréia

T_1 = incorporação da uréia- ^{15}N (U^*) a 2,0 cm de profundidade na dose média de 81,0 mg N/vaso (equivalente 100 kgN/ha).

T_2 = aplicação superficial da vinhaça- ^{15}N (V^*) na dose média de 87ml/vaso (3,7mgN/vaso, equivalente 100 m³/ha). Os solos LR e PV receberam as vinhaças correspondentes aos 4^o (V^*_4) e 5^o (V^*_5) ciclo fermentativo, respectivamente. (Ver Tabela 6).

T_3 = Complementação com uréia após quatro dias de aplicação da vinhaça, simulando na medida do possível, a aplicação do adubo na época do trato cultural da soqueira. Este tratamento foi subdividido em dois subtratamentos com utilização da fonte alternativa marcada: $V^* - U$ e $V - U^*$, utilizando V^*_7 e V^*_3 (média de 4,0mgN/vaso) nos solos LR e PV respectivamente, e vinhaça com abundância natural de ^{15}N (V_0 , 3,8 mgN/vaso). (Ver Tabela 6).

Foi adicionado 250 g de TFSA dos solos à câmaras de plástico acondicionadas para avaliar perdas de nitrogênio por volatilização, constituindo-se em um sistema fechado com arraste de ar isento de amônia ($1,3 \pm 0,1$ l/min) do tipo utilizado por MILLS et alii (1974). A terra foi umedecida com volumes equivalentes de vinhaça e água deionizada segundo o tratamento. A uréia foi incorporada simultaneamente em todos os tratamentos, retirando-se a camada superficial de 2 cm de terra correspondente. No subtratamento $V - U^*$, foi adicionado 57 ml de vinhaça V_0 e completado o volume com água para aplicar quantidade equivalente de nitrogênio às vinhaças- ^{15}N . O ar arrastado através das câmaras foi passado

através de solução diluída de H_2SO_4 padronizado, sendo efetuadas trocas das soluções a intervalos de 12 a 48 hs durante o período de 17 dias de incubação. Nas coletas parciais foi determinada amônia pelo método fenol-hipoclorito adotado de WEATHERBURN(1967). Os extratos correspondentes de cada tratamento foram juntados, concentrados até volume de 30 a 50 ml, mediante evaporador rotatório, e efetuado por separado, digestão-destilação Kjeldahl para determinação de N-volatilizado total (N_{vt}) e destilação simples para determinação do $N-NH_3$ volatilizado ($N-NH_{3v}$). Posteriormente, as amostras foram preparadas pela via úmida Rittenberg, para análise de concentração de ^{15}N mediante espectrometria de massas.

A análise conjunta dos subtratamento ($V^* - U$ e $V - U^*$), baseada na determinação de nitrogênio e a correspondente concentração isotópica dos extratos, permitiu discriminar as perdas nitrogenadas para cada solo, em termos de sua procedência: fonte nitrogenada (proveniente da vinhaça (PV) ou proveniente da uréia (PU)), assim como, de sua natureza: origem orgânica e/ou amoniacal. As seguintes relações foram utilizadas na estimativa do balanço nitrogenado das perdas:

Do extrato digestão-destilação, do subtratamento $V^* - U$:

$$N_{vt} = N_{vt}PV + N_{vt}PS$$

e do extrato por destilação desse mesmo subtratamento:

$$N-NH_{3v} = N-NH_{3v}PV + N-NH_{3v}PS \quad (4)$$

Dos extratos correspondentes ao subtratamento V - U* são obtidas expressões equivalentes:

$$N_{vt} = N_{vt}PU + N_{vt}PS \quad (\text{extrato digestão-destilação}) \quad (5)$$

e

$$N-NH_{3v} = N-NH_{3v}PU + N-NH_{3v}PS \quad (\text{extrato destilação}) \quad (6)$$

sendo estimadas a seguir as perdas amoniacais totais:

$$N-NH_3VT = N-NH_{3v}PV + N-NH_{3v}PU + N-NH_{3v}PS \quad (7)$$

e o nitrogênio orgânico volátil (N-org.vol.):

$$N\text{-org.vol.}(PX) = N_{vt}(PX) - N-NH_{3v}(PX) \quad (8)$$

onde o X pode ser da fonte (U e V) ou do solo (S) e, portanto, a seguir pode-se calcular o balanço geral das perdas:

$$\text{Balanço perdas (mg/vaso, \%)} = N-NH_3VT + N\text{-org.vol.}(PX) \quad (9)$$

Nas amostras de terra foi determinado o nitrogênio volatilizado total proveniente da fonte nitrogenada marcada ($N_{vt}PF$, mg/vaso) ao final do período de incubação, pelo método indireto de balanço- ^{15}N segundo a expressão:

$$N_{vtPF} \text{ (mg/vaso)} = N_{aF} \text{ (mg/vaso)} - N_{SPF} \text{ (mg/vaso)} \quad (10)$$

onde N_{aF} corresponde a fonte- ^{15}N adicionada e N_{SPF} ao nitrogênio no solo proveniente da fonte- ^{15}N . Esse parâmetro, por sua vez, foi determinado usando a mesma expressão indicada anteriormente (2) e as concentrações naturais de ^{15}N , já citadas, dos solos utilizados neste estudo. Nos tratamentos que utilizaram vinhaça- ^{15}N foi considerada a concentração isotópica correspondente ao N-total.

A utilização da metodologia isotópica gera terminologia específica ao estudo desenvolvido, sendo necessário explicitar a definição de alguns termos utilizados para facilitar a melhor compreensão do texto (Ver Anexo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo de marcação da vinhaça com o isótopo estável ^{15}N .

4.1.1. Seleção do processo de marcação.

Os ciclos fermentativos dos procedimentos FESE e FELE de marcação mostraram resultados similares em termos de produção média de álcool por ciclo (7,4 e 7,2% v/v), eficiência do processo (78,7 e 79,8%), e rendimento (50,9 e 51,6 litros de etanol/100 kg de ART).

Em virtude da fermentação ter ocorrido normalmente dentro dos padrões de estudos sob condições de laboratório e não constituir objetivo deste estudo, não será procedida a discussão do processo em si.

a-1) Fermentação cíclica com adição de s.a.- ^{15}N (FESE).

Na Tabela 3 é apresentado o balanço de massa de cada ciclo fermentativo. Cabe salientar o aumento expressivo de massa celular (64,13 g, incluindo o levedo residual na dorna) ao final do processo

TABELA 3. Balanço de massa dos ciclos fermentativos correspondentes ao procedimento FESE de marcação de vinhaça com ¹⁵N

Etapa da Fermentação	Componente	Ciclos						
		1	2	3	4	5	6	7
Antes Fermentação	caldo	700,0	700,0	700,0	700,0	700,0	700,0	700,0
	lêvedo fresco ⁽¹⁾	30,0	52,78	54,12	57,77	52,18	52,10	49,50
	conc. celular (%)	2,97	5,15	5,23	5,20	5,17	5,01	4,90
	massa a fermentar	1010,0	1025,0	1035,0	1110,0	1010,0	1000,0	1010,0
Após Fermentação	massa fermentada	979,8	1015,0	1022,8	1070,6	999,8	987,4	997,8
	perda ⁽²⁾	30,2	10,0	12,2	39,4	10,2	12,6	12,2
Centrifugação	vinho delevurado	895,7	917,1	938,8	917,7	925,2	913,7	918,4
	lêvedo centrifugado	62,82	71,15	68,01	67,45	63,99	63,46	58,24
	massa centrifugada ⁽³⁾	959,8	990,0	1007,0	990,6	989,8	977,8	977,8
	resíduo dorna ⁽⁴⁾	20,0	25,0	15,0	80,0	10,0	9,6	-
	sangria lêvedo ⁽⁵⁾	11,35	18,81	11,25	20,78	14,54	14,61	-
	lêvedo reciclado ⁽⁶⁾	52,78	54,12	57,77	52,18	50,10	49,50	-
Destilação	vinhaça	570,0	600,0	535,0	510,0	560,0	550,0	575,0

⁽¹⁾ Massa de lêvedo úmido, sem considerar sua suspensão em água

⁽²⁾ Perda = massa a fermentar - massa fermentada

⁽³⁾ Massa centrifugada = vinho delevurado + lêvedo centrifugado

⁽⁴⁾ Resíduo dorna = massa fermentada - massa centrifugada

⁽⁵⁾ Sangria lêvedo, inclui lêvedo residual da dorna

⁽⁶⁾ Lêvedo reciclado = lêvedo centrifugado - sangria lêvedo

fermentativo do primeiro ciclo, produto da baixa concentração celular utilizada na fermentação. Dado o expressivo teor de nitrogênio do lêvedo, foi utilizada uma concentração de inóculo inferior ao normal para esse processo, o que foi procedido para evitar a diluição isotópica. Porém, como será apreciado na discussão da marcação da vinhaça, este processo foi prejudicado pela expressiva assimilação pelo lêvedo do nitrogênio do s.a.- ^{15}N .

A Tabela 4 apresenta os acréscimos de massa seca do lêvedo (incluindo a massa residual do lêvedo na dorna, procedido para efeito de balanço isotópico), o conteúdo de nitrogênio total, os valores de concentração de ^{15}N , o conteúdo relativo do nitrogênio no lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N (% do total) e em termos de massa (NIPSA). Com base nesses resultados, foi estimado o nitrogênio assimilado pelo lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N (NaIPSA) em cada ciclo fermentativo, pela diferença de NIPSA entre o final (Ffn) e o início (IFn) de cada ciclo. Assim, foi calculada a recuperação total por ciclo e a relativa ao nitrogênio do s.a.- ^{15}N acumulado que foi admitido à dorna.

Pode-se apreciar que o expressivo acréscimo de massa celular registrado no primeiro ciclo fermentativo, como comentado anteriormente, resultou em recuperação acumulada significativa de 82,2% do $^{15}\text{N-NH}_4^+$ no lêvedo, com a correspondente exígua recuperação do N marcado nas vinhaças produzidas e em torno de 2 mg de N com 7,0 átomos % excesso de ^{15}N no sétimo ciclo (Ver Tabela 5).

O balanço nitrogenado nos componentes lêvedo e vinhaça, ao final dos sete ciclos fermentativos, mostrou recuperação média total de

TABELA 4. Massa seca, nitrogênio total, concentração ^{15}N , nitrogênio no lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N (N/PSA) e nitrogênio azulado proveniente do s.a.- ^{15}N (NaPSA), nos 7 ciclos fermentativos do procedimento FESE de marcação da vinhaça- ^{15}N (1)

Ciclo	Massa seca lêvedo		N-Total mg	Conc. ^{15}N at. %exc.	% do total	N/PSA mg	NaPSA mg	Recuperação	
	g							Por ciclo	Acumulado
If ₁	8,64		597,8	-	-	37,1	37,1	-	-
Ff ₁	16,87		694,9	4,808	5,34	37,1	37,1	83,4	-
If ₂	13,88		571,7	4,808	5,34	30,5	-	-	-
Ff ₂	18,60		682,8	8,877	9,86	67,3	36,8	82,7	-
If ₃	13,48		494,4	8,877	9,86	48,7	-	-	-
Ff ₃	17,53		637,7	12,840	14,27	91,0	42,3	95,1	-
If ₄	14,67		533,6	12,840	14,27	76,1	-	-	-
Ff ₄	18,44		656,9	15,592	17,32	113,8	37,7	84,7	-
If ₅	13,20		470,3	15,592	17,32	81,5	-	-	-
Ff ₅	16,13		559,2	18,341	20,38	114,0	32,5	73,0	-
If ₆	12,50		433,3	18,341	20,38	88,3	-	-	-
Ff ₆	16,17		543,3	20,637	22,93	124,6	36,3	81,6	-
If ₇	12,49		419,6	20,637	22,93	96,2	-	-	-
Ff ₇	14,86		519,3	22,437	24,93	129,5	33,3	74,8	82,2

(1) Valores médios de duas repetições

TABELA 5. Nitrogênio total, concentração de ^{15}N e nitrogênio na vinhaça proveniente do s.a.- ^{15}N (NvPSA) nos sete ciclos experimentativos do procedimento FESE de marcação da vinhaça- ^{15}N (1)

Ciclo	N-total mg	Conc. ^{15}N at. % exc.	% do total	NvPSA mg	Recuperação	
					Por ciclo	Acumulada
Ff ₁	25,2	2,485	2,76	0,7	1,6	-
Ff ₂	27,0	3,953	4,39	1,2	1,6	-
Ff ₃	22,5	5,105	5,67	1,3	1,4	-
Ff ₄	21,9	6,207	6,90	1,5	1,2	-
Ff ₅	23,0	6,536	7,26	1,7	1,3	-
Ff ₆	23,1	7,058	7,84	1,8	1,4	-
Ff ₇	29,3	7,146	7,94	2,3	1,6	3,4

(1) Valores médios de duas repetições

86,0% do nitrogênio do s.a.- ^{15}N (Tabelas 4 e 5), sendo que o restante não recuperado poderia ter permanecido como material nitrogenado em suspensão no vinho, precipitado na centrifugação, perdido como componente volátil na destilação do vinho (etapa de obtenção da vinhaça). Pode ainda ter sido devido a erros na determinação da massa do lêvedo centrifugado, que submetido a determinação do nitrogênio total por digestão-destilação tomou como referência a massa seca em estufa. Estudos de fermentação que venham utilizar esse traçador, devem considerar esses aspectos metodológicos para efeito de balanço nitrogenado.

A caracterização química das vinhaças produzidas nos sete ciclos é apresentada na Tabela 6. Com exceção do nitrogênio, os teores dos outros nutrientes e da matéria orgânica são similares as vinhaças de mosto de caldo produzidas industrialmente. A relação C/N revelou-se muito alta, devido ao baixo teor de nitrogênio que, por sua vez, foi consequência da baixa concentração de N no caldo.

a-2) Fermentação com lêvedo enriquecido com ^{15}N (FELE)

O balanço de massa correspondente aos três ciclos é apresentado na Tabela 7. Para evitar crescimento significativo da massa celular no processo fermentativo foi utilizada concentração celular em torno de 9,0% de lêvedo previamente marcado com ^{15}N . De fato, no primeiro ciclo somente foi apreciado um acréscimo de 11,9% da massa celular (4,89 g, incluindo a massa residual de lêvedo) com conseqüente benefício na

TABELA 6. Caracterização química das vinhaças produzidas nos procedimentos FESE e FELE de marcação ⁽¹⁾

Procedimento	Ciclo	N	Conc. ¹⁵ N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	M.O.	Relação C/N ⁽²⁾	pH
FESE	V1*	0,044	2,860	0,02	1,92	0,46	0,62	12,10	83,2	-
	V2*	0,045	4,328	0,02	2,04	0,43	0,55	10,16	68,0	-
	V3*	0,042	5,480	0,02	2,04	0,45	0,62	13,20	95,1	-
	V4*	0,043	6,582	0,02	2,40	0,45	0,61	10,64	74,9	-
	V5*	0,041	6,911	0,02	2,16	0,44	0,62	18,36	135,5	-
	V6*	0,042	7,433	0,01	1,68	0,35	0,46	16,85	121,4	-
	V7*	0,051	7,521	0,03	2,28	0,41	0,57	33,02	195,9	-
	V0	0,066	0,365	0,02	1,92	0,55	0,33	14,32	65,6	-
FELE	V1*	0,48	33,012	0,24	2,17	0,28	0,53	-	-	3,8
	V2*	0,62	32,982	0,24	1,73	0,19	0,39	-	-	4,2
	V3*	0,55	23,320	0,22	2,65	0,30	0,58	-	-	4,1

⁽¹⁾ As análises de nitrogênio e da concentração de ¹⁵N foram determinadas na Seção de Isótopos Estáveis e Hidrologia, CENA/USP, sendo efetuadas as outras determinações analíticas na COPERSUCAR.

⁽²⁾ C= M.O./3,306

TABELA 7. Balanço de massa dos ciclos fermentativos correspondentes ao procedimento FELE de marcação de vinhaça com ¹⁵N

Etapa da Fermentação	Componente	Ciclos		
		1	2	3
Antes da Fermentação	caldo	311,78	315,17	316,32
	lêvedo fresco (1)	41,08	41,46	40,64
	conc. celular (%)	9,32	9,20	9,01
	massa a fermentar	440,58	450,69	451,02
Após a Fermentação	massa fermentada	417,18	421,99	423,05
	perda (2)	23,40	28,70	27,97
Centrifugação	vinho delevurado	367,51	372,40	367,07
	lêvedo centrifugado	45,52	43,63	50,96
	massa centrifugada (3)	413,03	416,03	418,03
	resíduo dorna (4)	4,15	5,96	5,02
	sangria lêvedo (5)	4,51	3,62	-
	lêvedo reciclado (6)	41,46	40,64	-
Destilação	vinhaça	205,83	167,07	185,86

(1) Massa de lêvedo úmido, sem considerar sua suspensão em água

(2) Perda = massa a fermentar - massa fermentada

(3) Massa centrifugada = vinho delevurado + lêvedo centrifugado

(4) Resíduo dorna = massa fermentada - massa centrifugada

(5) Sangria lêvedo; inclui lêvedo residual da dorna

(6) Lêvedo reciclado = lêvedo centrifugado - sangria lêvedo

marcação das vinhaças produzidas, como é apresentado a seguir.

Neste processo, foi difícil avaliar a assimilação efetiva do nitrogênio proveniente do s.a.- ^{15}N pelo inóculo na etapa de multiplicação celular, devido a ocorrência de perdas causada por transbordamento do meio aeróbico. Para efeito da estimativa de recuperação do traçador no lêvedo e na vinhaça foi considerado o nitrogênio contido no lêvedo ao início do processo fermentativo, e que correspondeu a 44,6% do N-s.a. utilizado na fase multiplicativa. A caracterização química das vinhaças produzidas nos três ciclos pode ser apreciada na Tabela 6. Pode-se verificar que o teor de nitrogênio dessas vinhaças, resultaram como consequência do teor de nitrogênio presente no caldo utilizado.

Na Tabela 8 pode-se apreciar o conteúdo de nitrogênio do lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N (NIPSA) para os três ciclos executados, o nitrogênio desassimilado (NdPSA), calculado pela diferença dos NIPSA entre o final e início de cada ciclo, constituindo 33,3% do nitrogênio marcado presente no inóculo. No terceiro ciclo o NdPSA pode ter sido subestimado (18,6 mg) em relação ao valor correspondente do nitrogênio marcado detectado na vinhaça (26,1 mg), devido muito provavelmente a erros na referência de massa seca do conteúdo de nitrogênio no lêvedo centrifugado. (Ver Tabela 9)

A comparação dos procedimentos de marcação da vinhaça pode ser apreciada na Tabela 10. O procedimento FELE revelou-se mais favorável, uma vez que apresentou garantida assimilação do traçador pelo lêvedo, eficiente transferência de material nitrogenado marcado do lêvedo a vinhaça, e fermentações mais rápidas sem maiores acréscimos de massa

TABELA 8. Massa seca, nitrogênio total, concentração de ^{15}N , nitrogênio no lúcido proveniente do s.a.- ^{15}N (N/PSA) e nitrogênio desassimilado proveniente do s.a.- ^{15}N absorvido pelo lúcido (NdPSA) nos três ciclos fermentativos do procedimento FELE de marcação da vinhaça- ^{15}N (1)

Ciclo	Massa Seca		N-Total	Conc. ^{15}N	% do total	N/PSA	NdPSA	Desassimilação	
	Lúcido	Lévedo						Por Ciclo	Acumulado
	g	mg	mg	at. % exc		mg	mg	%	%
If1	12,1	769,6	58,094	64,5	496,4	-	-	-	-
Ff1	12,5	832,5	48,462	53,8	447,9	48,5	9,8	-	-
If2	11,3	752,6	48,462	53,8	404,9	-	-	-	-
Ff2	11,4	670,7	41,122	45,7	306,5	98,4	24,3	-	-
If3	10,5	617,8	41,122	45,7	282,3	-	-	-	-
Ff3	12,7	718,6	32,996	36,7	263,7	18,6	6,6	-	33,3

(1) Valores médios de duas repetições

TABELA 9. Nitrogênio total, concentração de ^{15}N e nitrogênio da vinhaça proveniente do s.a.- ^{15}N (NVPSA) nos três ciclos fermentativos do procedimento FELE de marcação da vinhaça- ^{15}N (1)

Ciclo	N-total	Conc. ^{15}N	% do total	NvPSA	Recuperação Por ciclo	Recuperação Acumulado
	mg	at. %exc.		mg	----- %	-----
Ff1	98,8	32,632	36,3	35,9	7,2	-
Ff2	104,2	32,602	36,2	37,7	9,3	-
Ff3	102,5	22,940	25,5	26,1	9,2	20,1

(1) Valores médios de duas repetições

TABELA 10. Comparação dos procedimentos FESE e FELE na marcação de vinhaça-¹⁵N.

Parâmetros	FESE	FELE
Assimilação do traçador pelo levedo	duvidosa	garantida
Acréscimos de massa celular de levedo	altos	baixos
Estratégia de enriquecimento	demorada	rápida
Marcação da vinhaça	baixo	alto
Tempo de fermentação	longo (12-15 h)	rápido (8-10 h)
Ciclo	1,4	8,6
Recuperado total (%)	3,4	20,1
Acumulado		

celular.

Os volumes de vinhaça- ^{15}N produzidos nestas condições podem satisfazer as necessidades de estudos de laboratório e casa de vegetação. A produção de maiores volumes para utilização em estudos sob condições de campo, necessariamente vão requerer a execução de ensaios prévios, dado que a simples extrapolação da experiência de laboratório não é aconselhável.

O procedimento descrito a seguir deve servir como referência para a produção de 200 litros de vinhaça- ^{15}N , considerado volume suficiente para abranger áreas de estudo com 20 m² de superfície (dosagem equivalente a 100 m³/ha). Admitindo-se o aproveitamento de 50% do s.a.- ^{15}N pelo lêvedo na fase de crescimento, para a produção de 6 kg de lêvedo- ^{15}N seriam necessários 270 g de s.a. enriquecido com 30 átomos % de ^{15}N além de outros nutrientes necessários ao processo de crescimento. Posteriormente, a fermentação seria efetuada em dorna contendo 70 litros de mosto de caldo (500 a 600 ppm de N), com concentração celular em torno de 9,0% m/m e efetuando-se ao menos 4 reciclagens do lêvedo, para produzir a vinhaça à razão de 50 litros/ciclo. Esse procedimento poderá resultar em vinhaças, com marcações de 10 até 4 átomos % excesso de ^{15}N , em ciclos consecutivos.

4.1.2. Composição isotópica do material fermentado.

Nas Tabelas 11 e 12 pode-se apreciar os resultados do fracionamento nitrogenado (Ns e Ni) e a respectiva composição isotópica

TABELA 11. Fracionamento nitrogenado nos componentes do processo de fermentação etanólica, segundo procedimento FESE de marcação da vinhaça ^{15}N (1)

Componente	N ₅		N ₁₁		N ₁₂	
	ppm	%	ppm	%	ppm	%
Substratos						
Caldo de cana	23,6	13,2	97,7	54,8	178,3	100,0
Inóculo	9033,6	13,1	2395,8	3,4	57763,2	83,5
1º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1360,8	3,3	1395,9	3,4	38434,7	93,3
Vinhaça	5,4	12,3	27,3	62,0	11,3	25,7
2º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1468,9	4,0	1944,8	5,3	33264,8	90,7
Vinhaça	4,0	9,5	27,3	65,0	10,7	25,5
3º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1277,8	3,5	1202,4	3,3	33895,4	93,2
Vinhaça	4,3	10,2	30,4	72,4	7,3	17,4
4º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1261,9	3,5	1208,5	3,4	33155,4	93,1
Vinhaça	4,4	10,2	26,9	62,6	11,7	27,2
5º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1185,0	3,5	915,0	2,6	32566,6	93,9
Vinhaça	4,1	10,0	24,6	60,0	12,3	30,0
6º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1111,1	3,3	972,2	2,9	31513,9	93,8
Vinhaça	4,3	10,3	25,0	59,5	12,7	30,2
7º Ciclo						
Lévedo centrifugado	1238,0	3,5	1080,5	3,1	32627,7	93,4
Vinhaça	4,8	9,4	24,5	48,0	21,7	42,6

(1) Valores médios de duas repetições

TABELA 12. Concentração isotópica de ^{15}N (átomos % ^{15}N) determinada nas frações de nitrogênio do caldo de cana e inóculo e nos componentes lúcido centrifugado e vinhaça no processo FESE de marcação (1)

Componentes	^{15}N		^{15}N		^{15}N	
	(ppm)	(át. % ^{15}N)	(ppm)	(át. % ^{15}N)	(ppm)	(át. % ^{15}N)
Substratos						
Caldo de cana	121,1	0,370	57,0	0,366	178,3	0,375
Inóculo	11429,4	0,374	57763,2	0,376	69192,6	0,376
1ª Ciclo						
Lúcido centrifugado	2756,7	4,580	38434,7	5,227	41191,4	5,184
Vinhaça	32,7	3,727	11,3	0,351	44,0	2,860
2ª Ciclo						
Lúcido Centrifugado	3413,7	7,048	33264,8	9,479	36678,5	9,253
Vinhaça	31,3	4,496	10,7	3,837	42,0	4,328
3ª Ciclo						
Lúcido centrifugado	2480,2	8,495	33895,4	13,561	36375,6	13,216
Vinhaça	34,7	6,163	7,3	2,233	42,0	5,480
4ª Ciclo						
Lúcido centrifugado	2470,4	9,263	33155,4	16,460	35325,8	15,908
Vinhaça	31,3	7,003	11,7	5,456	43,0	6,582
5ª Ciclo						
Lúcido centrifugado	2100,0	12,202	32566,6	19,137	34666,6	18,717
Vinhaça	28,7	7,484	12,3	5,574	41,0	6,911
6ª Ciclo						
Lúcido centrifugado	2083,3	12,527	31513,9	21,411	33597,2	21,013
Vinhaça	29,3	8,054	12,7	6,000	42,0	7,433
7ª Ciclo						
Lúcido centrifugado	2318,5	14,392	32627,7	23,411	34946,2	22,813
Vinhaça	29,3	8,573	21,7	6,101	51,0	7,521
Valores médios						
Concentração ^{15}N vinhaça			Concentração ^{15}N lúcido			
N total (Nt)			15,166a			
N solúvel (Ns)			9,787b			
N insolúvel (Ni)			15,528a			

(Tukey P > 0,01)

(1) Valores médios de duas repetições

do lêvedo centrifugado e vinhaça produzida, nos sete ciclos fermentativos, segundo o procedimento FESE de marcação.

No lêvedo centrifugado (Tabela 11) pode-se apreciar que a concentração do Nt diminuiu consideravelmente em relação ao nitrogênio do inóculo, devido ao expressivo acréscimo da massa celular que ocorreu no primeiro ciclo.

Em termos relativos, o inóculo sofreu variação na sua composição nitrogenada após o primeiro ciclo fermentativo, mantendo-se estável com o decorrer dos ciclos subseqüentes. O decréscimo nos teores da subfração N-as do lêvedo centrifugado (3,5% em média para os sete ciclos) em relação ao inóculo (13,1%) correspondeu ao respectivo acréscimo na fração Ni (93,1%) em relação ao teor inicial presente no inóculo (83,5%).

Por outra parte, a subfração N-nas não apresentou variação apreciável, permanecendo estável após os ciclos fermentativos. Esses resultados estão indicando que parte importante do Ns do inóculo passou a constituir compostos nitrogenados estáveis (depósitos de proteínas) no lêvedo centrifugado.

Os valores de composição isotópica de ^{15}N das frações de nitrogênio, (Tabela 12) mostra que a marcação do Nt do lêvedo centrifugado, é produto da assimilação do traçador fundamentalmente na fração de Ni. Por sua vez, a fração Ns do lêvedo não mostra acréscimos tão expressivos de marcação ao longo dos ciclos, como na fração Ni sendo muito provável que a subfração N-nas seja a responsável pela marcação mostrada por essa fração, embora não tenha sido possível determina-la

diretamente. Esses resultados são até esperados em termos bioquímicos, evidenciando que o N-amoniaco assimilado passou a formar parte do "pool" protéico do levedo.

A baixa concentração do N-total nas vinhaças- ^{15}N produzidas, (Tabela 11) foi consequência do baixo teor de N do substrato fermentescível. Em termos relativos pode-se observar ainda na Tabela 11, que ocorreu sensível acréscimo da subfração N-nas da vinhaça (61,4% como valor médio dos sete ciclos), em relação ao valor do caldo (54,8%). Pode-se apreciar também que a fração Ns é a mais importante na vinhaça (71,6%, incluindo as frações N-as e N-nas como valor médio dos sete ciclos) em relação a Ni, refletindo também proporção similar ao do caldo que as originaram. A menor importância relativa da fração Ni em relação ao aproveitamento do N-vinhaça pela cana-de-açúcar confirma o observado por NUNES et alii (1981), sugerindo que a fração nitrogenada mais abundante na vinhaça estaria disponível à planta através da ação microbiológica no período da maior exigência pela cultura. Por sua vez, a composição isotópica de ^{15}N (Tabela 12) da fração solúvel (Ns) mostra a semelhança a de Nt. Nessa fração, o próprio N-amoniaco adicionado e não assimilado, como os produtos nitrogenados metabólicos do levedo, podem ser os responsáveis pela marcação observada.

No procedimento FELE de marcação não efetuou-se o fracionamento nitrogenado, uma vez que intencionou-se modificar a metodologia de fracionamento para obter análise da composição isotópica direta das frações segundo indicações do Depto. de Química, ESALQ/USP,

Piracicaba⁽¹⁾. O fracionamento nitrogenado reveste-se de importância na utilização da vinhaça-¹⁵N em estudos a serem realizados.

Os resultados de composição isotópica no lêvedo e vinhaça permitiram também quantificar a distribuição do ¹⁵N-NH₄⁺ ao final da fermentação, em ambos procedimentos de marcação, assim como a distribuição do N-caldo. Ainda mais, o fracionamento nitrogenado permitiu conhecer-se a distribuição do nitrogênio do s.a.-¹⁵N nas frações de N_s e N_i, no lêvedo e vinhaça.

Não foi objetivo deste trabalho, estudar a dinâmica do nitrogênio na fermentação etanólica, mesmo assim, os resultados são apresentados a título de exemplo, como informações valiosas que podem ser extraídas de estudos de fermentação alcoólica que venham a utilizar o traçador com essa finalidade.

4.1.3. Distribuição do nitrogênio do s.a.-¹⁵N e do mosto nos componentes: lêvedo centrifugado e vinho delevurado, da fermentação etanólica.

A Figura 1 mostra a distribuição média do N derivado do s.a.-¹⁵N e do mosto no lêvedo centrifugado e vinho delevurado nos sete ciclos fermentativos, com o procedimento FELE de marcação. O fracionamento nitrogenado realizado, permitiu discriminar nas frações de N_s e N no lêvedo e vinhaça, a distribuição do N-amoniaco marcado

(1) Dr. Luis C. Basso. Dpto. Química, ESALQ/USP. Comunicação pessoal.

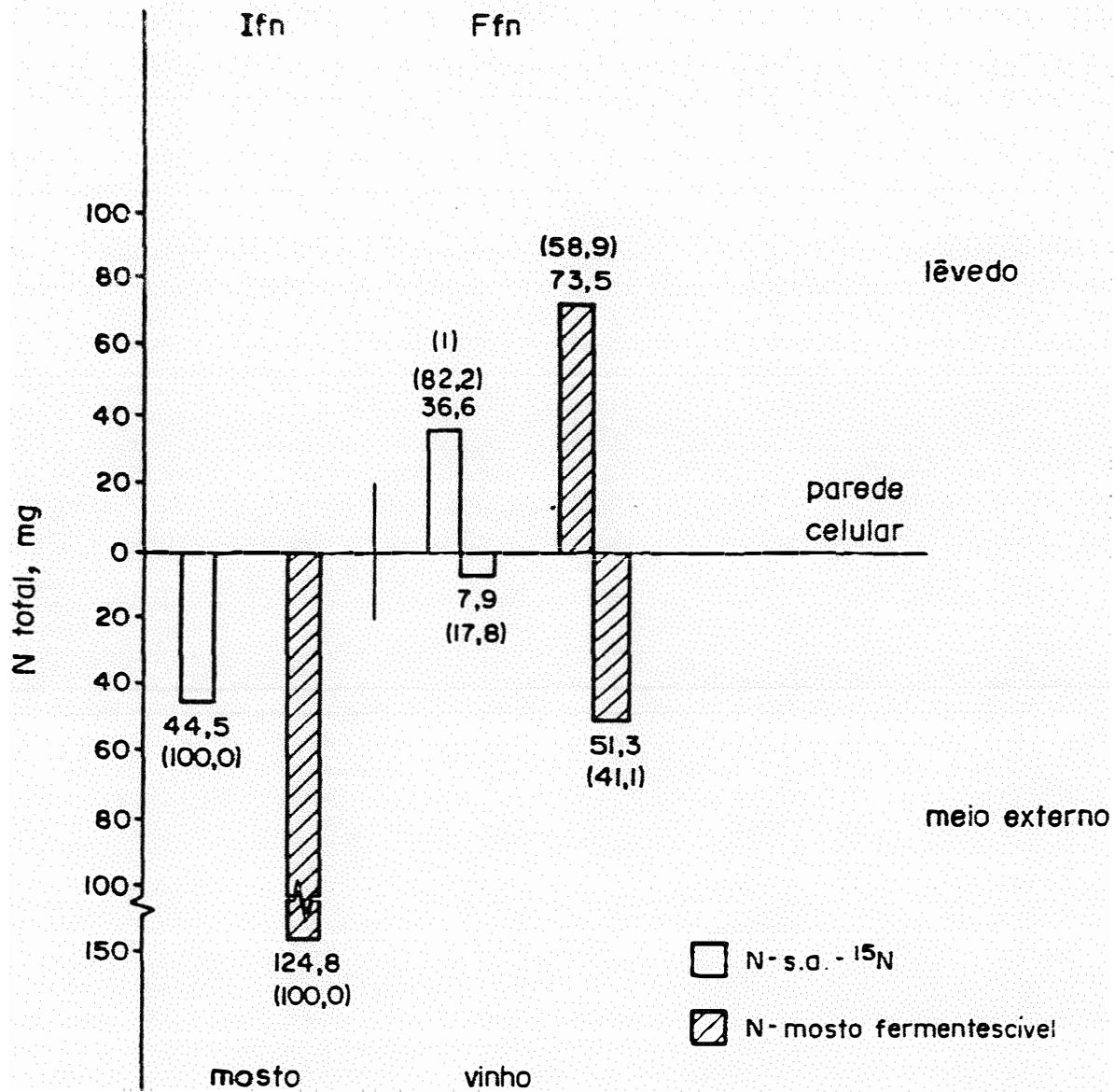


Figura 1. Distribuição do N fornecido à fermentação pelo s.d. - ^{15}N e do mosto no procedimento FESE de marcação da vinhaça - ^{15}N .

(1) - valor expresso em percentagem.

adicionado. No lêvedo por exemplo, pode-se estimar que do total assimilado (36,6 mg de N), 4,9 e 95,1% em média para os sete ciclos ficaram nas frações de N_s e N_i respectivamente, considerando o balanço nitrogenado e isotópico das respectivas frações. O mesmo poderia ser efetuado na vinhaça. Esse tipo de informação pode resultar ainda mais interessante em estudos de cinética da fermentação .

No procedimento FELE pode ser obtida informação como mostra a Figura 2 seguindo a mesma linha de raciocínio. Nesta condição, foi possível avaliar a liberação do N derivado do s.a.-¹⁵N do lêvedo ao vinho apresentando valores de 9,8; 19,8 e 3,7% nos três ciclos consecutivos, a variação do N-nativo do lêvedo nesses ciclos e a distribuição do N do mosto, entre o lêvedo e o vinho delevurado.

4.2. Estudo de perdas gasosas de nitrogênio da vinhaça-¹⁵N e uréia-¹⁵N em condições de laboratório.

As Figuras 3 e 4 mostram as taxas médias diárias de evaporação da água (g/h) e de N-NH₃ volatilizado (μ g/h) nos solos LR e PV, respectivamente, dos tratamentos U* e V-U que mostraram registros mais apreciáveis de perdas. As taxas mais expressivas de evaporação de água ocorreram no segundo dia de incubaao em ambos os solos, tempo esse anterior a aplicação de uréia, sendo verificadas a partir da, taxas decrescentes até 6 e 12 dias nos solos PV e LR, respectivamente. Ao final do experimento, os teores médios de umidade foram de 3,1 (PV) e 7,6%

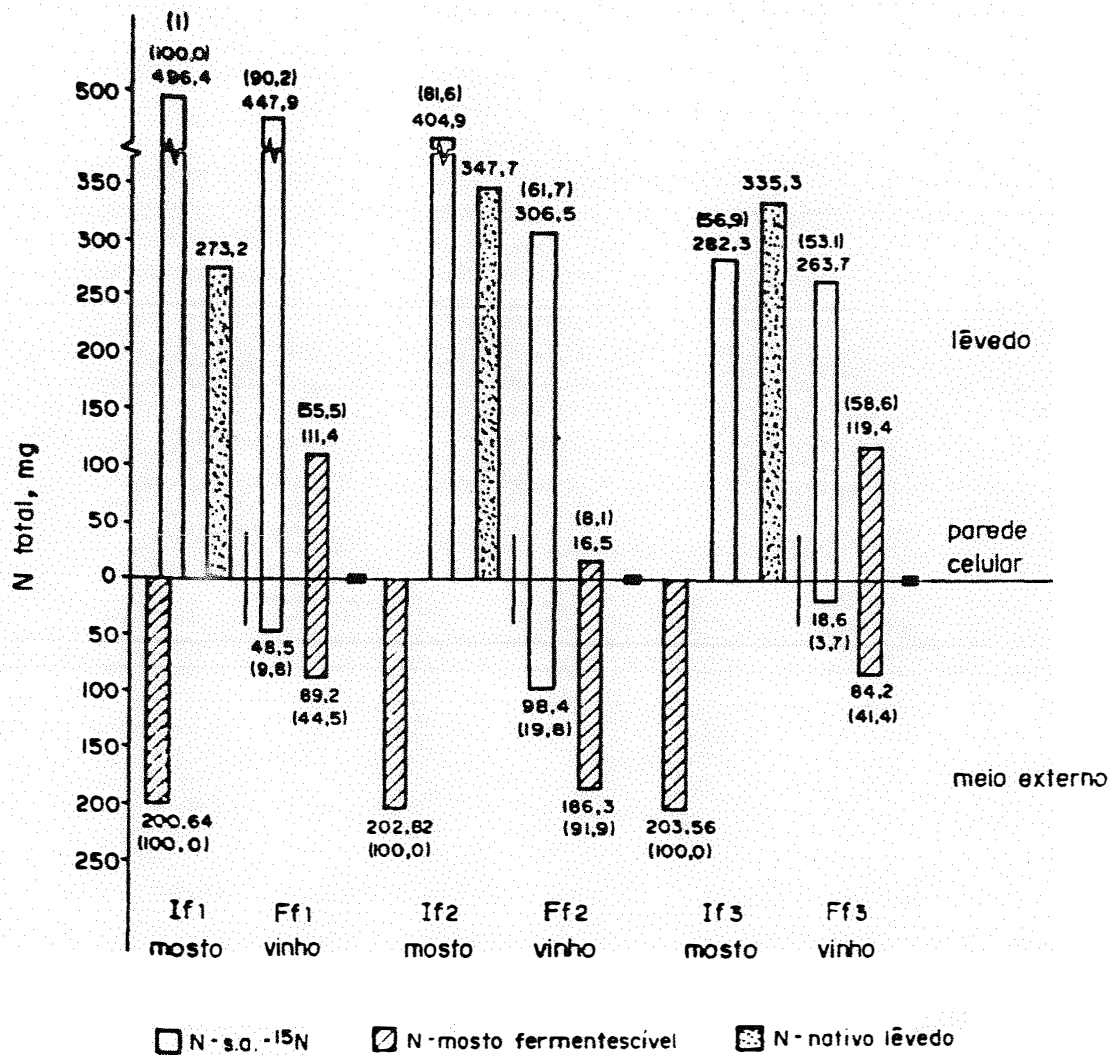


Figura 2 Distribuição do N enriquecido desassimilado pelo lêvedo e do mosto adicionado à fermentação segundo o procedimento FELE de marcação da vinhaça - ¹⁵N.

(I) - valor expresso em percentagem.

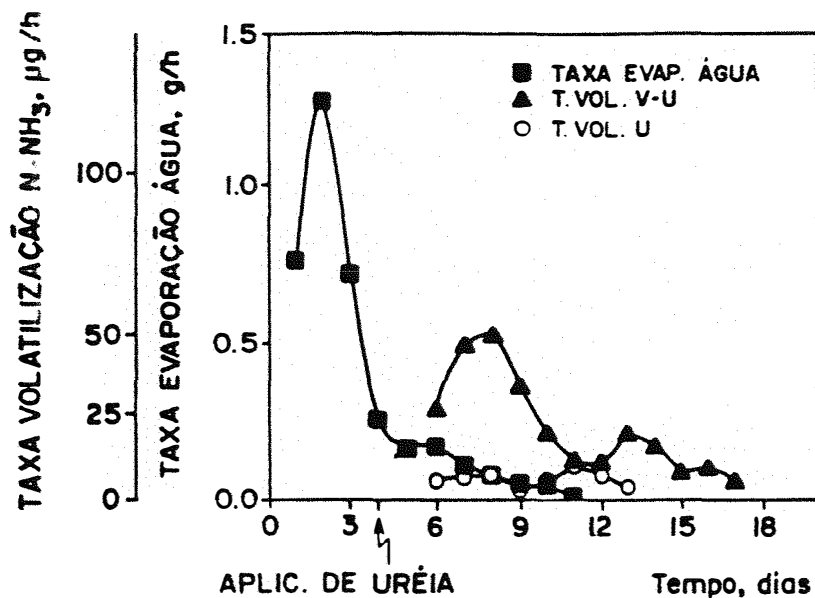


Figura 3: Taxa de evaporação de água e de N-NH₃ volatilizado dos tratamentos com incorporação de uréia e de vinhaça complementada com uréia no solo LR. - valores médios de três repetições.

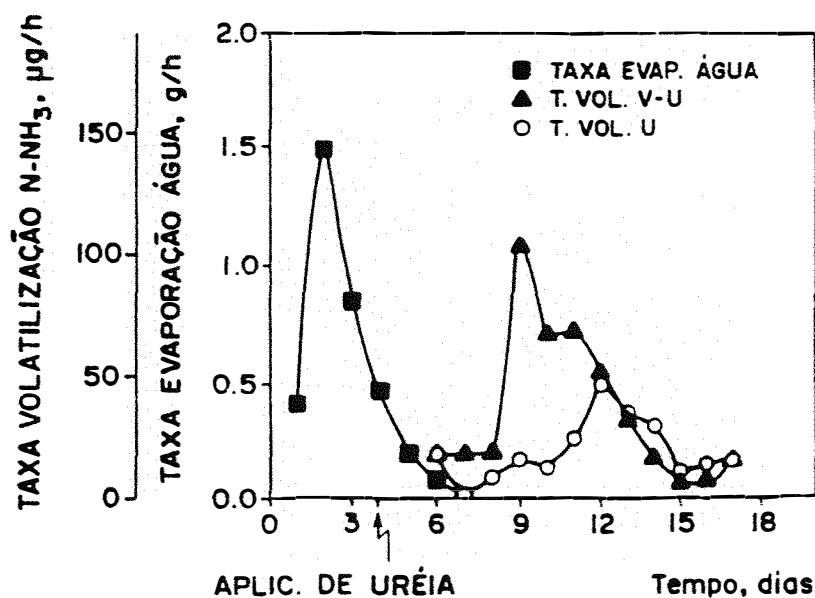


Figura 4: Taxa de evaporação de água e de N-NH₃ volatilizado dos tratamentos com incorporação de uréia e de vinhaça complementada com uréia no solo PV. - valores médios de três repetições.

(LR), valores esses superiores à terra seca ao ar (1,4 e 3,6% m/m). A umidade do ar de arraste das câmaras não foi controlada, podendo ter contribuído para evitar o secamento dos solos.

As taxas de $N-NH_3$ volatilizado do tratamento V-U foram superiores as registradas pelo tratamento U*. Por sua vez, ambos os tratamentos mostraram taxas mais expressivas no solo PV. Vários fatores associados poderiam explicar esses resultados, os quais serão discutidos mais adiante em relação as análises dos extratos. Pode-se apreciar também a defasagem entre os máximos de volatilização de $N-NH_3$ e perdas de água. CHAO & KROONTJE (1964) sugeriram que a evaporação de água pode anteceder as perdas de amônia, uma vez que na solução do solo predomina a forma $N-NH_4^+$ e sua transformação a $N-NH_3$ à fase de vapor é demorada. Essa condição favoreceria o aumento da concentração de amônia na solução do solo, determinando maiores taxas de perdas. McInnes et alii,¹ citados por HARGROVE (1988) mostram resultados coincidentes com os obtidos neste estudo.

Na Tabela 13 pode-se apreciar que entre o tratamento U* e o subtratamento V-U* de cada solo, não foi observada diferença significativa no nitrogênio residual das fontes marcadas (NrSPF). A média dos tratamentos em cada solo, mostrou maior recuperação do nitrogênio das fontes uréia e vinhaça no LR em relação ao PV, evidenciando a

¹McINNES, K.J.; FERGUSON, R.B.; KISSEL, D.E.; KANEMASU, E.T. Field measurements of ammonia loss from surface applications of urea solution to bare soil. *Agron. J. Madison*, 78:192-6, 1986a

TABELA 13. Nitrogênio total do solo (Nt), concentração de ^{15}N , nitrogênio no solo proveniente da fonte marcada (NSPF) e nitrogênio residual no solo proveniente da fonte marcada (NrSPF) (1)

Solos	Tratamentos	Nt mg/vaso	Concentração ^{15}N at. % exc.	NSPF %	NrSPF mg/vaso
IR	U*	576,8a	1,231	12,5a	72,1a
	V*	515,4b	0,053	0,85b	4,4b
	V* - U	572,2a	0,054	0,76b	4,3b
	V - U*	563,3ab	1,218	12,3a	69,3a
	Média	556,9A	-	6,6B	37,5A
PV	U*	173,3a	3,799	38,5a	66,7a
	V*	95,7b	0,272	4,2c	4,0b
	V* - U	162,5a	0,119	2,3d	3,7b
	V - U*	166,6a	3,575	36,2b	60,3a
	Média	149,5B	-	20,3A	33,7B
Controles	IR	485,6	0,377 (2)	-	-
	PV	119,0	0,380	-	-

(1) As médias gerais dos tratamentos dos solos, seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Os valores entre tratamentos de um mesmo solo, seguidos de mesmas letras minúsculas, não diferem entre si. pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

(2) Valores de abundância isotópica natural de ^{15}N dos solos.

importância da textura do solo na retenção de amônia e, como consequência, nas perdas gasosas nitrogenadas.

No tratamento V*, o balanço isotópico mostrou recuperação integral do nitrogênio adicionado via vinhaça. A pequena quantidade adicionada (média de 3,9 mg/vaso), poderia estar mascarando a ocorrência de eventuais perdas, dado que a precisão do método de balanço- ^{15}N é dependente daquela inerente ao método de determinação do N-total no solo por digestão e destilação (2 a 5%). Esse aspecto será discutido com detalhes adiante.

O balanço- ^{15}N permitiu estimar as perdas por volatilização de N da fonte marcada (NvtPF) para os solos, que são mostradas na Figura 5. No LR, as perdas médias estimadas do tratamento U* e subtratamento V-U* foram de 11,2 e 15,3% (9,1 e 13,1 mg/vaso), respectivamente, e para o solo PV foram de 17,5 e 25,2% (14,1 e 21,3 mg/vaso), em relação ao N aplicado. Por outra parte, a determinação do N-total volatilizado efetuada nos extratos que continham o N-NH₃ volatilizado e que foram submetidos a técnica analítica por digestão-destilação (Tabela 14) do subtratamento V-U*, mostrou perda comparativamente inferior à estimada pelo balanço- ^{15}N em ambos solos: 5,67 e 13,1 mg/vaso respectivamente, para o solo LR e 7,65 e 21,3 mg/vaso, para o solo PV. Não deve ser excluída a possibilidade de ter acontecido deficiência na vedação das câmaras, assim como, perdas devido a desnitrificação mostradas por AMARAL SOBRINHO et alii (1983). Entretanto, sob o ponto de vista qualitativo a análise isotópica dos extratos contendo o N-volatilizado forneceu evidências de sua natureza (amoniacal e orgânica), assim como, da fonte nitrogenada

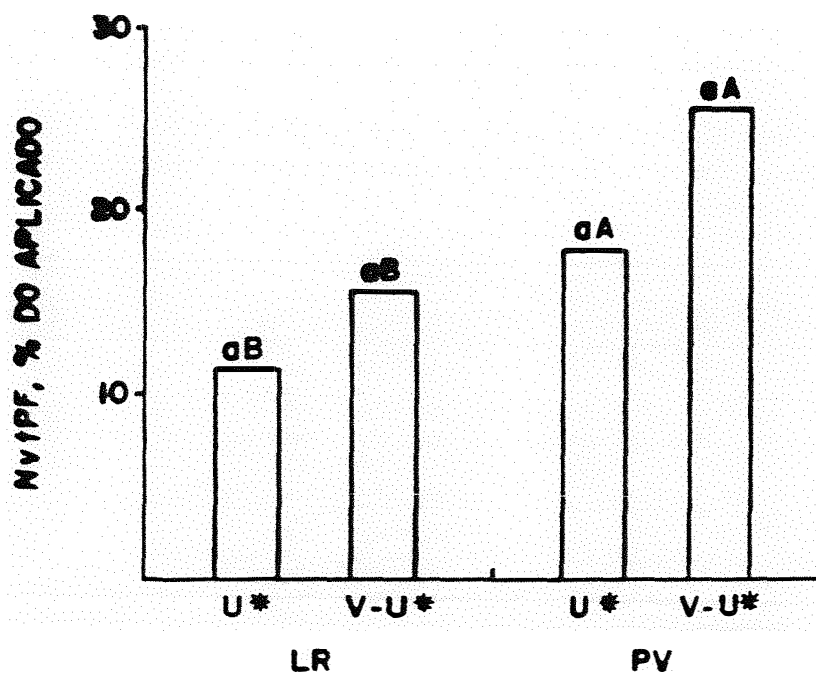


Figura 5: Perdas gasosas de N proveniente da incorporação da uréia (2 cm) e da vinhaça complementada com uréia nos solos LR e PV (1). - Balanço 15N.

(1) As médias dos tratamentos, entre solos, seguidas de letras maiúsculas desiguais diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Os valores entre tratamentos, para cada solo, seguidos das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

TABELA 14. Proveniência do N-volatilizado total (Nvt) do nitrogênio proveniente da fonte (NvtPF) e do solo (NvtPS) para o tratamento com uréia complementada à aplicação da vinhaça (V-U), nos solos LR e PV (1)

Solo	Sub-tratamento	N-Volatilizado					
		Nvt mg/vaso	Conc. ^{15}N at. % exc.	% do total	NvtPF mg/vaso.	% do total	NvtPS mg/vaso
LR	V* - U	10,08a	0,644	9,0b	0,91b	91,0a	9,17a
	V - U*	9,23a	6,069	61,5a	5,67a	38,5b	3,56b
	Média	9,66B	-	35,2A	3,29A	64,7A	6,37A
PV	V* - U	14,56a	0,040	0,8b	0,11b	99,2a	14,45a
	V - U*	11,78a	6,408	64,9a	7,65a	35,1b	4,13b
	Média	13,17A	-	32,8A	3,88A	67,1A	9,29A

(1) Entre os solos, as médias dos tratamentos seguidas de letras maiúsculas desiguais diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Os valores no mesmo tratamento seguidas de letras minúsculas desiguais diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

exógena e do N-nativo do solo.

Na Tabela 14 são também apresentados os resultados do N-volatilizado total nos dois solos, quando a uréia complementou a aplicação da vinhaça. A análise isotópica dos extratos contendo N-volatilizado correspondentes ao subtratamento V*-U, permitiu detectar pequenas perdas de N proveniente da vinhaça (0,91 e 0,11 mg/vaso nos solos LR e PV, respectivamente) em relação ao total volatilizado e que não foram detectadas pelo método de balanço-¹⁵N. Porém, em relação ao N-vinhaça adicionado (4,4 mg/vaso de N-vinhaça no solo LR e 3,7 mg/vaso da vinhaça do 3º ciclo no solo PV) pode-se apreciar que essas perdas foram mais significativas no solo LR (20,7%) em relação ao solo PV (3,0%).

Em relação ao subtratamento V-U*, a análise isotópica dos extratos mostrou perdas maiores da uréia no solo PV, sendo mostrado também pelo método de balanço-¹⁵N. Como em termos do N-volatilizado total as perdas foram significativamente maiores no solo PV, pode-se deduzir que nelas contribuíram o nitrogênio proveniente da uréia e do solo mais efetivamente.

Na Tabela 15 pode-se apreciar os resultados de N-NH₃ volatilizado total (extratos exclusivamente destilados) dos tratamentos U* e V-U correspondentes a cada solo. A comparação estatística das médias dos tratamentos mostra que as perdas foram maiores no solo PV tanto para o total como segundo sua procedência (PF e PS). Como mostrado pelo balanço-¹⁵N, as perdas provenientes da uréia no subtratamento V-U* foram superiores as do tratamento U* e maiores para o solo PV, também confirmado pela determinação colorimétrica nas coletas parciais que

TABELA 15. Procedência no N-NH₃ volatilizado total (N-NH₃v) do nitrogênio proveniente da fonte (NvtPF) e do solo (NvtPS) para os tratamentos com uréia complementando a aplicação da vinhaça (V-U) e da incorporação simples de uréia (U*) nos solos IR e PV (1)

Solo	Tratamento	N-NH ₃ Volatilizado		N-NH ₃ vPS				
		N-NH ₃ vPF	N-NH ₃ vPS					
		N-NH ₃ v	Concent. ¹⁵ N	at. % exc.	% do total	mg/vaso	% do total	mg/vaso
IR	U*	2,48b	2,981		30,2b	0,75b	69,8a	1,73b
	V* - U	5,39a	1,479		20,7b	1,12b	79,3a	4,27a
	V - U*	6,81a	7,139		72,3a	4,92a	27,7b	1,89b
	Média	4,89B	-		41,1B	2,26B	58,9A	2,63B
PV	U*	5,79b	6,534		66,2a	3,83b	33,8b	1,96b
	V* - U	10,28a	0,109		2,1b	0,22c	97,9a	10,06a
	V - U*	10,60a	7,331		74,3a	7,88a	25,7b	2,72b
	Média	8,89A	-		47,5A	3,96A	52,5B	4,91A

(1) Entre os solos, as médias dos tratamentos seguidas de letras maiúsculas designadas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Os valores no mesmo tratamento, seguidos das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade 5%.

permitiram estimar as taxas de $N-NH_3$ volatilizado (Figuras 3 e 4).

Os resultados do subtratamento V*-U vem a confirmar o observado nos extratos de N-total volatilizado, mostrando que a procedência do nitrogênio perdido da vinhaça é de caráter amoniacal. Evidências de perdas nitrogenadas de forma indireta, provenientes da aplicação da vinhaça já tinham sido observadas previamente por LARA et alii (1987), em experimento de campo.

Nas Tabelas 16 e 17 é apresentado o balanço nitrogenado das perdas do tratamento V-U para os solos LR e PV. No solo LR (Tabela 16), a comparação entre os extratos está mostrando que o nitrogênio volatilizado proveniente da vinhaça e da uréia é de procedência amoniacal sendo observada diferença significativa em relação ao nitrogênio procedente do solo (PS). O balanço está mostrando que 51,0% do nitrogênio volatilizado total foi da uréia, 10% proveniente da vinhaça e o 39% restante, proveniente do solo (47,6% de origem amoniacal e 52,4% de origem orgânico volátil).

Admitindo que a proporção relativa dessas perdas tenha sido equivalente a aquela apresentada pelo balanço- ^{15}N , os valores relativos de 51,0; 10,0 e 39,0% corresponderiam às perdas efetivas de 13,1; 2,6 e 10,0 mgN/vaso respectivamente, para uréia, vinhaça e do solo. Em relação ao N aplicado, essas perdas representaram 15,3% para N-uréia e 59,1% do N-vinhaça no solo LR.

Para o solo PV (Tabela 17) a comparação entre os extratos embora tenha mostrado diferença significativa nas perdas do nitrogênio proveniente da vinhaça, estas devem ser avaliadas criteriosamente, dado

TABELA 16. Balanço geral de perdas nitrogenadas do tratamento V-U para o solo IR; segundo sua procedência (da vinhaça, da uréia e do solo) e segundo sua natureza (amoniacal e orgânica).

Sub-Tratamento	Análise do Extrato	N-Volatilizado (1)			TOTAL				
		PF	+	PS					
		mg/vaso							
V*-U	Digestão-Destilação	0,91a		9,17a	10,08a				
	Destilação	1,12a		4,27b	5,39b				
V-U*	Digestão-Destilação	5,67a		3,56a	9,23a				
	Destilação	4,72a		1,89b	6,81a				
		----- Procedência -----							
Balanço Geral de Perdas	Natureza	PV (2)	+	PU (3)	+	PS (4)	=	TOTAL	(%)
								mg/vaso	
	N-NH ₃ v	1,02		5,20		1,89		8,11	(74,4)
	N-org.vol.	-		-		2,08		2,08	(25,6)
	TOTAL (mg/vaso)	1,02		5,20		3,97		10,19	
	% do total	10,0		51,0		39,0		100,0	

(1) Entre os extratos, as médias de cada sub-tratamento, seguidas de letras minúsculas desiguais diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
 (2) N-NH₃vPV corresponde ao valor médio de ambos os extratos
 (3) N-NH₃vPU corresponde ao valor médio de ambos os extratos
 (4) NvtPS = NvtPS (V*-U) - (3); N-NH₃vPS = N-NH₃vPS (V-U*)

TABELA 17. Balanço geral de perdas nitrogenadas do tratamento V-U para o solo PV, segundo sua procedência (da vinhaça, da uréia e do solo) e segundo sua natureza (amomiacal e orgânica)

Sub-Tratamento	Análise do Extrato	N-Volatilizado (1)		
		PF	+ PS	= TOTAL
			mg/vaso	
V*-U	Digestão-Destilação	0,11b	14,45a	14,56a
	Destilação	0,22a	10,06a	10,28a
V-U*	Digestão-Destilação	7,65a	4,13a	11,78a
	Destilação	7,88a	2,72b	10,60a

	Natureza	PV (2)	+ PU (3)	= TOTAL (%)
			Procedência	
			(4) PS	mg/vaso
Balanço Geral de Perdas	N-NH ₃ v	0,17	7,77	11,90 (81,4)
	N-org. vol.	-	-	2,72 (18,6)
	TOTAL (mg/vaso)	0,17	7,77	14,62
	% do total	1,2	53,1	45,7
				100,0

(1) Entre os extratos, as médias de cada sub-tratamento, seguidas de letras minúsculas desiguais diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(2) N-NH₃vPV corresponde ao valor médio de ambos os extratos

(3) N-NH₃vPU corresponde ao valor médio de ambos os extratos

(4) NvtPS = NvtPS (V*-U) - (3); N-NH₃vPS = N-NH₃vPS (V-U*)

que para pequenas quantidades, o método de balanço está sujeito a problemas de precisão analítica. Para efeito de balanço, não foi considerada a existência de diferença significativa, como mostrado em relação a uréia e aos resultados de vinhaça no solo LR. Neste solo, pode-se apreciar que 53,1% e 1,2% das perdas nitrogenadas avaliadas, foram provenientes da uréia e da vinhaça respectivamente, sendo 45,7% proveniente do solo (59,2% de procedência amoniacal e 40,8% de origem orgânico volátil).

Da mesma maneira, a proporção de perdas indicadas corresponderia à perdas efetivas de 21,3; 0,5 e 18,3 mgN/vaso da uréia, vinhaça e do solo, respectivamente. Em relação ao N aplicado, essas perdas representaram neste solo, 25,2% do N-uréia e 13,5% do N-vinhaça.

Características inerentes aos solos estudados, assim como, os conhecidos efeitos da vinhaça aplicada ao solo, podem contribuir para explicar os resultados obtidos. Em solos de textura arenosa e conseqüente baixa CTC, a volatilização de amônia resulta mais significativa (CHAO & KROONTJE, 1964; GASSER, 1964; ANJOS & TEDESCO, 1976 e BURESH, 1987). De fato, MARTINS & BREMNER (1989) encontraram correlações diretas significativas entre a amônia volatilizada e o teor de areia e de caráter inverso, em relação ao teor de silte e argila em diferentes solos. Por outro lado, a vinhaça deve estar contribuindo indiretamente para aumentar essas perdas ao favorecer a hidrólise mais ativa da uréia, pela maior retenção de água no solo (ROSENFELD et alii¹, citados por ORLANDO F^o et alii, 1983)

¹ ROSENFELD, U.; BAPTISTELA, J.R.; LEME, E.J.A. Aplicação de vinhaça por aspersão em Latossol Roxo. In: CONGRESSO NACIONAL DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2, Rio de Janeiro, 1981. Anais. Rio de Janeiro, STAB, 1981. p. 235-48.

e pelo aumento da atividade da urease como seria esperado, pela adição de material orgânico solúvel ao solo. Também a adição de cátions trocáveis contidos na vinhaça: K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} principalmente (NUNES et alii, 1981; 1982 e CAMARGO et alii, 1983) concorrerem com o NH_4^+ proveniente da hidrólise da uréia pelo sistema de troca, sendo transportado pela corrente de evaporação de água até a superfície do solo, entrando no equilíbrio $NH_4^+ \rightleftharpoons NH_3$ na solução do solo e ficando portanto, exposto a perda por volatilização.

Diferentemente da uréia que foi incorporada e favoreceu a expressão das características próprias de cada solo no processo de volatilização, a vinhaça foi aplicada superficialmente resultando em sua menor difusão no solo argiloso, e portanto, dos compostos nitrogenados associados ao material orgânico coloidal da vinhaça. Somado aos efeitos indicados anteriormente, outros processos estariam sendo mais intensamente estimulados no solo argiloso e que favoreceriam a perda do N-vinhaça mais vigorosamente nesse tipo de solo. Conhecido é o aumento da atividade microbiana em solos sob a influência da vinhaça (LEAL et alii, 1983) favorecendo o processo de amonificação por um lado (AMARAL SOBRINHO et alii, 1987) tanto do N-nativo como dos compostos nitrogenados solúveis da própria vinhaça (71,6% em média segundo o fracionamento efetuado neste estudo), assim como do eventual aumento do pH (não determinado) provocado principalmente por reações de redução (que consomem íons H^+) e que se refletem no abaixamento do potencial redox do solo (LEAL et alii, 1983), assim como pela introdução no solo de cátions básicos da vinhaça (NUNES et alii, 1981). Portanto, perdas mais

efetivas por volatilização, assim como, por desnitrificação do N-vinhaça em solos argilosos, poderiam estar contribuindo para favorecer uma resposta mais efetiva das soqueiras de cana-de-açúcar a complementação nitrogenada em solos com conteúdo de argila maior, como sugerido por PLANALSUCAR (1979) e observado em alguns trabalhos (PEREIRA et alii, 1985; ROBAINA et alii, 1984 e SOBRAL et alii, 1987). Obviamente, este estudo que utiliza pela primeira vez de vinhaça- ^{15}N requer da confirmação de outros que venham a utiliza-la num sentido mais amplo. Resulta relevante poder discriminar as fontes de nitrogênio disponíveis para a soqueira no período de maior demanda, produto das interações das diversas fontes (N-solo, N-fixado, N-vinhaça e N-adubo) com o sistema solo-planta, na definição das verdadeiras necessidades de complementação ou substituição nitrogenada, em áreas com aplicação de vinhaça

4.2.1. *Precisão da estimativa do $NrSPV$ (balanço- ^{15}N) e do $NvtPV$ (extratos por digestão-destilação) em relação a variabilidade experimental e de composição isotópica da vinhaça- ^{15}N .*

Embora seja assumido comumente que a distribuição do nitrogênio marcado seja uniforme entre diferentes partes da planta, inclusive dentro de um mesmo tecido, e que sua distribuição dentro da planta seja igual para todos os períodos de crescimento, estas suposições não são válidas como indicado por HAUK & BREMNER (1976). Faz-se necessário portanto, recorrer a partição do nitrogênio entre as diferentes

partes da planta e frações metabólicas em função do tempo. De fato, como indicam esses autores, quando se adiciona material orgânico enriquecido com ^{15}N ao solo, com a finalidade de estudar a decomposição desse material, não é considerada a distribuição heterogênea do ^{15}N entre os constituintes nitrogenados labéis e mais estáveis. Este estudo confirma o observado por esses autores. O fracionamento nitrogenado efetuado na vinhaça com as correspondentes concentrações de ^{15}N no Nt e Ns , determinadas diretamente e da fração Ni estimada pela equação de diluição isotópica, mostraram essa desuniformidade, que foi acentuada nos primeiros ciclos de produção de vinhaça- ^{15}N (Ver Tabela 12). Portanto, foi conveniente explorar os resultados em termos de precisão da estimativa de NrSPV e NvtPV deste estudo, tanto quanto para a variabilidade experimental, como para a variabilidade da composição isotópica de ^{15}N nas vinhaças utilizadas.

Para o balanço- ^{15}N foi efetuada essa comparação nas amostras de terra considerando os resultados individuais de cada unidade experimental, da estimativa do nitrogênio residual no solo proveniente da vinhaça (Ver Tabela 18). Pode-se verificar que a precisão na determinação de NrSPV (C.V. = 15%) resultou principalmente da variação da concentração média de ^{15}N entre as parcelas (C.V. = 10-11%) comparada a do N-total (C.V. = 4,0%). A comparação das médias para essa variável não apresentou diferença significativa, tanto em termos de variabilidade experimental como isotópica nas frações nitrogenadas da vinhaça- ^{15}N . Pode-se constatar também que a variabilidade isotópica não foi diferente da experimental em termos de coeficiente de variação, e que o intervalo de

TABLETA 18. Comparação da variabilidade experimental do tratamento V* nos solos LR e PV em relação a variabilidade de composição isotópica das frações nitrogenadas da vinhaça-¹⁵N na determinação do nitrogênio residual no solo proveniente da vinhaça (Nr-SPV) segundo o balanço-¹⁵N(1)

Tratamento	Vaso	Nt mg/vaso	Conc. ¹⁵ N at. %exc.	Nr-SPV			Média	C.V. %	I.C. (teste t 5%)
				Nt	mg/vaso	NI			
LR-V*	1	530,7	0,059	5,0	4,7	6,2	5,3A	15,0	(3,6-7,0)
	2	524,3	0,052	4,4	4,1	5,3	4,6A	13,6	(3,1-6,2)
	3	491,1	0,047	3,7	3,5	4,6	3,9A	14,9	(2,4-5,4)
Conc. ¹⁵ N fração nitrogenada				(6,205)	(6,626)	(5,079)			
Média				4,4a	4,1a	5,4a			
C.V. (%)				14,9	14,6	14,9			
I.C. (teste T. 5%)				(2,8-6,0)	(2,6-5,6)	(3,4-7,4)			
PV-V*	1	99,7	0,304	4,6	4,3	5,8	4,9A	16,2	(2,9-6,9)
	2	90,9	0,254	3,5	3,3	4,4	3,7A	15,7	(2,2-5,2)
	3	96,6	0,259	3,8	3,5	4,8	4,0A	16,9	(2,3-5,7)
Conc. ¹⁵ N fração nitrogenada				(6,531)	(7,104)	(5,194)			
Média				4,0a	3,7a	5,0a			
C.V. (%)				14,3	14,3	14,4			
I.C. (teste t 5%)				(2,6-5,4)	(2,4-5,0)	(3,2-6,8)			

(1) As médias entre colunas (variabilidade isotópica) seguidas de letras minúsculas iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. As médias entre linhas (variabilidade experimental) seguidas de letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

confiança sugere a provável perda do N-vinhaça na estimativa do balanço- ^{15}N . Por tanto, a utilização neste estudo da concentração de ^{15}N correspondente ao conteúdo de N-total da vinhaça marcada (6,205 e 6,531 átomos % excesso para os solos LR e PV, respectivamente) não representou maior fonte de erros sob o aspecto metodológico.

A análise da precisão analítica da variável NvtPV efetuada nos extratos por digestão-destilação dos subtratamentos V*-U para os solos LR e PV, pode ser apreciada na Tabela 19. O solo LR apresentou variação isotópica significativamente inferior (CV=18%) em relação a variação experimental (C.V.=38%). A comparação das médias do NvtPV não mostrou diferença significativa quando considerada a composição isotópica das diferentes frações do N na vinhaça, sendo que a variação experimental mostrou diferença entre as médias. O intervalo de confiança, por sua vez, está sugerindo a presença de N-volatilizado proveniente da vinhaça, apesar da amplitude do próprio intervalo.

No solo PV foi utilizada vinhaça- ^{15}N proveniente do 3º ciclo fermentativo que apresentou maior variabilidade isotópica que experimental, com menor precisão (C.V.=72,0%) na estimativa de NvtPV. Esta situação exemplifica os cuidados que assinalam HAUK & BREMNER (1976) em relação a material isotopicamente heterogeneo. Resulta difícil neste subtratamento avaliar se a utilização da concentração de ^{15}N correspondente ao N-total da vinhaça tenha sido o mais adequado, quando é desconhecida a precedência das formas do nitrogênio na mineralização. Ainda assim, os intervalos de confiança estão indicando que essas perdas foram menores para o solo LR.

TABELA 19. Comparação da variabilidade experimental do sub-tratamento V⁺-U nos solos LR e PV em relação a composição isotópica das frações nitrogenadas (Nt, Ns e NI) da vinhaça-¹⁵N na determinação do nitrogênio volatilizado total proveniente da fonte (NvtPV) nos extratos por digestão-destilação⁽¹⁾

Sub-Tratamento Vaso	Nvt mg/vaso	Conc. ¹⁵ N at. % exc.	NvtPV			Média	C.V. %	I.C. (teste t 5%)
			Nt	Ns	NI			
LR/V ⁺ -U	1	12,47	0,750	1,31	1,14	1,63	18,3	(0,74-1,98)
	2	9,67	0,656	0,89	0,77	1,11	18,7	(0,49-1,35)
	3	8,11	0,527	0,60	0,52	0,75	18,7	(0,33-0,91)
Conc. ¹⁵ N fração nitrogenada			(7,144)	(8,196)	(5,724)			
Média			0,93a	0,81a	1,16a			
C.V. (%)			38,2	38,5	38,0			
I.C. (teste T. 5%)			(0,04-1,82)	(0,04-1,58)	(0,06-2,26)			
PV/V ⁺ -U	1	17,62	0,044	0,15	0,13	0,42	69,4	(-0,17-+0,63)
	2	13,53	0,035	0,09	0,08	0,26	70,6	(-0,11-+0,39)
	3	12,53	0,040	0,10	0,09	0,27	76,5	(-0,15-+0,49)
Conc. ¹⁵ N fração nitrogenada			(5,100)	(5,783)	(1,853)			
Média			0,11a	0,10a	0,32b			
C.V. (%)			28,4	26,5	28,3			
I.C. (teste t 5%)			(0,03-0,19)	(0,03-0,17)	(0,10-0,54)			

⁽¹⁾As médias entre colunas (variabilidade isotópica) seguidas de letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%. As médias entre linhas (variabilidade experimental) seguidas de letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Do discutido anteriormente, deve-se colocar em evidência que a utilização em futuros estudos de vinhaças- ^{15}N assim como de qualquer material marcado com o traçador, requer que se efetue um prévio fracionamento de seus compostos nitrogenados, a fim de estabelecer o nível de confiança que possa ser obtido com os resultados, evitando com isso problemas que levem a interpretações erradas nesses estudos.

5. CONCLUSÕES

Em relação ao procedimento de marcação da vinhaça com o isótopo ^{15}N os resultados permitiram concluir que:

- O crescimento do lêvedo em meio contendo $^{15}\text{N-NH}_4^+$, antes da sua utilização na fermentação etanólica, apresentou-se como o procedimento mais viável para a produção de vinhaça marcada com o traçador.

Em relação ao estudo de perdas gasosas de N provenientes da aplicação complementar de uréia- ^{15}N em solos com aplicação de vinhaça- ^{15}N , os resultados permitiram concluir que:

- As perdas gasosas do N-uréia foram segundo o método de balanço de ^{15}N de 11,2 e 15,3% respectivamente, quando efetuada sua simples incorporação em relação a complementação da vinhaça no solo LR. No solo PV as perdas respectivas foram de 17,5 e 25,2%.

- As perdas de N-vinhaça com complementação mineral de N-uréia foram de 59,1 e 13,5% nos solos LR e PV, respectivamente.

- A utilização da vinhaça- ^{15}N requer que seja feito o fracionamento nitrogenado e análise da composição isotópica das frações nitrogenadas da mesma, para garantir que essa variabilidade mostre precisão similar a aquela obtida considerando a variabilidade biológica e experimental do estudo.

6. LITERATURA CITADA

ALBUQUERQUE, G.A.C. & MARINHO, M.L. Efeito cumulativo de doses de vinhaça e adubação mineral sobre socas de cana-de-açúcar em Alagoas. Caderno Planalsucar, Piracicaba, 2(3): 11-8, 1984.

ALMEIDA, J.R. de. O problema da vinhaça em São Paulo. Piracicaba, ESALQ, Instituto Zimotécnico, 1952. 9p. (Boletim, 3).

ALMEIDA, J.R. de. Composição, proporção e aplicação da vinhaça. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 3, Piracicaba, 1966. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, 1966 v.2, p. 370-83.

ALMEIDA, M.T.; VICTORIA, R.L.; CERRI, C.C. Destino do nitrogênio aplicado ($^{15}\text{NH}_4$)₂SO₄ como complementação a vinhaça em um solo ácido de Piracicaba, São Paulo. In: COLÓQUIO REGIONAL SOBRE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO, Piracicaba. 1982. Anais. Piracicaba, CENA/USP, 1982. p. 193-6.

ALONSO, O.; GLORIA, N.A. da; GERALDI F^o L.; PAGGIARA, C.M.; CORREA, W.J.; ALBUQUERQUE, F.C. Utilização de diferentes fontes de nitrogênio aplicadas em mistura com vinhaça na adubação de soqueiras de cana-de-açúcar. In CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 4, Olinda, 1987. Anais. Olinda, STAB, 1987. p. 43-5

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X.; LEAL, J.R.; ROSIELLO, R.O.P. Desnitrificação e imobilização de nitrogênio em solo tratado com vinhaça. R. Bras. Ci. Solo, Campinas, 7: 263-8, 1983.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; LUISI, M.V.V.; ROSIELLO, R.O.P.; VELLOSO, A.C.X.; LEAL, J.R. Transformações do nitrogênio mineral em solo podzólico vermelho-amarelo tratado com vinhaça. Pesq. Agrop. bras., Brasília, 22 (3): 249-56, 1987.

ANJOS, J.T. & TEDESCO, M.J. Volatilização de amônia proveniente de dois fertilizantes aplicados em solos cultivados. Científica, Jaboticabal, 4 (1): 49-55, 1976.

BENDASSOLLI, J.A. Produção de grânulos de uréia, uréia e sulfato de amônio e uréia e cloreto de potássio enriquecidos com ¹⁵N. Química Nova, São Paulo, 1992.(No prelo).

BENDASSOLI, J. A.; TRIVELIN P.C.O.; MORTATTI J.; VITORIA R.L. Síntese de fertilizantes nitrogenados enriquecidos com ^{15}N . Parte 2. Síntese da uréia enriquecida com ^{15}N . Energia Nuclear na Agracultura, Piracicaba, 9(2): 94-116, 1988.

BURESH, R.J. Ammonia volatilization from point-placed urea in upland, sandy soils. Fer. Res., Netherlands, 12: 263-8, 1987.

CAMARGO, R. O desenvolvimento da flora microbiana nos solos tratados com vinhaça. Piracicaba, ESALQ, Instituto Zimotécnico, 1954, 44p. (Boletim, 9).

CAMARGO, O.A.; VALADARES, J.M.A.; GERALDI, R.N. Características químicas e físicas de solo que recebeu vinhaça por longo tempo. Campinas, IAC, 1983, 30p. (Boletim Técnico, 76).

CARNAUBA, B.A.A.; VICTORIA R.L.; COSTA, A.C.S. da; TRIVELIN, P.C.O. Efeito da vinhaça na dinâmica do sulfato de amônio- ^{15}N aplicado a um oxisol (LV). Energia Nuclear e Agricultura, Piracicaba, 10(2): 71-82, 1989.

CHAO, T.T. & KROONTJE, W. Relationships between ammonia volatilization, ammonia concentration and water evaporation. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Madison, 28: 393-5, 1964.

COELHO, M.B.; PEIXOTO, M.J.; CALHEIROS, C.B. Uso da fertirrigação com vinhaça por aspersão em cana-de-açúcar e a necessidade da complementação nitrogenada. Saccharum STAB, São Paulo, 9(42): 41-5, 1986.

COPERSUCAR. Aproveitamento da vinhaça: viabilidade técnico-econômica. São Paulo, COPERSUCAR, 1979. 71p.

ESPIRONELLO, A; CAMARGO, A.P.; NAGAI, V.; LEPSCH, I.F. Efeitos de nitrogênio e fósforo como complementação da aplicação da vinhaça em soca de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO NACIONAL DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2, Rio de Janeiro, 1981. Anais, Rio de Janeiro, STAB, 1981. v.1, p.128-39.

GASSER, J.K.R. Some factors affecting losses of ammonia from urea and ammonium sulfate applied to soil. J. Soil Sci., Oxford, 15: 258-72, 1964.

GLORIA, N.A. da & ORLANDO Fº, J. Aplicação da vinhaça: um resumo de discussões sobre o que foi pesquisado, parte 2. Alcool & Açúcar, São Paulo, 4(15): 22-31, 1984.

GLORIA, N.A. da; FONTANARI, N.; ALONSO, O.; HENRIQUE, J.L.P.; GERALDI F^o, L.; ALBUQUERQUE, F.C. Complementação nitrogenada de soqueiras de cana-de-açúcar fertilizada com vinhaça. In: CONGRESSO NACIONAL DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 3, São Paulo, 1984. Anais, São Paulo, STAB, 1984. p.74-7.

HARGROVE, W.L. Soil, environment and management factors influencing ammonia volatilization under field conditions. In: Ammonia volatilization from urea fertilizers, Bock, B.R. & Kissel, D.E., ed. Alabama, Nat. Fert. Develop. Center, T.V.A., 1988. p. 17-37 (Bulletin, Y-206).

HAUK, R.D. & BREMNER, J.M. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. Ad. Agron., New York. (28): 219-66, 1976.

KABAT, A.E. & MAYER, M.M. Ninhydrin method for primary amino acids. In THOMAS, C.C., ed Experimental Immunochemistry, 2 ed., Springfield, Charles and Thomas Pub. 1967. p. 560-3.

KIEHL, E.J. Fertilizantes Orgânicos. São Paulo, Ed. Agron. Ceres, 1985, 492p.

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; SILVEIRA, J.A.G. da Distribuição de ¹⁵N-(NH₄)₂ SO₄ complementado no processo de fermentação etanólica nas frações de N-insolúvel e N-solúvel, STAB, Piracicaba, 9 (1/2): 41-4, 1990.

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B.; PICCOLO, M. de C. Volatilização de amônia de uréia-¹⁵N e aquamônia-¹⁵N aplicados na cultura de cana-de-açúcar em condições de campo. In: CONGRESSO NACIONAL DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 4, Olinda, 1987. Anais. Olinda, STAB, 1987. p.50-9.

LEAL, J.R.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X.; ROSIELLO, R.O.P. Potencial redox e pH, variações em um solo tratado com vinhaça. Rev. bras. Ci. Solo, Campinas, 7:251-61, 1983.

MAGRO, J.A.; SILVA, L.C.F.; ZAMBELLO JR, E.; ORLANDO Fº, J. Estudo da complementação mineral da vinhaça na fertilização de cana-de-açúcar com trator de eixo alto. Saccharum STAB, São Paulo, 4 (14): 28-30, 1981.

MARTENS, D.A. & BREMNER, J.M. Soil properties affecting volatilization of ammonia from soils treated with urea. Commun. Soil Sci. Plant Anal. Athens, 20 (15/16): 1645-57, 1989.

MILLS, H.A.; BARBER, A.V.; MAYNARD, D.N. Ammonia volatilization from soils. Agron. J., Madison, 66: 355-7, 1974.

MONTEIRO, H.; PEXE, C.A.; STUPIELLO, J.P. Emprego da vinhaça complementada com nitrogênio e fósforo em soqueira de cana-de-açúcar (Saccharum spp). Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 97 (4): 22-7, 1981.

NEVES, M.C.P.; LIMA, I.T.; DÖBEREINER, J. Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. Rev. bras. Ci. Solo, Campinas, 7(2):131-6, 1983.

NUNES, M.R.; LEAL, J.R.; VELLOSO, A.C.X. Efeito da vinhaça na lixiviação de nutrientes do solo. Parte 3. Potássio, cálcio e magnésio. Pesq. agrop. bras., Brasília, 17(3): 371-4, 1982.

NUNES, M.R.; VELLOSO, A.C.X.; LEAL, J.R. Efeito da vinhaça nos cátions trocáveis e outros elementos químicos do solo. Pesq. agrop. bras., Brasília, 16(2): 171-6, 1981.

ORLANDO Fº, J.; ZAMBELLO JR., E.; AGUJARO, R.; ROSETTO, A.J. Efeito da aplicação prolongada da vinhaça nas propriedades químicas dos solos com cana-de-açúcar. Estudo exploratório. STAB, Piracicaba, 1(6): 28-33, 1983.

PARKINSON, J.A. & ALLEN, S.E. A wet oxidation procedure suitable for the determination of nitrogen and mineral nutrients in biological material. Commun. Soil Sci. Plant Anal., Athens, 6(1): 1-11, 1975.

PEIXOTO, M.J.C. & COELHO, M.B. Aplicação da vinhaça diluída em cana-de-açúcar por sistemas de aspersão. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 2, Rio de Janeiro, 1981. Anais. Rio de Janeiro, STAB, 1981. v.1/4, p.177-94.

PEREIRA, V.; GLORIA, N.A. da; MAGALHÃES, P.M. Adubação nitrogenada das soqueiras de cana-de-açúcar fertilizadas com vinhaça. Alcool & Açúcar, São Paulo, 5(20): 28-30, 1985.

PLANALSUCAR. Nutrição e fertilidade. In: Relatório Anual do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar. Piracicaba, Instituto do Açúcar e Alcool. 1979, 44p.

ROBAINA, A.A.; VIEIRA, J.R.; BOLSANELLO, J.; MANHÃES, M. Doses e complementação mineral da vinhaça em socas de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 102(1): 26-33, 1984.

RODRIGUES, J.C.S.; PENA, M.J.; MORAES, R.S. Complementação nitrogenada em áreas fertilizadas com vinhaça. In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA, 3, Piracicaba, 1984. Anais, Piracicaba, COPERSUCAR, 1984. p.33-9.

SILVA, L.C.F.; ALONSO, O.; ORLANDO Fº, J.; ZAMBELLO JR., E. Complementação nitrogenada da vinhaça. Parte 2. Formas de aplicação em solo TE. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 98(5): 59-65, 1981.

SILVA, L.C.F.; ALONSO, O.; ZAMBELLO JR., E.; ORLANDO Fº, J. Efeito da complementação mineral da vinhaça na fertilização da cana-de-açúcar. Saccharum STAB, São Paulo, 3(11): 40-4, 1980.

SILVA, G.M.A. & GURGEL, M.N.A. Aplicação de vinhaça como fertilizante em cana-de-açúcar em solo LE, fase arenosa. In: CONGRESSO NACIONAL DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 2, Rio de Janeiro, 1981. Anais. Rio de Janeiro, STAB, 1981. v.1/4, p.140-52.

SILVA, L.C.F.; ZAMBELLO JR., E.; ORLANDO F^o, J. Complementação nitrogenada da vinhaça aplicada por aspersão. In: CONGRESSO NACIONAL DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 2, Rio de Janeiro, 1981. Anais. Rio de Janeiro, STAB, 1981. v.1/4, p.165-76.

SOBRAL, A.F.; LIRA, L.J. de A; GUIMARÃES, V. O. da S. Efeito da suplementação mineral da vinhaça na fertilização da cana-soca. Brasil Açúcareiro, Rio de Janeiro, 106(4): 11-5, 1988.

TAUK, S.M. & RUEGGER, M.S. Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça no município de Corumbatai, SP. Rev. Microbiol., São Paulo, 18(1): 67-76, 1987.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. Preparo de amostras para análise de ¹⁵N por espectrometria de massas. Piracicaba, CENA, 1973. 41p (Boletim Técnico, 2).

VELLOSO, A.C.X.; NUNES, M.R.; LEAL, R.J. Efeito da vinhaça na lixiviação de nutrientes do solo. 1. Nitrato e Amônio. Pesq. agropec. bras., Brasília, 17(1):51-5, 1982.

VIETES, R.L. & BRINHOLI, O. Efeito da aplicação de vinhaça na fração amônio do solo nas profundidades de 20 cm. e 40 cm. Energia Agrícola, Botucatu, 5(4): 11-26, 1990.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reation for determination of ammonia. Anal. Chem., Washington. 39(8): 971-4, 1967.

APÉNDICE : Glossário de Termos.

1. Produção de vinhaça marcada com ^{15}N .

Material marcado com ^{15}N . Substância que contém o isótopo estável numa concentração superior a abundância natural, sem apresentar composição isotópica uniforme entre os diversos compostos nitrogenados. Ex. matéria orgânica marcada com ^{15}N .

Material enriquecido com ^{15}N . Substância que contém o isótopo estável numa concentração superior a abundância natural, apresentando composição isotópica uniforme do composto nitrogenado simples presente na substância. Ex. uréia- ^{15}N .

(NaPSA) Nitrogênio assimilado pelo lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N . Fração absoluta do nitrogênio total do lêvedo assimilado da fonte nitrogenada marcada em cada ciclo fermentativo.

(NdPSA) Nitrogênio desassimilado do lêvedo proveniente do s.a.- ^{15}N . Fração absoluta do nitrogênio total do lêvedo que foi liberado durante o processo fermentativo devido a lise celular, proveniente do aquele que assimilou previamente no processo de multiplicação celular da fonte nitrogenada enriquecida.

(NIPSA) Nitrogênio no lêvedo proveniente do sulfato de amônio- ^{15}N . Corresponde a fração absoluta do nitrogênio total do lêvedo, assimilado da fonte nitrogenada marcada (s.a.- ^{15}N neste estudo) em forma acumulativa nos ciclos fermentativos consecutivos.

(NvPSA) Nitrogênio na vinhaça proveniente do s.a. - ^{15}N . Fração absoluta do nitrogênio total da vinhaça que ficou com o traçador, não sendo assimilado durante o processo fermentativo (procedimento FESE de marcação) ou aquele proveniente do lêvedo previamente marcado (procedimento FELE de marcação).

2. Fracionamento nitrogenado.

(Ni) Nitrogênio insolúvel. Estimado pela diferença entre o N-total do componente determinado por digestão-destilação e N_s .

(Ns) Nitrogênio solúvel. Parte do N-total do componente da fermentação (lêvedo e vinhaça) extraído com solução de etanol 80% (v/v) segundo o procedimento proposto por KABAT & MAYER (1967) e efetuado a seguir digestão-destilação Kjeldahl. Essa fração foi dividida em N-amino solúvel (N-as) determinado colorimetricamente e N-não amino solúvel (N-nas) calculado pela diferença de (Ns) - (N-as).

3. Perdas gasosas de N da vinhaça e uréia.

(NrSPF) Nitrogênio residual no solo proveniente do fertilizante.

Fração absoluta do N-fertilizante enriquecido com ^{15}N presente numa massa de solo determinada.

(NSPF) Nitrogênio no solo proveniente do fertilizante. Proporção relativa do N-fertilizante enriquecido com ^{15}N em relação ao N-total do solo, presente numa massa determinada.

(NvtPF) Nitrogênio volatilizado total proveniente do fertilizante.

Perdas gasosas do N-fertilizante estimadas pela diferença entre o N aplicado e o NrSPF, incluindo perdas na forma de NH_3 como por denitrificação, sempre que as perdas por lixiviação sejam evitadas.