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

Nitrogênio em profundidade – imobilização e recuperação pelo milho

Aline Cristina Richart

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2018

Aline Cristina Richart
Engenheira agrônoma

Nitrogênio em profundidade – imobilização e recuperação pelo milho
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ LAÉRCIO FAVARIN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2018

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

Richart, Aline Cristina

Nitrogênio em profundidade – imobilização e recuperação pelo milho /
Aline Cristina Richart – – versão revisada de acordo com a resolução
CoPGr 6018 de 2011, – – Piracicaba, 2018.

35 p.

Dissertação (Mestrado) – USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”.

1. Desidrogenase 2. Isótopo ¹⁵N 3. Profundidade de fertilização 4.
Respirometria 5. Sistema solo–milho 6. *Zea mays* L. I. Título

Dedicado a:

Meus pais, Alda e Antônio Richart

Meus irmãos Fabiano e Maicon Richart

Meu sobrinho Mateus Richart

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela minha família, por dar-me saúde, força de vontade, fé e sabedoria, que possibilitaram a realização de todas as conquistas durante o mestrado.

Aos meus pais, Alda e Antônio Richart por me educarem e por sempre me darem apoio, incentivo e conselhos para que eu pudesse superar as dificuldades e obstáculos, permitindo que conquistasse mais essa etapa.

Aos meus irmãos Fabiano e Maicon Richart pela motivação, discussões e troca de ideias ao longo de mais essa caminhada, pela nossa união e momentos de alegria que passamos juntos todos esses anos.

Ao professor Dr. José Laércio Favarin pela orientação, estímulo, confiança, compreensão e orientação em todas as etapas dessa pesquisa, por ter acreditado no meu trabalho e nos meus conhecimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida de mestrado.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) pela excelência de ensino e infraestrutura, ao programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, e ao departamento de Produção Vegetal da ESALQ-USP, pelo apoio técnico, científico, material e estrutural em todas as fases do curso, que por meio de seus professores e funcionários, possibilitaram a realização do curso de mestrado. A todo o corpo docente pelos ensinamentos, proporcionando a oportunidade de crescimento pessoal e profissional. A secretária do programa de Fitotecnia Luciane, pelas palavras de apoio, conselhos.

Aos colegas de pós-graduação Laskou, Renan, Pakitão e Vitrola pela colaboração no campo, pelas discussões sobre a pesquisa executada e pelo crescimento pessoal. Com certeza as viagens para Taquarituba e Leme ficaram mais divertidas e menos cansativas com nosso companheirismo e amizade.

Agradeço ao Bruno Cocco Lago, pelo companheirismo, paciência nos momentos difíceis, atenção e palavras de carinho infindáveis, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao Dipé, Thalita, Bobodá, Spiga, Txarli, Kaskta, Tchê, Frida, Mar²one, Paraguaio e Moscardinha, Ana, Jack, pelo companheirismo, paciência, amizade e momentos de descontração, obrigada pelas discussões que nos fizeram crescer e aprender juntos.

Ao professor Dr. Paulo César Ocheuze Trivelin pelo auxílio nas análises laboratoriais, pelas discussões dos dados e ensinamentos transmitidos, proporcionando aprendizado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE-CENA) pela colaboração na análise das amostras. A equipe do LIE-CENA, Hugo H. Batagello, Ana Paula G. de M. Duarte, Miguel Luiz Baldessin, José Aurélio Bonassi pelo auxílio nas atividades laboratoriais, ensinamentos e amizade compartilhados. Ao Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pela estrutura e apoio.

Ao professor Dr. Fernando Dini Andreote pelo auxílio nas análises laboratoriais, pelas discussões dos dados e ensinamento transmitidos.

Aos colegas que se disponibilizaram em me auxiliar no trabalho de campo Ditocujo, Ctrl C, Ctrl V.

Ao Pós-doutor Edilson pela amizade, contribuições e troca de conhecimentos.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do Solo, Denise Mescolotti, Luiz Fernando Baldessin, por toda ajuda e suporte nas realizações das análises em laboratório.

Aos funcionários do laboratório Multiusuário: Edson Moraes e Antônio Neto pela amizade, contribuições e troca de conhecimentos.

As bibliotecárias Eliana M. Garcia e Silvia M. Zinsly pelo trabalho que executam e pela forma como o executam, sempre entusiasmadas, felizes e dispostas a auxiliar os estudantes.

Aos colegas, funcionários e professores de Pós-graduação da ESALQ-USP que convivi durante o período de 2015 a 2018.

A todos aqueles que me auxiliaram direta ou indiretamente nessa etapa de grande crescimento pessoal e profissional, citados ou não aqui.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. CONDIÇÃO EDAFOCLIMÁTICA DA ÁREA EXPERIMENTAL	11
2.2. DESCRIÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL E FERTILIZAÇÃO	12
2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS	13
2.4. AVALIAÇÕES NO SOLO E NA PLANTA	14
2.4.1. <i>Atividade microbiológica</i>	14
2.4.2. <i>Análises isotópicas de ¹⁵N no solo e na planta</i>	14
2.4.3. <i>Biomassa e produção de grãos</i>	16
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3. RESULTADOS	17
3.1. RESPIROMETRIA E ATIVIDADE DA DESIDROGENASE DOS SOLOS	17
3.2. APROVEITAMENTO NO SOLO DO ¹⁵ N DO FERTILIZANTE.....	19
3.3. APROVEITAMENTO DE ¹⁵ N PELO MILHO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS	22
4. DISCUSSÃO	26
4.1. N—FERTILIZANTE ALTERA A ATIVIDADE MICROBIANA NA SUPERFÍCIE DO SOLO	26
4.2. ESTOQUE DE N—FERTILIZANTE É MAIOR NA CAMADA DE SOLO ABAIXO DE ONDE É APLICADO	27
4.3. N—FERTILIZANTE APROVEITADO PELO MILHO INDEPENDE DA PROFUNDIDADE DE APLICAÇÃO	28
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

Nitrogênio em profundidade – imobilização e recuperação pelo milho

O cultivo em semeadura direta (SD) induz acúmulo de matéria orgânica na superfície do solo, fato que pode diminuir a aproveitamento de nitrogênio (N) pelo milho (*Zea mays* L.) decorrente da imobilização, resultado do alto teor de carbono em comparação a quantidade de nitrogênio disponível. Uma das alternativas pode ser o posicionamento profundo do N, priorizando a aplicação do N próximo ao sistema radicular da planta. É comum estudos desta natureza para o fertilizante ureia. No entanto, são escassos os estudos conduzidos com fontes não amídicas, como o nitrato de amônio, e nas condições edafoclimáticas do Brasil. O objetivo foi verificar uma zona de aplicação de N no solo menos ativa microbiologicamente, a qual possibilite aumento do aproveitamento do nitrogênio do fertilizante pela planta (ANF) de milho em comparação a aplicação em superfície, visando orientar o produtor onde se deve aplicar o N–fertilizante. Três experimentos com milho foram conduzidos em campo (Taquarituba nas safras 2015/16 e 2016/17 com solo argiloso e Leme na safra 2016/17 com solo franco–arenoso) comparando a aplicação de N na superfície com duas aplicações em subsuperfície (0,2 e 0,4 m em Taquarituba e 0,1 e 0,2 m em Leme), estado de São Paulo. Os resultados indicaram que a superfície do solo possui maior respirometria e atividade da desidrogenase do que as demais profundidades onde o N foi aplicado, indicando maior atividade microbiológica da superfície do solo em relação às demais profundidades. A aplicação de N–fertilizante na superfície altera a dinâmica desses atributos ao longo de 32 dias de avaliação, assumindo padrões distintos em cada área e ano de cultivo. As variáveis Total do N Fertilizante Aproveitado (TNFA %) e N no Solo Proveniente do Fertilizante (NSPF kg.ha⁻¹) foi maior quando o N foi aplicado na superfície e próximo das zonas onde ocorreu a fertilização do que nas demais profundidades de aplicação de N. Os valores de N total no solo também foram maiores quando o N foi aplicado na superfície em detrimento das aplicações em subsuperfície. Para as variáveis de aproveitamento de N, verificou-se que os tratamentos não foram significativos para ANF, Nitrogênio na Planta Proveniente do Fertilizante (NPPF kg.ha⁻¹), acúmulo de ¹⁵N na biomassa e N nos grãos, bem como a produtividade de grãos. No entanto, o acúmulo de N nos grãos e N total da parte aérea (kg.ha⁻¹) da planta foram elevados quando o N foi aplicado a 0,2 m nos solos de Taquarituba safra 2016/17 em comparação a aplicação a 0,4 m e igual aos valores constatados na superfície; no experimento realizado em Leme safra 2016/17 essas variáveis foram maiores na superfície do solo do que nas demais profundidades de aplicação de N. A aplicação de N em subsuperfície pode ser alternativa para garantir elevado teor de N nos grãos e N total da parte aérea do milho, porém seu efeito nulo no aproveitamento de ¹⁵N–fertilizante pela planta e na produtividade de grãos pode inviabilizar o uso deste manejo. Por isso, experimentos de longa duração devem ser conduzidos para melhor explicar o efeito benéfico do aprofundamento do fertilizante nitrogenado no solo para a cultura do milho.

Palavras–chave: Desidrogenase; Isótopo ¹⁵N; Profundidade de fertilização; Respirometria; Sistema solo–milho; *Zea mays* L.

ABSTRACT

Nitrogen in depth – immobilization and recovery by maize

No-tillage (NT) cultivation induces the accumulation of organic matter in the soil surface, a fact that can reduce nitrogen (N) recovery by maize (*Zea mays* L.) as a function of the immobilization, a result of the high carbon content in comparison to amount of N available. One of the alternatives may be the deep placed of the N, prioritizing the application of the N near the plant root system. Studies in this sense are common for urea fertilizer. However, there are few studies conducted with non-amide sources, such as ammonium nitrate, and in the edaphoclimatic conditions of Brazil. The objective was to verify a N application zone in the soil that have less active microbiologically, which allows an increase of the fertilizer N recovery by the corn plant (FNR) in comparison to the soil surface application, in order to orient the farmers where the N-fertilizer was applied. Three corn experiments were conducted in the field (Taquarituba crop 2015/16 and 2016/17 with clay soil and Leme crop 2016/17 with sandy-loam soil) comparing the application of N on the soil surface with two subsurface applications (0.2 and 0.4 m in Taquarituba and 0.1 and 0.2 m in Leme, state of São Paulo, Brazil). The results indicated that the soil surface had higher respirometry and dehydrogenase activity than the other depths where the N was applied, indicating a higher microbiological activity of the soil surface in relation to the other deep placed. The application of N-fertilizer on the soil surface changes the dynamics of these attributes during 32 days of evaluation, assuming different patterns in each area and year of cultivation. The variables Total N of Recovered Fertilizer (TNRF %) and N in Soil From Fertilizer (NSFF kg.ha⁻¹) were higher when N was applied to the soil surface and near the zones where fertilization occurred than at the other N application deep placed. The values of total N in the soil were also higher when N was applied to the surface than to the subsurface applications. For the N recovery variables, it was verified that the treatments were not significant for FNR, N in Plants From Fertilizer (NPPF kg.ha⁻¹), accumulation of ¹⁵N in biomass and N in the grains, as well as the grains yield. However, the accumulation of N in the grains and total N of the shoots (kg.ha⁻¹) were high when N was applied at 0.2 m in the soils of Taquarituba crop 2016/17 compared to application at 0.4 m and equal to the values found on the surface; in the experiment conducted in Leme crop 2016/17 these variables were higher in the soil surface than in the other depths of N application. The application of N in the soil subsurface can be alternative to ensure high N content in grains and total N in shoots of maize, but its null effect on the recovery of ¹⁵N-fertilizer by the plant and on the grain yield may make the use of this management unfeasible. Therefore, long-term experiments should be conducted to better explain the beneficial effect of the deep placed of N-fertilizer to the soil for maize.

Keywords: Dehydrogenase; Depth of fertilization; Isotope ¹⁵N; Respirometry; Soil-corn system; *Zea mays* L.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Precipitação acumulada a cada quatro dias (mm) durante o cultivo do milho na área experimental em Taquarituba–SP (2015/16 e 2016/17) e Leme–SP (2016/17). As setas pretas indicam o dia em que o solo foi amostrado antes de aplicar o N (dia 0 – controle), as setas verdes indicam os dias em que o solo foi amostrado após a aplicação de N (2, 4, 8, 16 e 32 dias) e as setas azuis indicam a época em que o milho floresceu (R1). 11
- Figura 2. Esquema relativo aos tratamentos (zona de aplicação do fertilizante ^{15}N e ^{14}N) na superfície e em subsuperfície no solo. 13
- Figura 3. Respirometria em razão da profundidade de aplicação do ^{14}N e em relação à época de coleta de solo em Taquarituba – safras 2015/16(a) e 2016/17(b) e Leme 2016/17(c). Nas figuras b e c as letras minúsculas comparam as profundidades de aplicação de N dentro de cada época de coleta do solo, e as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta de solo dentro de cada profundidade. Barras verticais indicam o erro padrão. 17
- Figura 4. Atividade da desidrogenase em razão da profundidade de aplicação do ^{14}N e em função da época de coleta de solo em Taquarituba em 2015/16(a) e 2016/17(b,c) e Leme em 2016/17(d). Nas figuras (a) e (d) letras minúsculas comparam profundidade de aplicação de N dentro de época de coleta e maiúsculas entre épocas de coleta dentro de profundidade. Barras verticais indicam o erro padrão. 18
- Figura 5. N–fertilizante aproveitado no solo (NFAS, %) em três zonas abaixo do local de onde fora aplicado o N para Taquarituba safra 2015/16 (A) e safra 2016/17 (B). Flechas vermelhas indicam profundidade de aplicação do N. Letra minúscula compara o NFAS em cada zona abaixo de onde o N fora aplicado. Barras verticais indicam o erro padrão. 19
- Figura 6. N–fertilizante aproveitado no solo (NFAS, %) em três zonas abaixo do local de onde fora aplicado o N para Leme safra 2016/17. Flechas vermelhas indicam profundidade de aplicação do N. Letra minúscula compara o NFAS em cada zona abaixo de onde o N fora aplicado. Barras verticais indicam o erro padrão. 20
- Figura 7. Total de N–fertilizante aproveitado no solo (TNFA, %) por local de aplicação e acumulado de três zonas (somatório dos valores) das camadas abaixo de onde fora aplicado o N em Taquarituba 2015/16 (A) e 2016/17 (B) e em Leme (C). Letras minúsculas comparam profundidades de aplicação de N. Barras verticais indicam erro padrão. 21
- Figura 8. Total de N aproveitado nos grãos (NTG, a) e na planta – grãos mais parte aérea (NTP, b) e acúmulo de ^{15}N na parte aérea de milho cultivado em Leme (NPA, c), em razão da profundidade de aplicação de N. Letras minúsculas comparam profundidades de aplicação de N. Barras verticais indicam o erro padrão. 22
- Figura 9. N–fertilizante aproveitado pelo milho (NFAMI, %) cultivado em Taquarituba na safra 2015/16 (a), safra 2016/17 (b) e em Leme em 2016/17 (c), em razão da profundidade de aplicação de N. 23
- Figura 10. N total acumulado na planta de milho (NTAP, $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) em Taquarituba na safra 2015/16 (figura a), na safra 2016/17 (b) e em Leme em 2016/17 (c), em razão da profundidade de aplicação de N. NPPF – N no milho proveniente do fertilizante e NPPS – N no milho proveniente do solo. 23
- Figura 11. Acúmulo de N na planta – grãos mais parte aérea de milho (ANP, $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) em Taquarituba na safra 2015/16 (a) e acúmulo de N na parte aérea do milho safra 2016/17 (ANPA, b), acúmulo de N na planta – grãos mais parte aérea em Leme 2016/17 (ANP – c), acúmulo de N–fertilizante na parte aérea e nos grãos (ANFP, %) em Taquarituba na safra 2015/16 (d) safra 2016/17 (e) e acúmulo de N–fertilizante nos grãos em Leme safra 2016/17 (ANFG, $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ – f), em razão da profundidade de aplicação de N no solo. 24
- Figura 12. Biomassa seca de grãos (BG) e biomassa seca da parte aérea (BPA) de milho cultivado em Taquarituba nas safras 2015/16 (a) e 2016/17 (b) e em Leme na safra 2016/17 (c), bem como produtividade de grãos em Taquarituba nas safras 2015/16 e 2016/17 (d) e Leme na safra 2016/17 (e) em razão da profundidade de aplicação de N–fertilizante. 25

1. INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 115 milhões de toneladas de milho (*Zea mays* L.) na safra de 2017 (IBGE, 2018). O cereal exporta, em média, 17 kg de nitrogênio (N) por tonelada de grãos (Raij et al., 1996), para a qual demandaria, aproximadamente, 2 milhões de toneladas de N. Mais de 70% da necessidade do Brasil são provenientes de matérias-primas importadas (ANDA, 2016), é um dos insumos mais usados pelos agricultores, cujo impacto no custo de produção do cereal varia entre 25% e 35% (CONAB, 2018), conforme a fonte utilizada.

O N do fertilizante (N–fertilizante) depois de aplicado no solo pode ser volatilizado (N–NH₃), nitrificação, desnitrificado (N–N_xO e N–N₂), lixiviado e imobilizado pela comunidade microbiana. A perda por volatilização de N–NH₃ varia entre 30% e 80% (Adjetey et al., 1999; Prasertsak et al., 2002; Rees et al., 1997; Tewari et al., 2007; Wu et al., 2017; Yao et al., 2017) e acontece pela aplicação de ureia (N–amídico) na superfície do solo. Na zona de dissolução desse fertilizante o pH pode ser igual a 10 (Nõmmik e Nilsson, 1963), situação em que o amônio (N–NH₄⁺) é transformado em amônia (N–NH₃) – gás volátil. Esta perda é facilmente mitigada por meio da incorporação da ureia no solo, em profundidade entre 0,03 m e 0,1 m (Prasertsak et al., 2002; Rees et al., 1997; Yao et al., 2017). A desnitrificação (N_xO) não é uma perda significativa, ocorre em solos bem drenados e varia entre 2 kg e 5 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ (Fiedl et al. 2016; Subbarao et al. 2006). A lixiviação nos solos tropicais depende especialmente da textura, da dose fornecida do nutriente e água (chuva), porém não ultrapassa a 6% da quantidade aplicada, quando feita entre 80 kg e 180 kg.ha⁻¹ de N (Almeida, 2017; Oliveira, 2018; Portela et al. 2006; Rimski–Korsakov et al. 2012; Wang et al., 2016). Uma das razões para essa perda não ser tão elevada como se acreditava é por que o N é imobilizado pelos microrganismos. A imobilização pode ser considerada uma perda para a cultura recém-fertilizada, considerando-se o mesmo ano agrícola, situação em que o milho recupera entre 27% e 50% da quantidade fornecida (Almeida, 2017; Hancock et al., 2011; He et al., 2013; Liang e Mackenzie, 1994; Oliveira, 2018; Viero et al., 2014).

Na agricultura em semeadura direta (ASD) combinada com a aplicação a lanço de N na superfície do solo pode reduzir ainda mais o aproveitamento do N–fertilizante pelas plantas, em razão da maior comunidade microbiana e acúmulo de C (carbono) oxidável dos resíduos vegetais depositados sobre o solo. A comunidade microbiana nesse sistema de produção, o que potencializa a imobilização de N nativo do solo e do N-fertilizante (Allen e Schlesinger, 2004; Alves et al., 2011; Eagle et al., 2001; Figueiredo et al., 2007; Trannin et al., 2007; Vargas e Scholles, 1998). Resíduos na superfície do solo reduzem a temperatura e a evaporação de água do solo, o qual permanece mais úmido por mais tempo (Favarin et al., 2015), situação favorável a atividade microbiológica. Do exposto, aumentaria a imobilização em prejuízo do aproveitamento do nutriente pela planta. No entanto, pode-se hipotetizar que há uma zona no solo, onde a planta suplantaria a ação microbiana em relação à competição por N e, assim, aumentaria o aproveitamento desse nutriente pela cultura, sem potencializar o risco de lixiviação.

Diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de avaliar a aplicação de ureia em profundidade para reduzir a perda por volatilização (Adjetey et al., 1999; Prasertsak et al., 2002; Rees et al., 1997; Tewari et al., 2007; Wu et al., 2017; Yao et al., 2017). Os resultados indicaram que o aproveitamento de N e a produtividade aumentaram, no entanto, não se pode descartar que esta vantagem auferida se deva, em parte, à diminuição da imobilização do N. Na presente pesquisa, foi utilizado o nitrato de amônio (NH₄NO₃) em diferentes profundidades, a fim de descon siderar o benefício proporcionado pela não volatilização de N aplicado na superfície.

Os agricultores aplicam o N a lanço sem incorporação pela vantagem operacional e econômica. No entanto, esse modo de fornecer o nutriente pode prejudicar o aproveitamento do N (RNF) pelo milho. A RNF tem a

ver com a atividade microbiana, e assim com a localização em profundidade do N–fertilizante, onde o risco de volatilização no caso de ureia e da imobilização, contribuiria para um maior aproveitamento pela planta. Em solo arenoso, com 140 gramas de argila por kg de solo, Almeida (2008) recuperou 63,3 % de 150 kg.ha⁻¹ de ¹⁵N–ureia aplicada em uma única vez, em sulco a 0,12 m de profundidade, na semeadura do milho. No entanto, são raras pesquisas que relacionem a RNF com a profundidade de aplicação de N, sobretudo associada à atividade microbiana no solo.

A respirometria e a atividade da enzima desidrogenase (Ding et al., 2007; Saha et al., 2008) são indicadores da qualidade microbiológica de solos (Shen et al., 2016; Zhu et al., 2016), os quais refletem a perturbação que ocorre no solo pela aplicação de N. A respirometria indica a degradação da matéria orgânica pelos microrganismos por meio da quantidade de gás carbônico (CO₂) (Ding et al., 2007; Song e Zhang, 2009), enquanto a atividade da desidrogenase reflete a atividade oxidativa total da microflora do solo (Liu et al., 2010).

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a aplicação de N–fertilizante em diferentes profundidades no solo em relação ao aproveitamento pelo milho e a produção de grãos por planta, com base na seguinte hipótese: a aplicação de N em subsuperfície – zona menos ativa biologicamente possibilitaria maior aproveitamento de N pela planta, comparativamente à fertilização feita na superfície do solo, onde é mais intensa a atividade microbiana. Ainda, essa zona no solo não deve ser tão profunda a ponto de prejudicar a absorção do N e/ou potencializar a perda por lixiviação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condição edafoclimática da área experimental

Os experimentos foram conduzidos em dois municípios do Estado de São Paulo, sendo Taquarituba e Leme. Em 2015/16 e 2016/17 o milho foi cultivado em Taquarituba (23° 34' 54" S 49° 15' 11" W, ambiente subtropical) a 646 m de altitude, e em 2016/17 também em Leme (22° 10' 23" S 47° 13' 55" W, ambiente tropical) a 620 m de altitude. O clima de Taquarituba pela classificação Köppen é tipo Cfa – chuvas bem distribuídas, verões quentes e temperatura média anual de 22 °C. O clima de Leme pela mesma classificação é tipo Cwa – verões chuvosos, invernos secos e temperatura média anual de 20 °C. Em Taquarituba, houve acumulou de 568 mm de precipitação pluvial em 2015/16 e 809 mm em 2016/17 (Figura 1), enquanto que em Leme houve acumulou de 1186 mm em 2016/17.

Figura 1. Precipitação acumulada a cada quatro dias (mm) durante o cultivo do milho na área experimental em Taquarituba–SP (2015/16 e 2016/17) e Leme–SP (2016/17). As setas pretas indicam o dia em que os solo foi amostrado antes de aplicar o N (dia 0 – controle), as setas verdes indicam os dias em que o solo foi amostrado após a aplicação de N (2, 4, 8, 16 e 32 dias) e as setas azuis indicam a época em que o milho floresceu (R1).

O solo da área experimental de Taquarituba é classificado como Nitossolo Vermelho distrófico típico, com textura argilosa (53% de argila, 27% de silte e 20% de areia, nos primeiros 0,2 m), e da área experimental de Leme como Latossolo Amarelo distrófico típico franco-argilo-arenoso (21% de argila, 7% de silte e 72% de areia, nos primeiros 0,2 m) (Santos, 2013). A análise química do solo para avaliar a fertilidade antes da instalação da pesquisa foi realizada de acordo com a metodologia de Raij et al. (1996) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da análise química de solo antes da instalação dos experimentos nas áreas de Taquarituba-SP (2015/16 e 2016/17) e de Leme-SP (2016/17)

Camada	pH	MO	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	Cu	Fe	Zn	Mn	B
m	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³								%					
<i>Taquarituba 2015/16 (Nitossolo Vermelho textura argilosa)</i>																
0,0–0,2	5,2	37	27	2,1	40	22	2	34	64	98	65	11,0	38,0	0,9	2,1	0,3
0,2–0,4	4,5	21	8	0,6	19	15	8	47	35	82	42	0,6	20,0	0,3	0,9	0,4
<i>Taquarituba 2016/17 (Nitossolo Vermelho textura argilosa)</i>																
0,0–0,2	4,6	32	10	8,0	15	5	7	58	28	86	33	1,0	23,0	0,8	7,0	0,3
0,2–0,4	4,3	23	10	1,3	9	3	9	80	13	93	14	0,5	10,0	0,3	2,0	0,28
<i>Leme 2016/17 (Latossolo Amarelo textura franco-arenosa)</i>																
0,0–0,1	5,2	23	46	4,7	30	7	1	31	42	73	57	2,0	46,0	4,0	2,8	0,5
0,1–0,2	4,0	14	41	1,5	10	3	13	64	15	79	18	1,8	47,0	1,0	0,5	0,3

MO – matéria orgânica; P – fósforo extraído com resina aniônica; Cu, Fe, Zn e Mn – extraídos com DTPA e B com H₂O quente; SB – soma de bases (Ca+Mg+K); CTC – capacidade de troca de cátions (SB+H+Al); V – saturação por bases (SB/CTC x 100).

2.2. Descrição da área experimental e fertilização

A área experimental em Taquarituba foi até junho de 2012 ocupada com pastagem da espécie *Urochloa brizantha*. Com base na recomendação de Raij et al. (1996) foi feita a correção química do solo para o cultivo de soja em 2012/13 e 2013/14, seguida de milho em 2014/15. No primeiro ano do experimento em Taquarituba, o milho foi semeado no dia 28 de outubro de 2015 e colhido no dia 2 de março de 2016, enquanto que no segundo ano semeou no dia 10 de outubro de 2016 e colheu-se no dia 2 de março de 2017. Nas duas safras foi utilizado o híbrido Morgan 30A37PW, com população final de 71 mil plantas por hectare (2015/16) e 73 mil plantas por hectare (2016/17). Na área de Leme, antes da implantação do experimento, por quatro safras seguidas, fora cultivada com milho (safra principal) e tremoço (*Lupinus albus* L.) na segunda safra. O híbrido KWS RB9006 PRO2 foi semeado no dia 23 de outubro de 2016 e colhido dia 20 de março de 2017, com uma população final de 52 mil plantas por hectare.

As doses de nitrogênio (N), fósforo (P₂O₅) e potássio (K₂O) foram definidas com base na recomendação de Raij et al. (1996), em que aplicou-se 70 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ no sulco de semeadura em Taquarituba (2015/16) e Leme (2016/17), enquanto em Taquarituba (2016/17) aplicou-se 100 kg.ha⁻¹ de P₂O₅. Nas duas áreas e nos três experimentos aplicou-se também, 60 kg.ha⁻¹ de K₂O e 120 kg.ha⁻¹ de N ambos em cobertura, no estágio V3, em uma única aplicação.

2.3. Delineamento experimental e tratamentos

Os três experimentos foram instalados em blocos casualizados com parcelas subdivididas, com quatro repetições. Para as avaliações microbiológicas, e cinco repetições para as avaliações de aproveitamento do ^{15}N –fertilizante pelo milho. Os tratamentos foram constituídos pela profundidade de aplicação do fertilizante nitrogenado no solo: T1 – ^{15}N fertilizante na superfície do solo (controle, modo usual dos agricultores), T2 – ^{15}N fertilizante a 0,2 m de profundidade e T3 – ^{15}N fertilizante a 0,4 m de profundidade em Taquarituba (Figura 2). Em Leme, com base nos resultados do primeiro ano da pesquisa em Taquarituba, uma vez que o teor de matéria orgânica do solo era menor, os tratamentos foram modificados: T1 – ^{15}N fertilizante na superfície do solo (controle), T2 – ^{15}N fertilizante a 0,1 m de profundidade e T3 – ^{15}N fertilizante a 0,2 m de profundidade. As subparcelas nos três experimentos representaram as épocas de coleta de solo para as avaliações microbiológicas, as quais foram feitas na época 0 (controle, antes da fertilização nitrogenada), aos 2 dias, 4 dias, 8 dias, 16 dias e 32 dias após a aplicação do ^{14}N . As avaliações de aproveitamento do ^{15}N foram realizadas na maturação fisiológica do milho (estádio R6).

Legenda:

Figura 2. Esquema relativo aos tratamentos (zona de aplicação do fertilizante ^{15}N e ^{14}N) na superfície e em subsuperfície no solo.

A aplicação do ^{15}N –fertilizante foi feita em solução, de uma só vez, com auxílio de seringa para o controle do volume aplicado em toda a microparcela. O volume da solução nitrogenada (10 mL) foi injetado em um tubo de alumínio, a fim de conduzir a solução até a zona determinada (profundidade de aplicação de N), abaixo da linha de milho (Figura 2). Foi utilizado um gabarito de madeira triangular com ângulo e o comprimento definido do tubo de

alumínio de modo que a ponta do tubo chegasse ao local onde deveria ser depositada a solução, ou seja, 0,1 m, 0,2 m e 0,4 m de profundidade (Figura 2). Para a adubação nitrogenada usou-se nitrato de amônio ($^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$), com a fonte amoniacal enriquecida com 5,07 % de átomos de ^{15}N , aplicado manualmente na forma líquida, em dose equivalente a 120 kg.ha^{-1} de N nas plantas da linha central (LC) das microparcels. Cada microparcela era composta por três linhas (1,25 m de comprimento), considerando-se uma linha central e duas linhas adjacentes. O fertilizante normal (^{14}N) foi aplicado nas plantas das linhas adjacentes (LA) na mesma dose, fonte e modo de aplicação. As subparcelas utilizadas para as análises biológicas também foram fertilizadas com ^{14}N . Os solos foram amostrados com uma cavadeira manual, armazenados em isopor com gelo para transporte e, depois, em câmara climatizada a 17°C . As análises biológicas foram feitas em menos de 24 h depois da coleta.

2.4. Avaliações no solo e na planta

2.4.1. Atividade microbiológica

As avaliações referentes às atividades microbianas (respirometria e atividade da enzima desidrogenase) foram realizadas nas amostras de solos das subparcelas dos experimentos. A respirometria indica a degradação da matéria orgânica pelos microrganismos, a qual foi determinada conforme metodologia adaptada por Stotzky (1965). Esse método fundamenta-se na captura e quantificação do CO_2 liberado das amostras de solos frescas e úmidas, com granulometria inferior a 2 mm. Dessas amostras, foram acondicionadas 100 g em frascos de 250 mL hermeticamente fechados, pré-incubados a 27°C por sete dias (fase de estabilização). Depois, foram adicionadas 15 mL de NaOH a 0,5 N em cada frasco e procedeu novamente a incubação a 27°C por mais sete dias, ao final do qual adicionou 1 mL de BaCl_2 e duas gotas de fenolftaleína. O extrato foi titulado com HCl a 0,5 N para quantificar o volume utilizado por estequiometria (Alef et al., 1995). A atividade da desidrogenase foi determinada pelo método descrito por Melo et al. (2010), o qual consiste na extração da enzima das amostras de solo na presença e ausência de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, adicionou-se metanol para quantificar o trifenilformazan (TPF) por colorimetria, com auxílio de espectrofotômetro. Realizou-se o cálculo a partir de uma curva padrão com TPF (Casida et al., 1998).

2.4.2. Análises isotópicas de ^{15}N no solo e na planta

A concentração de ^{15}N no milho foi avaliada na matéria seca da parte aérea e de grãos. Alíquotas de 8 a 12 μg de cada amostra triturada foram acondicionadas em cápsula de estanho, a fim de determinar a abundância de ^{15}N (% em átomos) em espectrômetro de massa acoplado e analisador elementar para N, modelo ANCA–GLS, CERCON Co., UK (Barrier e Prosser, 1996). O aproveitamento do N–fertilizante e N nativo do solo pelas plantas de milho da linha central e pelas plantas adjacentes, foram calculadas de acordo com as equações:

1. N total nos grãos ou na planta milho (NT, kg.ha^{-1}), pela equação:

$$\text{NT} = \frac{\text{N} \times \text{MS}}{100}$$

em que: N corresponde a concentração de nitrogênio na planta (%) e MS a quantidade de matéria seca de milho (kg ha⁻¹);

2. N no milho proveniente do fertilizante (NPPF, kg.ha⁻¹):

$$NPPF = \frac{P - Sp}{F - Sf} \times NT$$

em que: P corresponde a abundância de átomos de ¹⁵N da amostra, Sp é a abundância natural de átomos de ¹⁵N de amostras não marcadas com ¹⁵N, F é a abundância de átomos de ¹⁵N no fertilizante, Sf é a abundância natural de átomos ¹⁵N no fertilizante e NT corresponde ao N total acumulado no milho (kg.ha⁻¹);

3. Aproveitamento do nitrogênio do fertilizante pelo milho (ANF, %) foi determinada como segue:

$$ANF = \frac{NPPF}{QNA} \times 100$$

em que: NPPF corresponde a quantidade de N na planta proveniente do fertilizante (kg.ha⁻¹) e QNA a quantidade de ¹⁵N aplicada como fertilizante (kg.ha⁻¹);

4. N no milho proveniente do solo (NPPS, kg.ha⁻¹):

$$NPPS = NT - NPPF$$

em que: NT corresponde ao N total acumulado pelo milho (kg ha⁻¹) e NPPF corresponde a quantidade de N na planta proveniente do fertilizante (kg.ha⁻¹);

5. N total do solo (NTS, kg.ha⁻¹):

$$NTS = NS \times MSS$$

em que: NS corresponde ao teor de N por profundidade do solo (%) e MSS massa seca do solo das respectivas profundidades (kg.ha⁻¹);

6. Quantidade de N no solo proveniente do fertilizante (QNSPF, kg.ha⁻¹):

$$QNSPF = \frac{ST - S1}{F - S2} \times QNA$$

em que: ST é a abundância de átomos de ¹⁵N no solo do tratamento que recebeu fertilizante marcado, S1 é a abundância natural de átomos de ¹⁵N no solo, F é a abundância de átomos de ¹⁵N no fertilizante, S2 é a abundância natural de átomos de ¹⁵N no fertilizante e QNA corresponde a quantidade de N aplicado (kg.ha⁻¹);

7. N do fertilizante remanescente no solo (NFAS, %):

$$NFRS = \frac{QNSPF}{QNA} \times 100$$

em que: QNSPF corresponde a quantidade de nitrogênio no solo proveniente do fertilizante; QNA é a quantidade de N marcado aplicado como fertilizante (kg.ha⁻¹).

As quantidades de NFAS e QNSPF foram determinadas em três profundidades no solo, amostrado na zona aplicada e em duas zonas abaixo de onde fora aplicado o fertilizante ¹⁵N. No experimento realizado em

Taquarituba (2015/16 e 2016/17) quando aplicou o ^{15}N na superfície do solo, as amostragens foram feitas nos primeiros 0,2 m (zona 1), de 0,2 m a 0,4 m (zona 2) e de 0,4 m a 0,6 m (zona 3). Na aplicação de ^{15}N a 0,2 m de profundidade, as amostragens foram feitas de 0,2 m a 0,4 m (zona 1), de 0,4 m a 0,6 m (zona 2) e de 0,6 m a 0,8 m (zona 3). Finalmente, na aplicação feita a 0,4 m de profundidade, as amostragens foram feitas de 0,4 m a 0,6 m (zona 1), de 0,6 m a 0,8 m (zona 2) e de 0,8 m a 1,0 m (zona 3). No experimento conduzido em Leme adotou o mesmo procedimento, exceto quanto à profundidade de aplicação do ^{15}N , as quais foram feitas na superfície (zona 1 – amostra colhida nos primeiros 0,2 m, zona 2 – amostra de 0,2 a 0,4 m de profundidade e zona 3 – amostra de 0,4 m a 0,6 m de profundidade), na aplicação de ^{15}N na profundidade de 0,1 m (zona 1 – amostra de 0,1 a 0,3 m de profundidade, zona 2 – amostra de 0,3 a 0,5 m de profundidade e zona 3 – amostra de 0,5 a 0,7 m de profundidade), quando aplicou o ^{15}N a 0,2 m de profundidade (zona 1 – amostra de 0,2 a 0,4 m de profundidade, zona 2 – amostra de 0,4 a 0,6 m de profundidade e zona 3 – amostra de 0,6 a 0,8 m de profundidade). Todas as amostras de solo foram submetidas à secagem ao ar e processadas em moinho de bola, para posterior determinação da abundância de ^{15}N (% em átomos).

2.4.3. Biomassa e produção de grãos

Nas plantas colhidas foram separados os grãos da parte aérea (colmo, brácteas, sabugo, pendão e folhas). Depois, essas partes foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 65 °C durante 72 horas. Após a secagem determinou-se a massa seca de cada parte (grãos e parte aérea), as quais foram moídas em moinhos de faca tipo Willey, com peneira de 2 mm de malha. Este material foi usado nas análises para a determinação da abundância de ^{15}N (% em átomos). A produção de grãos por planta (grama.planta^{-1}) foi obtida após a correção da umidade dos mesmos para 130 gramas de água por kg de material (13%).

2.5. Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro–Wilk a 5% de probabilidade de erro. Quando as variáveis não apresentaram distribuição normal os resultados (x) foram transformados por meio da raiz quadrada ($\sqrt{x}$) ou pelo logaritmo ($\log x$). Para distribuição normal era feita a análise de variância pelo teste F a 10% para avaliar a significância da interação profundidade de aplicação de N x tempos de coleta e dos fatores isoladamente. Quando a interação foi significativa realizou-se o desdobramento do fator tempo de coleta dentro de cada profundidade e profundidade dentro de cada época de coleta, comparando as médias pelo teste Tukey a 10%. Nos casos de interação não significativa, mas significância dos fatores isolados aplicou-se o teste Tukey a 10% para comparação de médias. Para as variáveis de aproveitamento de ^{15}N significativas para o teste F, executou-se o teste Tukey a 10% para comparação de médias. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa SAS (SAS, 2008).

3. RESULTADOS

3.1. Respirometria e atividade da desidrogenase dos solos

Na primeira safra 2015/16 de milho em Taquarituba (solo argiloso) a respirometria do solo variou com a profundidade da fertilização nitrogenada (Figura 3a). No segundo ano (2016/17) (Figura 3b) a mesma foi significativa somente para a interação entre a profundidade de aplicação de N e a época de coleta de solo. A respirometria foi maior na superfície do solo em comparação à colocação do nutriente nas profundidades 0,2 m e 0,4 m (Figura 3a, 3b).

Figura 3. Respirometria em razão da profundidade de aplicação do ¹⁴N e em relação à época de coleta de solo em Taquarituba – safras 2015/16(a) e 2016/17(b) e Leme 2016/17(c). Nas figuras b e c as letras minúsculas comparam as profundidades de aplicação de N dentro de cada época de coleta do solo, e as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta de solo dentro de cada profundidade. Barras verticais indicam o erro padrão.

Na segunda safra em Taquarituba (2016/17), os desdobramentos dos fatores indicaram que N–fertilizante na superfície do solo induziu um pico de respirometria no 4º dia depois da aplicação, a qual reduziu no 8º dia, mas se manteve em níveis superiores às avaliações feitas na primeira época (controle, antes de fornecer o N) e na segunda época (dois dias depois de aplicar o nutriente) (Figura 3b). Quando se aplicou N a 0,2 m de profundidade no solo, a respirometria foi maior somente na oitava época (8ª época), diferente do que fora constatada na aplicação feita na superfície. Para a aplicação feita a 0,4 m de profundidade a respirometria foi maior na 8ª época em relação a 16ª época, sem diferir do controle (antes de aplicar o N) e demais épocas (2º, 4º e 23º época) (Figura 3b). Em Leme (solo franco–arenoso), safra 2016/17, a interação também foi significativa para a respirometria, com resultados maiores quando adicionou N na superfície do solo, em relação às demais zonas (0,1 e 0,2 m de profundidade, Figura

3c). Nessa camada, a respirometria diminuiu até a 4ª época, manteve-se constante entre a 4ª época e 16ª época e aumentou novamente na 32ª época (Figura 3c). Essa queda na atividade microbiológica após a aplicação de N não era esperada, até por que a umidade não foi limitante como indica a precipitação pluvial (Figura 1, setas verdes). A respirometria não variou com as épocas de coleta de solo quando o nutriente foi colocado a 0,1 m e 0,2 m de profundidade (Figura 3c).

A atividade da desidrogenase variou na interação entre profundidade de colocação de N e época de coleta em Taquarituba 2015/16 (Figura 4a), o que não se verificou em 2016/17 (Figura 4b, 4c) quando diferiu apenas para a profundidade de aplicação de N. Os resultados de dois anos de cultivo de milho em Taquarituba indicam que a atividade dessa enzima foi superior somente para a aplicação de N na superfície do solo (Figura 4a, 4b). O menor valor para a desidrogenase obteve-se na coleta da 8ª época após o fornecimento do nutriente (Figura 4c). Nas demais profundidades (0,2 e 0,4 m) não houve variação da atividade da desidrogenase com a época de coleta (Figura 4a). Na safra de 2016/17 em Taquarituba verificou-se variação da atividade da enzima com a época, em que a atividade no 8º dia foi inferior a atividade controle – antes de aplicar o N (Figura 4c). Em Leme, a atividade da desidrogenase na interação (profundidade x tempos de coleta) foi significativa (Figura 4d). Na aplicação superficial de N os resultados da atividade enzimática foram iguais na 4ª, 8ª e 16ª época de coleta nas três profundidades, enquanto no controle (antes de aplicar N – época 0), no 2º dia e 32º dia a atividade foi superior na aplicação de N na superfície (Figura 4d). No solo arenoso de Leme percebe-se uma variação enzimática diferentemente do que fora observada no solo argiloso de Taquarituba.

Figura 4. Atividade da desidrogenase em razão da profundidade de aplicação do ^{14}N e em função da época de coleta de solo em Taquarituba em 2015/16(a) e 2016/17(b, c) e Leme em 2016/17(d). Nas figuras (a) e (d) letras minúsculas comparam profundidade de aplicação de N dentro de época de coleta e maiúsculas entre épocas de coleta dentro de profundidade. Barras verticais indicam o erro padrão.

3.2. Aproveitamento no solo do ^{15}N do fertilizante

A quantidade de N–fertilizante aproveitado no solo (NFAS) na zona 1 (primeiros 0,2 m de profundidade), na fertilização feita na superfície foi de 49% (58,2 kg.ha⁻¹), superior a quantidade recuperada na mesma zona (0,2 a 0,4 m de profundidade) na adubação a 0,2 m de profundidade (12%, 14,3 kg.ha⁻¹), mas não diferiu para o N posicionado a 0,4 m (zona 1 – 0,4 a 0,6 m), a qual foi igual a 20% (24,2 kg.ha⁻¹) em Taquarituba (2015/16) (Figura 5A). A NFAS na zona 2 (0,6 a 0,8 m de profundidade) para N aplicado a 0,4 m de profundidade foi maior (23%, 27,3 kg.ha⁻¹) do que nessa zona (0,4 a 0,6 m) na fertilização a 0,2 m de profundidade (5%, 5,3 kg.ha⁻¹) sem diferir da mesma zona (0,2 a 0,4 m) na aplicação superficial (8%, 9,0 kg.ha⁻¹) (Figura 5A). Em Taquarituba 2016/17, a NFAS na zona 1 (primeiros 0,2 m) na adubação superficial foi igual a 29% (34,9 kg.ha⁻¹), superior a quantidade recuperada na mesma zona (0,2 a 0,4 m) na fertilização a 0,2 m de profundidade (7%, 9,2 kg.ha⁻¹), e essa não diferiu do aproveitamento na zona entre 0,4 m e 0,6 m de profundidade para N colocado a 0,4 m abaixo da superfície (4%, 4,9 kg.ha⁻¹) (Figura 5B). Em Leme (Figura 6), a NFAS na zona 1 (primeiros 0,2 m) para aplicação superficial de N foi de 28% (33,8 kg.ha⁻¹) foi superior a NFAS da mesma zona (0,1 a 0,3 m) para a adubação a 0,1 m de profundidade (10%, 12,5 kg.ha⁻¹), e essa não difere da NFAS na mesma zona (0,2 a 0,4 m) para N fornecido a 0,2 m de profundidade (4%, 5,0 kg.ha⁻¹).

Figura 5. N–fertilizante aproveitado no solo (NFAS, %) em três zonas abaixo do local de onde fora aplicado o N para Taquarituba safra 2015/16 (Figura A) e safra 2016/17 (Figura B). Flechas vermelhas indicam profundidade de aplicação do N. Letra minúscula compara o NFAS em cada zona abaixo de onde o N fora aplicado. Barras verticais indicam o erro padrão.

Figura 6. N-fertilizante aproveitado no solo (NFAS, %) em três zonas abaixo do local de onde fora aplicado o N para Leme safra 2016/17. Flechas vermelhas indicam profundidade de aplicação do N. Letra minúscula compara o NFAS em cada zona abaixo de onde o N fora aplicado. Barras verticais indicam o erro padrão.

O total de N-fertilizante aproveitado no solo (TNFA, %) na zona 1 (primeiros 0,2 m – azul), zona 2 (0,2 a 0,4 m – verde) e zona 3 (0,4 a 0,6 m – vermelha) para a aplicação superficial de N, a 0,2 m abaixo da superfície e a 0,4 m de profundidade para Taquarituba estão apresentados na Figura 7A (2015/16) e 7B (2016/17). Na pesquisa feita em Leme, o TNFA para a aplicação superficial de N foi aproveitado nos primeiros 0,2 m (zona 1 – azul), entre 0,2 m e 0,4 m de profundidade (zona 2–verde) e na camada de 0,4 m a 0,6 m (zona 3–vermelha), enquanto para a aplicação de N a 0,1 m, a zona 1 (azul) corresponde a TNFA recuperada entre 0,1 m a 0,3 m, a zona 2 (verde) corresponde a TNFA obtida entre 0,3 m e 0,5 m e a zona 3 (vermelha) a TNFA determinada na camada de 0,5 a 0,7 m de profundidade. Na aplicação de N a 0,2 m da superfície do solo, a TNFA foi determinada na camada entre 0,2 m e 0,4 m (zona 1–azul), entre 0,4 m e 0,6 m (zona 2 – verde) e entre 0,6 m e 0,8 m (zona 3–vermelha). Em Taquarituba (2015/16) o maior valor de TNFA (59%; 70,3 kg.ha⁻¹) obteve-se na aplicação superficial de N em relação ao N posicionado a 0,2 m (22%, 26,7 kg.ha⁻¹), sem diferir da aplicação a 0,4 m de profundidade (39%, 46,8 kg.ha⁻¹) (Figura 7A). Na mesma localidade em 2016/17, o maior valor de TNFA também foi para a aplicação

superficial de N (35%, 42,0 kg.ha⁻¹) em relação à colocação de N a 0,2 m da superfície (13%; 15,3 kg.ha⁻¹), a qual não diferiu do posicionamento de N a 0,4 m da superfície (7,6%, 9,05 kg.ha⁻¹) (Figura 7B). Em Leme, o maior valor de TNFA também foi determinado na aplicação superficial de N (36%, 43,2 kg.ha⁻¹), seguida da aplicação a 0,1 m de profundidade (18%; 21,4 kg.ha⁻¹), sem diferir do N colocado a 0,2 m da superfície (11%, 13 kg.ha⁻¹) (Figura 7C).

Figura 7. Total de N–fertilizante aproveitado no solo (TNFA, %) por local de aplicação e acumulado de três zonas (somatório dos valores) das camadas abaixo de onde fora aplicado o N em Taquarituba (2015/16–A e 2016/17–B) e em Leme (C). Letras minúsculas comparam profundidades de aplicação de N. Barras verticais indicam erro padrão.

3.3. Aproveitamento de ^{15}N pelo milho e produtividade de grãos

A quantidade acumulada de N nos grãos (NTG) e na planta – grãos mais parte aérea (NTP) foram maiores quando aplicou N na superfície e a 0,2 m de profundidade em Taquarituba 2016/17 (Figura 8a, b). No experimento de Leme, o N aproveitado na parte aérea (NPA, figura 8c) também foi superior para a superfície superficial de N e a 0,1 m de profundidade, abaixo da superfície do solo.

Figura 8. Total de N aproveitado nos grãos (NTG, figura a) e na planta – grãos mais parte aérea (NTP, figura b) e acúmulo de ^{15}N na parte aérea de milho cultivado em Leme (NPA, figura c), em razão da profundidade de aplicação de N. Letras minúsculas comparam profundidades de aplicação de N. Barras verticais indicam o erro padrão.

Não houve diferença para o aproveitamento do N–fertilizante pelo milho (% NFAMI) independentemente do ano agrícola e área experimental (Figura 9). Em relação ao N total acumulado na planta (NTAP, kg.ha⁻¹) constituído pela parte proveniente do fertilizante (NPPF) e da parte fornecida pelo solo (NPPS) (Figura 10 a, b, c) também não foram influenciados pela profundidade de fornecimento de N. Também não diferiram o acúmulo de na planta – grãos mais parte aérea (ANP) na safra 2015/16 em Taquarituba (Figura 11a) e em Leme na safra 2016/17 (Figura 11c), acúmulo de N na parte aérea na safra 2016/17 em Taquarituba (Figura 11b), acúmulo de N–fertilizante na planta – grãos mais parte aérea (ANFP) nas duas safras em Taquarituba (Figura 11d, e) e acúmulo de N–fertilizante nos grãos (ANFG, Figura 11f) em Leme na safra 2016/17. Não houve diferença estatística para a biomassa seca de grãos (BG) e biomassa seca da parte aérea em Taquarituba (Figura 12a, b) e Leme (Figura 12c), bem como da produtividade de grãos nas duas áreas (Figura 12d, e) em razão da posição em que o N fora aplicado no solo.

Figura 9. N-fertilizante aproveitado pelo milho (NFAMI, %) cultivado em Taquarituba na safra 2015/16 (figura a), safra 2016/17 (figura b) e em Leme em 2016/17 (figura c), em razão da profundidade de aplicação de N.

Figura 10. N total acumulado na planta de milho (NTAP, kg.ha⁻¹) em Taquarituba na safra 2015/16 (figura a), na safra 2016/17 (figura b) e em Leme em 2016/17 (figura c), em razão da profundidade de aplicação de N. NPPF – N no milho proveniente do fertilizante e NPPS – N no milho proveniente do solo.

Figura 11. Acúmulo de N na planta – grãos mais parte aérea de milho (ANP, kg.ha⁻¹) em Taquarituba na safra 2015/16 (a) e acúmulo de N na parte aérea do milho safra 2016/17 (ANPA, b), acúmulo de N na planta – grãos mais parte aérea em Leme 2016/17 (ANP – c), acúmulo de N–fertilizante na parte aérea e nos grãos (ANFP, %) em Taquarituba na safra 2015/16 (d) safra 2016/17 (e) e acúmulo de N–fertilizante nos grãos em Leme safra 2016/17 (ANFG, kg.ha⁻¹ – f), em razão da profundidade de aplicação de N no solo.

Figura 12. Biomassa seca de grãos (BG) e biomassa seca da parte aérea (BPA) de milho cultivado em Taquarituba nas safras 2015/16 (a) e 2016/17 (b) e em Leme na safra 2016/17 (c), bem como produtividade de grãos em Taquarituba nas safras 2015/16 e 2016/17 (d) e Leme na safra 2016/17 (e) em razão da profundidade de aplicação de N-fertilizante.

4. DISCUSSÃO

A fertilização nitrogenada se não for ajustada prejudica a produtividade pela dependência do metabolismo de N – assimilação desse nutriente, em relação ao metabolismo de carbono (Stitt e Krapp, 1999) e, obviamente, a rentabilidade dos produtores de milho. Ainda, há que se considerar a complexa dinâmica do N no solo e a competição entre microrganismos e planta pelo N disponível (solo e fertilizante) principalmente na presença de C-oxidável (Inselsbacher et al., 2010). Na presente pesquisa ficou comprovada a perturbação que a fertilização nitrogenada propicia na comunidade biológica, em especial quando é feita na superfície do solo e a interação com o N aproveitado no sistema solo–milho.

4.1. N–fertilizante altera a atividade microbiana na superfície do solo

A atividade microbiológica é um indicador da qualidade dos solos agrícolas, a qual depende dentre outros fatores, da disponibilidade de N, proveniente da degradação da matéria orgânica do solo (Chen et al., 2018) e/ou da adubação nitrogenada. A aplicação de N afetou a respirometria de forma diferente em condições edafoclimáticas contrastantes como no ambiente subtropical de Taquarituba e tropical em Leme (Figura 3). Nesse sentido, verificou-se que a respirometria foi maior na superfície do solo do que nas demais profundidades, independentemente do ano agrícola (2015/16 e 2016/17) e da textura de solo (argiloso ou franco arenoso) (Figura 3).

Ainda, a adição de N elevou o nível da respirometria no quarto dia após o fornecimento do nutriente, mas depois reduziu e manteve-se mais elevada até o 32º dia em relação à situação inicial em solo argiloso. Esses resultados são normais e reflete a disponibilidade de C-oxidável na camada superficial (Chen et al., 2018; Singh et al., 2011), o que aumentou a população microbiana, como sugere o pico da respirometria quatro dias após a adição de N.

Na agricultura em semeadura direta (ASD), como se faz em Taquarituba, a presença de resíduos vegetais depositados sobre o solo mantém-no úmido, ao qual juntou-se a aplicação de N (120 kg.ha^{-1} na presente pesquisa) contribuiu para incrementar a atividade microbiana (Ding et al., 2007; Song e Zhang, 2009). Song e Zhang (2009) ao avaliarem o efeito da fertilização com N-ureia na respirometria de um Argissolo com $36,8 \text{ g.kg}^{-1}$ de C verificaram que a aplicação de até 150 kg.ha^{-1} de N incrementou os valores de respirometria. Os autores associaram esse resultado à capacidade do N-fertilizante aumentar a quantidade de C da biomassa microbiana. Chen et al. (2018) também encontraram efeitos similares em um Latossolo distroférico típico cultivado com milho.

Ao contrário do que ocorreu em Taquarituba – ambiente subtropical, em Leme (ambiente tropical) a respirometria diminuiu após a adubação nitrogenada (Figura 3). Esse fato pode ser reflexo da elevada precipitação depois da aplicação de N – nas avaliações feitas 2 dias, 4 dias, 8 dias e 16 dias após a fertilização. A elevada precipitação pode ter prejudicado a ação microbiana por falta de N por causa da lixiviação e pela redução da difusão de oxigênio da atmosfera para o solo – necessária a respiração microbiana (Bowden et al., 2004; Chen et al., 2018). Bowden et al. (2004) estudaram o efeito da aplicação de nitrato de amônio (150 kg.ha^{-1} de N) em Cambissolo háplico típico e constataram correlação negativa entre o teor de água no solo e a respirometria. Esses autores também relacionaram os resultados ao efeito do excesso de água na superfície do solo com a diminuição da difusão de oxigênio no solo e, consequentemente, da atividade dos microrganismos aeróbicos obrigatórios. Chen et al. (2018)

também associaram a diminuição da respirometria a alta umidade de um Latossolo distroférico de textura argilo-siltosa, cultivado com milho.

Outro importante indicador microbiológico dos solos é a atividade da enzima desidrogenase. Essa enzima reflete a ação oxidativa total da microflora do solo (Liu et al., 2010). Dessa forma, assim como ocorreu com a respirometria, de maneira geral, também se verificou maior atividade dessa enzima na superfície do solo (Figura 4). Resultado normal, haja vista que na superfície dos solos o teor de matéria orgânica é superior nos primeiros 0,2 m, em relação às demais profundidades (Tabela 1). Quanto maior a quantidade de matéria orgânica, maior é a atividade da desidrogenase, em razão do crescimento da população microbiológica, cuja demanda por energia é atendida pela oxidação do C do solo (Basak et al., 2013; Liu et al., 2010; Shen et al., 2016).

A fertilização nitrogenada de certa forma prejudicou a atividade da desidrogenase, como indica os menores valores no 8º dia após a aplicação de N, comparada à época inicial em Taquarituba (safra 2015/16 e 2016/17), bem como a aplicação de N na superfície do solo em Leme (Figura 4). Esses resultados são consistentes aos encontrados na literatura, de que há diminuição da ação dessa enzima pelo fornecimento de N (Basak et al., 2013; Shen et al., 2016). De acordo com Shen et al. (2016), a atividade da desidrogenase em solo silto-argiloso da China, cultivado com milho fertilizado com 225 kg.ha⁻¹ de N-ureia, foi 42 µg TPF g⁻¹ solo 24 h⁻¹, menor que o valor obtido em solo não adubado (63 µg TPF g⁻¹ solo 24 h⁻¹). Os resultados da presente pesquisa corroboram com os resultados da literatura, como indicou a diminuição do valor da atividade dessa enzima em Cambissolo Háplico típico, na sucessão milho-trigo, pela aplicação de 120 kg.ha⁻¹ de N em relação à ausência desse nutriente (Basak et al. (2013). Saha et al. (2008) também obtiveram menor atividade enzimática pelo fornecimento de N, os quais atribuíram ao decréscimo de pH promovido pela nitrificação do NH₄⁺ proveniente do nitrato de amônio.

O aumento da concentração de N-NH₄⁺ na solução do solo diminui a atividade da enzima por causa do efeito deletério na comunidade microbiana (Ding et al., 2007). No solo franco-arenoso de Leme, a atividade da desidrogenase aumentou entre o 8º dia e 32º dia depois da aplicação de N na superfície do solo até o valor determinado antes da adição de N (Figura 4). Essa observação pode ser, em parte, explicada pela diminuição de N-NH₄⁺ em razão da lixiviação proporcionada por 100 mm de chuva depois da fertilização. Por sua vez, Liu et al. (2010), em Neossolo Quartzarênico cultivado com milho, observaram aumento da atividade dessa enzima de 55,9 µg TPF g⁻¹ solo 24 h⁻¹ (sem fornecer N) para 60,7 µg TPF g⁻¹ solo 24 h⁻¹ quando aplicaram 90 kg.ha⁻¹ de N-ureia. O N-ureia após a hidrólise no solo também forma N-NH₄⁺ o que dificulta a compreensão definitiva sobre a influência de N na atividade da desidrogenase.

4.2. Estoque de N-fertilizante é maior na camada de solo abaixo de onde é aplicado

Aplicação de N-fertilizante na superfície do solo avaliado acumula principalmente nas zonas imediatamente abaixo de onde fora depositado, independentemente do ambiente avaliado (tropical, subtropical), do teor de matéria orgânica, da textura do solo e do ano agrícola – safras 2015/16 e 2016/17 (Figuras 5, 6). Esse fato reflete em parte a imobilização microbiana de N, em razão da maior atividade microbiológica (Figuras 3 e 4), a exemplo do que fora obtido por Kaur et al. (2008). Na subsuperfície do solo, a atividade microbiológica é menor, assim como foi menor a quantidade determinada de N-fertilizante seja na forma mineral e/ou imobilizado. Adjetej et al. (1999) avaliaram o aproveitamento de N-fertilizante pela aplicação de 50 kg.ha⁻¹ de ¹⁵N-ureia incorporada a 0,03 m e 0,15 m de profundidade, em Latossolo Vermelho da Austrália, cultivado com trigo. De acordo com os

autores, foi determinada uma quantidade maior de ^{15}N próxima da zona onde fora aplicada o nutriente, e que a mesma diminui à medida que se aprofunda no solo. Resultado semelhante foi obtido na presente pesquisa.

Como a quantidade de N–fertilizante recuperada no solo a partir da posição em que foi colocado pode-se admitir que a lixiviação em condições de campo, tanto em ambiente tropical (Leme/SP) como em ambiente subtropical (Taquarituba/SP) não é a principal causa da perda de N (Almeida, 2017; Oliveira, 2018; Portela et al. 2006) à semelhança do que ocorre em regiões temperadas. Tal fato foi ainda mais reforçado pela constatação de que a quantidade de N–fertilizante reduz abaixo da camada subsequente ao fornecimento do nutriente, mesmo quando foi posicionado a 0,2 m e 0,4 m de profundidade (Figuras 5 e 6). O N aplicado abaixo da superfície do solo (0,2 m e 0,4 m em Taquarituba e 0,1 m e 0,2 m em Leme) não aumentou o aproveitamento na camada subsequente, independentemente da textura do solo, ainda que as atividades microbianas sejam inferiores àquela verificada nos primeiros 0,2 m de solo (Figura 4). Como já afirmado, são indícios que a lixiviação não interfere substancialmente no aproveitamento do ^{15}N . Rees et al. (1997) aplicaram N–ureia na superfície de um Luvisolo, incorporado a 0,15 m de profundidade e a 0,1 m de distância da linha das plantas de milho e trigo, e avaliaram o aproveitamento de ^{15}N no solo, a qual foi maior para a aplicação do nutriente na superfície e na zona logo abaixo de onde fez a fertilização. Esses autores também afirmaram que a aplicação de N em subsuperfície levou a maior lixiviação de N-NO_3 abaixo de 0,9 m, em classe de solo diferente das classes em que foi realizada a presente pesquisa.

4.3. N–fertilizante aproveitado pelo milho independe da profundidade de aplicação

A quantidade de N–fertilizante que acumulou nos grãos de milho (NTG, Taquarituba 2015/16), de N–fertilizante que acumulou na planta – grãos mais parte aérea (NTP, Taquarituba 2016/17) e N–fertilizante acumulado na parte aérea do milho (NPA, Leme 2016/17) apresentaram comportamento semelhante, em que a aplicação de N na superfície e a 0,2 m de profundidade foram superiores ao fornecimento de N a 0,4 m abaixo da superfície do solo (Figura 8).

Para o N–fertilizante aproveitado pelo milho (NFAMI, %) não se constatou influência da profundidade de aplicação de N – na superfície, a 0,2 m de profundidade ou 0,4 m abaixo da superfície do solo (Figura 9 e 10), independentemente da região tropical ou subtropical, textura de solo, teor de matéria orgânica e do ano agrícola – safras 2015/16 e 2016/17. O NFAMI em ambiente subtropical foi igual a 54,3% (2015/2016) e 56,3% (2016/17) para a aplicação de N na superfície do solo, quando o N foi colocado a 0,2 m de profundidade a planta recuperou 60,2% (2015/2016) e 67% (2016/17) e, finalmente, o posicionamento a 0,4 m abaixo da superfície do solo propiciou aproveitamento de 43% (2015/2016) e 50,6% (2016/17). Na condição tropical de Leme e solo arenoso o milho recuperou 27,1% do N aplicado sobre o solo, 22,1% quando adicionado 0,1 m da superfície do solo e 16,6% para a colocação a 0,2 m de profundidade.

O N total acumulado na planta de milho – grãos mais parte aérea (NTAP, Figura 10), constituído pela parte proveniente do fertilizante (NPPF) e a parte originada do solo (NPPS) não diferem com a profundidade de aplicação de N nas duas safras no ambiente subtropical (Taquarituba, 2015/16 e 2016/17). A ordem de grandeza variou com a safra e alcançou valores entre 225,2 kg.ha^{-1} a 242,9 kg.ha^{-1} em 2015/16, entre 145,5 kg.ha^{-1} e 185,5 kg.ha^{-1} em 2016/17 em Taquarituba – solo argiloso e maior teor de matéria orgânica, de acordo com a posição em que o N fora aplicado. Em Leme – ambiente tropical, solo arenoso e menor teor de matéria orgânica, a ordem de grandeza variou entre 62,9 kg.ha^{-1} e 66,0 kg.ha^{-1} conforme a zona de aplicação do N no solo.

As demais variáveis como acúmulo de N na planta de milho – grãos mais parte aérea (ANP, Taquarituba 2015/16 e Leme, Figuras 11a, c), acúmulo de N na parte aérea (ANPA, Taquarituba 2016/17, Figura 11b), assim como o acúmulo de N–fertilizante planta – grãos e parte aérea ($A^{15}NFP$, Taquarituba 2015/16 e 2016/17, Figuras 11d, e) e acúmulo de N–fertilizante nos grãos de milho ($A^{15}NFG$, Leme 2016/17, Figura 11f) não variaram com a localização do N solo – na superfície, a 0,2 m de profundidade e 0,4 m abaixo da superfície do solo. A biomassa seca de grãos de milho (BG) e da parte aérea (BPA), bem como a produtividade de grãos também não foi influenciada pelo modo de localizar o N no solo, independentemente do ambiente (tropical ou subtropical), da textura do solo, do teor de matéria orgânica dos mesmos e dos anos agrícolas – 2015/16 e 2016/17 (Figura 12).

A dinâmica de N no solo – de imobilizado a disponível e vice-versa, além de outros fatores podem ter contribuído para a não constatação da influência da posição em que o N é aplicado no solo em muitas variáveis analisadas na presente pesquisa. Adjetey et al. (1999) cultivaram trigo por dois anos consecutivos em casa de vegetação e em campo (Latossolo Vermelho, Austrália) e também não encontraram significância para a profundidade em que o N foi posicionado, sem evidências da lixiviação de N. Para os autores a falta de significância estaria relacionada à perda do nutriente por desnitrificação em razão do tempo de duração do experimento, a semelhança do sucedido na presente pesquisa. Ainda, pode-se admitir que a aplicação de N em subsuperfície se equipara ao efeito da imobilização de N quando feito na superfície do solo. A aplicação de N na superfície acelera a competição microbiana em relação à planta pelo N disponível, por que o volume de solo ocupado pelos mesmos é superior ao volume de solo ocupado pelas raízes de milho. Diversos trabalhos da literatura aprofundaram o fertilizante nitrogenado para reduzir a volatilização do N–ureia, mas poucos foram conduzidos com fontes não amídicas, como o nitrato de amônio na presente pesquisa, o que dificulta a comparação de resultados. Ainda, a presente pesquisa foi conduzida em dois ambientes diferentes – subtropical (Taquarituba) e tropical (Leme), em solos bem drenados, com diferentes texturas e teor de matéria orgânica.

Em pesquisa que aplicou 210 kg.ha^{-1} de ^{15}N –ureia incorporada a 0,1 m e 0,15 m de profundidade em Luvisolo cultivado com milho, Rees et al. (1997) recuperaram 40 kg.ha^{-1} de N quando aplicada a 0,1 m, e 18 kg.ha^{-1} na incorporação a 0,15 m. Na presente pesquisa feita em Leme, na aplicação de N a 0,1 m de profundidade foi aproveitado 22 kg.ha^{-1} de N (Figura 6). Ressalte-se que Rees et al. (1997) também não obtiveram significância para a produtividade de grãos de milho, em razão da profundidade de aplicação de N.

As variáveis de produtividade foram numericamente superiores em Taquarituba comparativamente aos valores obtidos em Leme (Figuras 9 a 12). Os resultados de produtividade em Taquarituba foram satisfatórios, mas em Leme foram baixíssimos. Tais resultados se devem a capacidade de retenção de água e a distribuição pluvial favoráveis ao cultivo de milho em Taquarituba, como indica o NPPF – igual a 63,7% para N aplicado a 0,2 m de profundidade (Taquarituba, média de dois anos) e 27,9% mesmo quando o N foi aplicado na superfície do solo em Leme. A NPPF de Taquarituba foi 228% maior que a NPPF de Leme. Isso sugere que o melhor aproveitamento do N pelas plantas cultivadas em Taquarituba pode ter contribuído para a satisfatória produtividade do milho comparativamente a Leme que apresentou insatisfatória. O potencial de lixiviação de solo franco–arenoso de Leme também pode explicar em parte a baixa eficiência de aproveitamento do N–fertilizante (Figura 9).

Por fim, outra constatação importante foi o acúmulo total de N, o qual foi, em média, $201,3 \text{ kg.ha}^{-1}$ em Taquarituba, dos quais $135,8 \text{ kg.ha}^{-1}$ vieram da mineralização do solo, enquanto em Leme as mesmas variáveis foram, em média, $64,6 \text{ kg.ha}^{-1}$ e $25,9 \text{ kg.ha}^{-1}$, nessa ordem. Esses resultados dizem respeito à diferença do teor de matéria orgânica do solo – 34 g.dm^{-3} em Taquarituba e 23 g.dm^{-3} em Leme.

5. CONCLUSÃO

A fertilização nitrogenada altera a atividade microbiana, especialmente quando feita na camada superficial do solo, onde é maior a concentração microbiológica. A adubação nitrogenada em subsuperfície – zona menos ativa biologicamente não aumenta o aproveitamento de N proveniente do fertilizante pelo milho – grãos e parte área, em relação ao modo usual feito pelos agricultores – aplicação de N a lanço, na superfície do solo.

REFERÊNCIAS

- Adjetej, J.A., Campbell, L.C., Searle, P.G.E., Saffigna, P., 1999. Studies on depth of placement of urea on nitrogen recovery in wheat grown on a red-brown earth in Australia. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 54, 227–232. <https://doi.org/10.1023/A:1009775622609>
- Alef, K., Nannipieri, P., 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Londres: Academic Press, 576p.
- Allen, A.S., Schlesinger, W.H., 2004. Nutrient limitations to soil microbial biomass and activity in loblolly pine forests. *Soil Biol. Biochem.* 36, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.12.002>
- Almeida, R.E.M., 2008. Balanço de ^{15}N em sistemas de produção de milho para adoção do plantio direto no Oeste baiano. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Acesso em: 18–09–2016.
- Almeida, R.E.M., Favarin, J.L., Otto, R., Pierozan Junior, C.P., Oliveira, S.M., Tezotto, T., Lago, B.C., 2017. Effects of nitrogen fertilization on yield components in a corn–palisadegrass intercropping system. *Aust. J. Crop Sci.* 11, 352–359. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.03.pne273>
- Alves, T.D.S., Campos, L.L., Neto, N.E., Matsuoka, M., Loureiro, M., 2011. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. *Acta Sci–Agron.* 33, 341–347. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i2.4841>
- ANDRA – Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2016. Observatório agrícola. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. v.3– Safra 2015/16– n.7 – Sétimo levantamento.
- Baker, J.L., Timmons, D.R., 1994. Fertilizer management effects on leaching of labeled nitrogen for no-till corn in field lysimeters. *J. Environ. Qual.* 23, 305–310.
- Barrie, A., Prosser, S.J., 1996. Automated analysis of light–element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: Boutton, T. W., Yamasaki, S. (Ed.). *Mass spectrometry of soils*. New York: Marcel Dekker, 1–46.
- Basak, B.B., Biswas, D.R., Pal, S., 2013. Soil biochemical properties and grain quality as affected by organic manures and mineral fertilizers in soil under maize–wheat rotation. *Agrochimica* 57, 49–66.
- Bowden, R.D., Davidson, E., Savage, K., Arabia, C., Steudler, P., 2004. Chronic nitrogen additions reduce total soil respiration and microbial respiration in temperate forest soils at the Harvard Forest. *For. Ecol. Manage.* 196, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.03.011>
- Casida, L.E., 1978. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Appl. Environ. Microb.* 34, 630–636.
- Cerri, C.C., Maia, S.M.F., Galdos, M.V., Cerri, C.E.P., Feigl, B.J., Bernoux, M., 2009. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. *Sci. Agric.* 66, 831–843. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000600017>
- Chen, Z., Xu, Y., He, Y., Zhou, X., Fan, J., Yu, H., Ding, W., 2018. Nitrogen fertilization stimulated soil heterotrophic but not autotrophic respiration in cropland soils: A greater role of organic over inorganic fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* 116, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.029>
- Coelho, A.M., França, G.E., Bahia, A.F.C., Guedes, G.A.A., 1991. Balanço de nitrogênio (^{15}N) em um Latossolo Vermelho–Escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 15, 187–193.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento [internet]. [Acesso em 17 fev 2018]. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_02_08_17_09_36_fevereiro_2018.pdf

- Ding, W., Cai, Y., Cai, Z., Yagi, K., Zheng, X., 2007. Soil Respiration under Maize Crops: Effects of Water, Temperature, and Nitrogen Fertilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 944. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0160>
- Drury, C.F., Reynolds, W.D., Tan, C.S., Welacky, T.W., Calder, W., McLaughlin, N.B., 2006. Emissions of Nitrous Oxide and Carbon Dioxide. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 570. <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0042>
- Eagle, A.J., Bird, J.A., Hill, J.E., Horwath, W.R., Kessel, C.V., 2001. Nitrogen dynamics and fertilizer use efficiency in rice following straw incorporation and winter flooding. *Agron. J.* 93, 1346–1354. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.1346>
- Fan, J., McConkey, B., Wang, H., Janzen, H., 2016. Root distribution by depth for temperate agricultural crops. *F. Crop. Res.* 189, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.02.013>
- Favarin, J.L., Tezotto, T., Pedrosa, A.W., Neto, A.P., 2015. Coffee–Forage Intercropping is a Sustainable Production System for Brazil. *Better Crops With Plant Food*. A publication of the International Plant Nutrition Institute (IPNI). v. XCIX (99), n.3.
- Fernandes, F.C.S., Libardi, P.L., Carvalho, L.A., 2006. Internal drainage and nitrate leaching in a corn–black oat–corn succession with two split nitrogen applications. *Sci. Agric.* 63, 483–492. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162006000500011>
- Figueiredo, C.C., Resck, D.V.S., Gomes Ferreira, E.A.B., Ramos, M.L.G., 2007. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em resposta a diferentes sistemas de manejo em um Latossolo Vermelho no Cerrado. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 31, 551–562. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000300015>
- Friedl, J., Scheer, C., Rowlings, D.W., McIntosh, H.V., Strazzabosco, A., Warner, D.I., Grace, P.R., 2016. Denitrification losses from an intensively managed sub-tropical pasture – Impact of soil moisture on the partitioning of N₂ and N₂O emissions. *Soil Biol. Biochem.* 92, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.016>
- Gava, G.J.C., Trivelin, P.C.O., Oliveira, M.W., Heinrichs, R., Silva, M.A., 2006. Balanço do nitrogênio da urea (¹⁵N) no sistema solo–planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. *Bragantia*, 65, 477–486. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052006000300014>
- Gu, X.B., Li, Y.N., Du, Y.D., 2017. Optimized nitrogen fertilizer application improves yield, water and nitrogen use efficiencies of winter rapeseed cultivated under continuous ridges with film mulching. *Ind. Crops Prod.* 109, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.036>
- Hancock, J.M., McNeill, A.M., McDonald, G.K., Holloway, R.E., 2011. Fate of fertiliser N applied to wheat on a coarse textured highly calcareous soil under simulated semi-arid conditions. *Plant Soil* 348, 139–153. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-0917-5>
- He, P., Sha, Z., Yao, D., Xing, S., Zhou, W., 2013. Effect of nitrogen management on productivity, nitrogen use efficiency and nitrogen balance for a wheat–maize system. *J. Plant Nutr.* 36, 1258–1274. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.784982>
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, SIDRA [internet]. [Acesso em 17 fev 2018]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>
- Inselsbacher, E., Hinko–Najera Umana, N., Stange, F.C., Gorfer, M., Schüller, E., Ripka, K., Zechmeister–Boltenstern, S., Hood–Novotny, R., Strauss, J., Wanek, W., 2010. Short–term competition between crop plants and soil microbes for inorganic N fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* 42, 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.019>

- Kaur, T., Brar, B.S., Dhillon, N.S., 2008. Soil organic matter dynamics as affected by long-term use of organic and inorganic fertilizers under maize-wheat cropping system. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 81, 59–69. <https://doi.org/10.1007/s10705-007-9152-0>
- Liang, B.C., Mackenzie, A.F., 1994. Corn yield, nitrogen uptake and nitrogen use efficiency as influenced by nitrogen fertilization. *Can. J. Soil Sci.* 74, 235–240. <https://doi.org/10.4141/cjss94-032>
- Liu, E., Yan, C., Mei, X., He, W., Bing, S.H., Ding, L., Liu, Q., Liu, S., Fan, T., 2010. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China. *Geoderma* 158, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.04.029>
- Mandal, A., Patra, A.K., Singh, D., Swarup, A., Masto, R.E., 2007. Effect of long-term application of manure and fertilizer on biological and biochemical activities in soil during crop development stages 98, 3585–3592. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.027>
- Melo, W.J., Melo, G.M.P., Araujo, A.S.F., Melo, V.P., 2010. Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo. In: Figueiredo M.B.V., Burity H.A., Oliveira J.P., Santos C.E.R.S., Stanford, N.P., (ed.). *Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais*. Brasília/Recife: Embrapa Informação Tecnológica/Instituto Agrônômico de Pernambuco. 153–87.
- Oliveira, S.M., Almeida, R.E.M., Ciampitti, I.A., Pierozan Junior, C., Lago, B.C., Trivelin, P.C.O., Favarin, J.L., 2018. Understanding N timing in corn yield and fertilizer N recovery: An insight from an isotopic labeled-N determination. *PLoS One* 13, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192776>
- Pan, S., Wen, X., Wang, Z., Ashraf, U., Tian, H., Duan, M., Mo, Z., Fan, P., Tang, X., 2017. Benefits of mechanized deep placement of nitrogen fertilizer in direct-seeded rice in South China. *F. Crop. Res.* 203, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.12.011>
- Portela, S.I., Andriulo, A.E., Sasal, M.C., Mary, B.E., Jobbágy, E.G., 2006. Fertilizer vs. organic matter contributions to nitrogen leaching in cropping systems of the Pampas: ¹⁵N application in field lysimeters. *Plant Soil* 289, 265–277. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9134-z>
- Prasertsak, P., Freney, J.R., Denmead, O.T., Saffigna, P.G., Prove, B.G., Reghenzani, J.R., 2002. Effect of fertilizer placement on nitrogen loss from sugarcane in tropical Queensland. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 62, 229–239. <https://doi.org/10.1023/A:1021279309222>
- Raij, B.van, 1996. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. Campinas: IAC.
- Rees, R.M., Roelcke, M., Li, S.X., Wang, X.Q., Li, S.Q., Stockdale, E.A., McTaggart, I.P., Smith, K.A., Richter, J., 1997. The effect of fertilizer placement on nitrogen uptake and yield of wheat and maize in Chinese loess soils. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 47, 81–91. <https://doi.org/10.1007/BF01985721>
- Rimski-Korsakov, H., Rubio, G., Lavado, R.S., 2012. Fate of the nitrogen from fertilizers in field-grown maize. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 93, 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10705-012-9513-1>
- Saha, S., Prakash, V., Kundu, S., Kumar, N., Mina, B.L., 2008. Soil enzymatic activity as affected by long term application of farm yard manure and mineral fertilizer under a rainfed soybean-wheat system in N-W Himalaya. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.02.004>
- Santos, H.G., Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C., Oliveira, V.A., Oliveira, J.B., Coelho, M.R., Lumberras, J.F., Cunha, T.J.F., 2013. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 3. ed. Brasília: Embrapa.
- SAS Institute Inc., 2008. *The SAS System*, release 9.2. SAS Institute Inc., Cary:NC.

- Sgouridis, F., Ullah, S., 2015. Relative magnitude and controls of in situ N₂ and N₂O fluxes due to denitrification in natural and seminatural terrestrial ecosystems using ¹⁵N tracers. *Environ. Sci. Technol.* 24, 14110–14119. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03513>
- Shen, Y., Chen, Y., Li, S., 2016. Microbial Functional Diversity, Biomass and Activity as Affected by Soil Surface Mulching in a Semiarid Farmland. *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159144>
- Singh, G., Kumar, D., Marwaha, T.S., Singh, A.K., Srivasmurthy, K., 2011. Conservation tillage and integrated nitrogen management stimulates soil microbial properties under varying water regimes in maize–wheat cropping system in northern India. *Arch. Agron. Soil Sci.* 57, 507–521. <https://doi.org/10.1080/03650341003657207>
- Song, C., Zhang, J., 2009. Effects of soil moisture, temperature, and nitrogen fertilization on soil respiration and nitrous oxide emission during maize growth period in northeast China. *Acta Agric. Scand. Sect. B – Plant Soil Sci.* 59, 97–106. <https://doi.org/10.1080/09064710802022945>
- Stitt, M. Krapp, A., 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22, 583–621. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x>
- Stotzky, G., 1965. Microbial respiration: methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties, 1550–1572.
- Subbarao, G.V., Ito, O., Sahrawat, K.L., Berry, W.L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Watanabe, T., Suenaga, K., Rondon, M., Rao, I.M., 2006. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—challenges and opportunities. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 303–335. <https://doi.org/10.1080/07352680600794232>
- Szal, B., Podgórska, A., 2012. The role of mitochondria in leaf nitrogen metabolism. *Plant cell Environ.* 35, 1756–1768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02559.x>
- Tewari, K., Sato, T., Abiko, M., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Takahashi, Y., Nagumo, Y., Tutida, T., Ohya, T., 2007. Analysis of the nitrogen nutrition of soybean plants with deep placement of coated urea and lime nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 772–781. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00194.x>
- Trannin, I.C.B., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., 2007. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biofertilizante industrial e cultivo de milho. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 1173–1184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000500032>
- Vargas, L.K., Scholles, D., 1998. Nitrogênio da biomassa microbiana, em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por métodos de fumigação. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 22, 411–417.
- Viero, F., Bayer, C., Fontoura, S.M.V., Moraes, R.P., 2014. Ammonia volatilization from nitrogen fertilizers in no-till wheat and maize in southern Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 38, 1515–1525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832014000500017>
- Wang, S., Luo, S., Yue, S., Shen, Y., Li, S., 2016. Fate of ¹⁵N fertilizer under different nitrogen split applications to plastic mulched maize in semiarid farmland. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 105, 129–140. <http://dx.doi.org/10.1007/s10705-016-9780-3>
- Wang, Y.Y., Hsu, P.K., Tsay, Y.F., 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.* 17, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.006>
- Whitney, S.M., Houtz, R.L., Alonso, H., 2011. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂–sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol.* 155, 27–35. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164814>
- Wu, M., Li, G., Li, W., Liu, J., Liu, M., Jiang, C., Li, Z., 2017. Nitrogen Fertilizer Deep Placement for Increased Grain Yield and Nitrogen Recovery Efficiency in Rice Grown in Subtropical China. *Front. Plant Sci.* 8, 1227. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01227>

- Yao, Y., Zhang, M., Tian, Y., Zhao, M., Zhang, B., Zhao, M., Zeng, K., Yin, B., 2017. Urea deep placement for minimizing NH_3 loss in an intensive rice cropping system. *F. Crop. Res.* 218, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.03.013>
- Zhu, S., Vivanco, J.M., Manter, D.K., 2016. Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. *Appl. Soil Ecol.* 107, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.009>