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

**Técnica da diluição do isótopo ^{15}N para determinação da
amonificação e nitrificação brutas de N em solos cultivados com
cana-de-açúcar e braquiária**

Maria Stefânia Cruanhes D’Andréa

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

**Piracicaba
2014**

Maria Stefânia Cruanhes D'Andréa
Engenheira Agrônoma

**Técnica da diluição do isótopo ^{15}N para determinação da amonificação e
nitrificação brutas de N em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO CESAR OCHEUZE TRIVELIN**

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

Piracicaba
2014

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

D'Andréa, Maria Stefânia Cruanhes

Técnica da diluição do isótopo ^{15}N para determinação da amonificação e nitrificação brutas de N em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária / Maria Stefânia Cruanhes D'Andréa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
109 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Saccharum* spp. 2. *Brachiaria* spp. 3. Amonificação bruta 4. Nitrificação bruta
5. Inibição biológica da nitrificação I. Título

CDD 633.61
D178t

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

Aos meus pais

Paulo e Ângela, pelo amor, educação, incentivo e exemplos de caráter.

A minha irmã,

Maria Gabriela, pela amizade e exemplo de alegria.

Ao meu amado,

João Bruno, pelo carinho, amor verdadeiro e humildade.

OFEREÇO

Ao meu pai **Paulo**,

que me ensinou a não ter medo de ser feliz!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pela orientação, paciência, embasamentos técnicos e ensinamentos profissionais dos quais jamais me esquecerei.

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos no período de agosto de 2012 a agosto de 2014.

À Dra. Patrícia Perondi Anchão Oliveira pela ajuda e concessão dos solos das áreas de braquiárias e mata nativa, imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

A toda equipe do LIE – CENA/USP: Professores Helder de Oliveira e Jefferson Mortatti; aos funcionários, Magda de Mello, Juliana Graciela Giovannini, Bento Moçambique de Moraes Neto e Glauco Arnold Tavares, pelo trabalho realizado. Em especial ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, Ana Paula, Miguel Luiz Baldessin, Hugo Henrique Batagello e Clélber Vieira Prestes, por participarem de diversas etapas do meu projeto, sem os quais não seria possível.

Ao Eduardo Mariano, pela contribuição científica, análises técnicas e auxílio em todo o desenvolvimento da minha pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas de equipe José Marcos Leite, Rafael Otto, Michele Xavier Vieira Megda, João José de Miranda Milagres, Carlos Roberto Sant'anna Filho, Evandro Luiz Schoningher, Hugo e Beatriz Nastaro, pelo agradável convívio.

Aos estagiários: Lucas, Luis Alexandre e Carol. Em especial à Jussara e ao Luiz Henrique, que participaram em diferentes momentos com muita dedicação.

MUITO OBRIGADA!

*“Cada sonho que você deixa para trás
é um pedaço do seu futuro
que deixa de existir”.*

Steve Jobs

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Dinâmica do nitrogênio no solo	21
2.2 Assimilação do nitrogênio pelas plantas.....	25
2.3 Técnica isotópica com ^{15}N	27
2.4 Cana-de-açúcar.....	31
2.5 Exsudados de raízes de braquiárias: efeito inibitório na nitrificação	34
Referências	36
3 TEMPO DE AGITAÇÃO PARA MICRODIFUSÃO (RECUPERAÇÃO) DE NITROGÊNIO MINERAL EM AMOSTRAS LÍQUIDAS.....	47
Resumo	47
Abstract	47
3.1 Introdução	48
3.2 Material e Métodos.....	49
3.3 Resultados e Discussão	50
3.4 Conclusão	53
Referências	53
4 MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DO N-NITRATO EM AMOSTRAS LÍQUIDAS	55
Resumo	55
Abstract	55
4.1 Introdução	56
4.2 Material e Métodos.....	57
4.3 Resultados e Discussão	59
4.4 Conclusão	61
Referências	61
5 AJUSTE NA ABUNDÂNCIA ISOTÓPICA DE ^{15}N PARA TAXA DE AMONIFICAÇÃO E NITRIFICAÇÃO BRUTAS DE NITROGÊNIO EM SOLOS TROPICAIS.....	63

Resumo	63
Abstract.....	63
5.1 Introdução.....	64
5.2 Material e Métodos	66
5.2.1 Taxa de amonificação bruta.....	66
5.2.2 Taxa de nitrificação bruta.....	69
5.2.3 Análises estatísticas	71
5.3 Resultados e Discussão	71
5.4 Conclusão.....	74
Referências.....	74
6 AMONIFICAÇÃO E NITRIFICAÇÃO BRUTA EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR E BRAQUIÁRIA.....	79
Resumo	79
Abstract.....	79
6.1 Introdução.....	80
6.2 Material e Métodos	82
6.2.1 Amostras experimentais	82
6.2.2 Determinações físico-químicas do solo	86
6.2.3 Incubação do solo.....	90
6.2.4 Amonificação bruta (AB).....	90
6.2.5 Nitrificação bruta (NB).....	92
6.2.6 Produtividade de cana-de-açúcar e reposta à fertilização nitrogenada	93
6.2.7 Análise dos resultados.....	94
6.3 Resultados e Discussão	95
6.3.1 TAB e TNB em solos cultivados com cana-de-açúcar.....	95
6.3.2 TAB e TNB em solos de pastagens e floresta estacional semidescídua	99
6.4 Conclusão.....	101
Referências.....	102
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
Referências.....	108

RESUMO

Técnica da diluição do isótopo ^{15}N para determinação da amonificação e nitrificação brutas de N em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária

Os processos de amonificação e nitrificação no solo são de fundamental importância para a disponibilidade de N-mineral às plantas. Recentemente, foi demonstrado que a cana-de-açúcar tem preferência na absorção de NH_4^+ à NO_3^- , podendo apresentar maior produtividade quando fertilizada apenas com N-amoniaco. Da mesma forma, estudos indicaram que gramíneas do gênero *Brachiaria* podem inibir a nitrificação no solo por meio da exsudação radicular de compostos denominados braquiolactanas. Portanto, é oportuno avaliar as taxas de amonificação (TAB) e nitrificação brutas (TNB) de N pela técnica da diluição do isótopo ^{15}N em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária. Devido à escassez de trabalhos voltados à estimativa da TAB e TNB em solos tropicais, adaptações na metodologia são requeridas. Objetivou-se, então, realizar ajustes nos protocolos para determinação da TAB e TNB, para, posteriormente, quantificar as referidas taxas em solos sob cultivo de cana-de-açúcar e de algumas espécies de gramíneas para pastagem. Primeiramente, avaliou-se o tempo necessário de agitação de amostras líquidas contendo um sistema de microdifusão para captura do N-mineral presente. Os resultados indicaram que a máxima recuperação isotópica de ^{15}N -mineral e de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ ocorreu em 24 h de agitação. Em sequência foram avaliadas duas técnicas para recuperação do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ (eliminação prévia do N-NH_4^+ e diluição isotópica) presente em extratos de KCl contendo $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ e ^{15}N -mineral. Ambas foram eficientes, sendo recomendada técnica que preconiza a eliminação prévia do N-NH_4^+ , pela boa operacionalidade proporcionada. A última adaptação efetuada se refere à abundância de ^{15}N no composto marcado a ser aplicado no solo, visto que em estudos com solos temperados, são utilizados compostos altamente enriquecidos no isótopo. Foi constatado que para solos tropicais (agricultáveis e cultivados com cana-de-açúcar, no caso) não há necessidade de alta marcação com ^{15}N nos compostos. Por fim, foi quantificada a TAB e TNB de solos cultivados com cana-de-açúcar e pastagens, com as devidas adaptações metodológicas efetuadas. A TAB dos solos de cana-de-açúcar e pastagem foi superior à TNB. Os solos de pastagem cultivados unicamente com a espécie *B. humidicola* apresentaram alto conteúdo de N-NH_4^+ e valores extremamente baixos de N-NO_3^- e TNB, indicando inibição biológica da nitrificação. A ação inibitória da nitrificação em solos com ocupação de *B. humidicola* pode ser uma estratégia interessante para o plantio de cana-de-açúcar, com base na hipótese de preferência de absorção por NH_4^+ à NO_3^- pela cultura.

Palavras chave: *Saccharum* spp.; *Brachiaria* spp.; Amonificação bruta; Nitrificação bruta; Inibição biológica da nitrificação

ABSTRACT

¹⁵N pool dilution technique for assessing gross ammonification and nitrification in soils cropped with sugarcane and *Brachiaria*

The ammonification and nitrification processes of soils are of fundamental importance because they release mineral N to the plants. It was recently shown that sugarcane has a preference to uptake NH_4^+ instead of NO_3^- , and may have higher yield when is fertilized with only NH_4^+ -N. Similarly, studies indicated that some *Brachiaria* species can inhibit soil nitrification through root exudation of free fatty acids. Therefore, it is appropriate to assess the gross rates of ammonification (GRA) and gross nitrification (GRN) by ¹⁵N pool dilution technique. Therefore, it is appropriate to assess the gross rates of ammonification (GRA) and gross nitrification (GRN) by the ¹⁵N pool dilution technique in soils cropped with sugarcane and pasture. Due to the lack of studies related to the estimate of GRA and GRN in tropical soils, adjustments in methodology are required. Thus, the objectives were to perform some adjustments in the protocols of GRA and GRN to subsequently quantify such rates in soils under sugarcane and some pasture grasses. First, it was assessed the time needed for shaking liquid samples containing a microdiffusion system to capture the mineral N present. Results indicate that the maximum isotopic recovery of ¹⁵NH₄⁺-N and mineral-¹⁵N occurred within 24 h of shaking. Following, two methods of recovery the added ¹⁵NO₃⁻-N (prior removal of NH_4^+ -N and isotope dilution procedure) to samples containing KCl were tested. Both methods were effective, but the technique that advocates removal of NH_4^+ -N is recommended, due to the good operability. The last adjustment made refers to the ¹⁵N abundance of labelled compound, since studies with temperate soils usually use highly enriched compounds in the isotope. It was observed that for tropical soils (arable and under sugarcane, in this case) there is no need to use highly enriched ¹⁵N-compounds. Finally, GRA and GRN were quantified in soils under sugarcane and pasture, applying the adjustments previously made. GRA in soils from sugarcane and pasture was higher compared to GRN. The soils under *B. humidicola* showed high content of NH_4^+ -N and extremely low values of NO_3^- -N and GRN, indicating biological nitrification inhibition. Nitrification inhibition in soils occupied by *B. humidicola* may be an interesting strategy for sugarcane planting, on the assumption of preference to uptake NH_4^+ rather than NO_3^- in this crop.

Keywords: *Saccharum* spp.; *Brachiaria* spp.; Gross ammonification; Gross nitrification; Biological inhibition of nitrification

1 INTRODUÇÃO

O elemento nitrogênio (N) é classificado como nutriente essencial por participar de diversos compostos e processos fisiológicos nas plantas, sendo por isso considerado um dos mais limitantes da produtividade agrícola. Na natureza, o N apresenta ciclo biogeoquímico complexo, com seis níveis de oxidação, desde o NO_3^- (valência +5) à forma NH_4^+ (valência -3), sendo muitos destes processos mediados por microrganismos (CANTARELLA, 2007; TRIVELIN; FRANCO, 2011).

O processo de mineralização que ocorre nos solos envolve as etapas da amonificação e da nitrificação. Essas transformações são fundamentais para a ciclagem do elemento e, responsáveis por disponibilizar o N combinado da matéria orgânica aos vegetais. A primeira etapa, a amonificação, engloba a passagem do N-orgânico à $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, ou seja, a mineralização propriamente dita, enquanto que a nitrificação, é a oxidação do NH_4^+ à NO_3^- (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; CANTARELLA, 2007). A formação de NO_3^- no solo gera perdas de N para o ambiente. As perdas podem ocorrer na forma de emissão de gases (N_2 , NO e N_2O) por meio dos processos mediados pela microbiota do solo e durante a desnitrificação. O NO_3^- , por ser um ânion, fica também susceptível a ser perdido pela lixiviação dos solos (SUBBARAO et al., 2006). Contudo, estas perdas podem ser mitigadas desde que a forma amoniacal não seja oxidada à NO_3^- .

O traçador ^{15}N é uma ferramenta muito utilizada em pesquisas no auxílio de estudos relacionados aos percursos que o N realiza no sistema solo-planta-atmosfera, de forma quantitativa e qualitativa (TRIVELIN, 2004). A técnica diluição do isótopo, que se utiliza do isótopo estável ^{15}N , é a única maneira eficaz de quantificar as taxas brutas de amonificação e nitrificação que ocorrem nos solos. A eficiência desta metodologia está em informar as taxas de transformações brutas independentes daquelas concorrentes sucedidas no sistema (BARRACLOUGH et al., 1985; BOECKXA et al., 2004; CHRISTENSON et al., 2009). A técnica compreende a aplicação de formas minerais enriquecidas no isótopo ^{15}N ao solo e, com a entrada do N-mineral (NH_4^+ e NO_3^-) de abundância natural proveniente da mineralização da matéria orgânica ou da nitrificação, causará diluição isotópica da forma mineral enriquecida em ^{15}N (VIDELA, 2004; D'ANDRÉA, 2012). Desse modo, é possível mensurar o potencial do solo em disponibilizar N-mineral que poderá ser aproveitado, posteriormente, pelas culturas.

Entretanto, poucos são os estudos relacionados à mineralização bruta de N em ambientes tropicais, tornando-se necessária a realização de diversas adaptações dos métodos utilizados na predição das taxas brutas destas transformações do N no solo. Assim, a elaboração de um protocolo para a determinação da amonificação e nitrificação bruta de N por meio da técnica de diluição do isótopo ^{15}N é de grande importância.

A primeira modificação na metodologia é referente ao tempo de agitação necessário para máxima recuperação do N-NH_4^+ em solução utilizando armadilhas acidificadas. Estudos desenvolvidos por Videla (2004) e Moraes (2012) reportam que o tempo de 48 h é o recomendado para alta recuperação do N via microdifusão. Todavia, o tempo de 24 h de agitação pode ser uma alternativa interessante para maior operacionalidade do método estudado, desde que ocorra boa recuperação do N pela microdifusão.

Outra modificação na técnica diz respeito ao método para recuperação (via microdifusão) do N-NO_3^- presente no extrato de solo. A recuperação desse ânion pode ser feita por meio da prévia eliminação do N-NH_4^+ utilizando-se MgO e posterior volatilização do N como NH_3 , adicionando-se posteriormente liga de Devarda para redução do NO_3^- à NH_4^+ (PARKER; SCHIMEL, 2010). Outra possibilidade para se recuperar o NO_3^- consiste no método de diluição isotópica, onde não ocorre eliminação do N-NH_4^+ , sendo recuperado o N mineral total, representado por N-NH_4^+ e N-NO_3^- . Por meio da abundância de ^{15}N verificada, e as respectivas concentrações de cada espécie no extrato de solo, é possível determinar a abundância de ^{15}N no reservatório de N-NO_3^- .

Por fim, a última modificação se deve à abundância isotópica do ^{15}N a ser aplicado no solo. Diversos trabalhos desenvolvidos com solos de clima temperado utilizaram marcações elevadas, da ordem de 90 % (PARKER; SCHIMEL, 2010; DONG et al., 2012). Contudo, em solos de clima tropical sob atividade agrícola são caracterizados por apresentarem reduzido conteúdo de C orgânico, N total e C da biomassa microbiana, por exemplo. Com isso, é provável que não seja necessária a elevação marcação com ^{15}N nas amostras. A redução na abundância de ^{15}N pode apresentar algumas vantagens, como: menor possibilidade de contaminação na linha do espectrômetro de massas, utilização de padrões de trabalho com abundâncias de ^{15}N compatíveis com as amostras e redução no custo de aquisição do composto enriquecido em ^{15}N .

A cana-de-açúcar, importante cultura no cenário energético brasileiro, vem sofrendo mudanças nas formas de manejo no campo. A principal mudança talvez seja a transição da colheita manual com queima prévia do canavial para colheita mecanizada sem despalha à fogo. A colheita sem queima assegura a permanência dos resíduos vegetais (folhas secas e ponteiros) da espécie sobre o solo, o que altera a dinâmica da mineralização-imobilização de N nos sistemas canavieiros. Em vista disso, estudos indicaram que há retorno do N oriundo dos restos culturais e, que a mineralização do N-orgânico contribui, mesmo que em pequena parte, com a nutrição do vegetal (VITTI et al., 2011; HOLST et al., 2012; TRIVELIN et al., 2013).

Adicionalmente, foi demonstrado por pesquisadores que a cana-de-açúcar tem preferência pela forma mineral NH_4^+ (DE ARMAS et al., 1992; ROBINSON et al., 2011), podendo apresentar maior produtividade de colmos quando nutrida preferencialmente por esta forma do N. Esse fato indica a possibilidade de alterações nas formas de manejo dos canaviais visando disponibilizar a cultura N na forma reduzida (amoniacal). Todavia, ainda são necessários estudos científicos mais detalhados acerca desse assunto para a sua devida comprovação.

Outro importante setor agrícola com grande extensão territorial são as pastagens cultivadas no Brasil. A grande maioria dos solos sob pastagem no país são cultivados com poáceas do gênero *Brachiaria*, pela boa adaptabilidade e rusticidade destas espécies. Subbarao (2003) investigou o efeito que a *Brachiaria humidicola* promove no processo da nitrificação. E em trabalhos mais recentes, autores identificaram que as substâncias exsudadas de espécies de braquiárias inibem a atividade de bactérias nitrificantes (SUBBARAO et al., 2009). Dessa forma, é esperado que solos cultivados com espécies de braquiárias por um longo período de tempo apresentem maior teor de NH_4^+ ao invés de NO_3^- .

A exploração da terra que, na maioria das vezes é feita de forma insustentável no manejo de pastagens em sistema extensivo, tem causado a degradação de muitos sistemas agropecuários. Contudo, estas áreas, quando cultivadas com espécies de braquiárias, podem ser consideradas interessantes uma vez que as perdas de N ocasionadas pelo processo de nitrificação podem ser minimizadas, tornando-se locais notáveis para posterior implantação da cana-de-açúcar. Assim, é possível que ocorra melhor desenvolvimento desta cultura pela disponibilidade de N-mineral, preponderantemente, na forma amoniacal.

A alta mobilidade que o N apresenta no solo somada a baixa eficiência de uso dos fertilizantes nitrogenados, a provável preferência da cultura cana-de-açúcar por NH_4^+ e a supressão da nitrificação verificada em pastagens cultivadas com braquiárias, são aspectos que requerem uma avaliação das transformações brutas do N nos solos. Desse modo, esta pesquisa se propõe a investigar os métodos utilizados para emprego da técnica da diluição do isótopo ^{15}N , avaliando assim as taxas de amonificação e nitrificação bruta de N em solos cultivados com cana-de-açúcar e pastagens de braquiária.

Diante do exposto, esta pesquisa apresenta as seguintes hipóteses:

- i) A máxima recuperação de N-NH_4^+ e de N-NO_3^- , ambos marcados com ^{15}N , é obtida após 24 h de agitação durante a metodologia da microdifusão;
- ii) As metodologias de eliminação prévia do N-NH_4^+ e o método de diluição isotópica (considerando-se o N-NH_4^+ e N-NO_3^- presentes no extrato de solo) são eficientes para recuperação do N-NO_3^- por meio do sistema de microdifusão;
- iii) A técnica da diluição do isótopo ^{15}N para determinação das taxas brutas de amonificação e nitrificação de solos tropicais agricultáveis não requer alta marcação de ^{15}N ;
- iv) Solos cultivados com cana-de-açúcar, possuindo maiores taxas de amonificação que de nitrificação brutas, apresentam maiores produtividades em relação à solos com maiores taxas de nitrificação bruta e solos sob pastagens do gênero *Brachiaria*, comparados com os de cultivo tradicional com cana-de-açúcar, possuem menor taxa de nitrificação bruta.

Baseado nas hipóteses acima, objetivou-se desenvolver protocolos para as metodologias utilizadas na avaliação das taxas brutas de amonificação e nitrificação de solos tropicais, com a finalidade de quantificar as taxas de amonificação e de nitrificação brutas em solos tropicais, do Estado de São Paulo, cultivados

sucessivamente com cana-de-açúcar e, em solos sob pastagens com histórico de cultivo de espécies do gênero *Brachiaria*.

Referências

- BARRACLOUGH, D.; GEENS, E.L.; DAVIES, G.P.; MAGGS, J.M. The use of single and double labelled ^{15}N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 593–603, 1985.
- BOECKXA, P.; ACCOEA, F.; BUSSCHAERTA, J.; HOFMANB, G.; VAN CLEEMPUTA, O. Gross N transformation rates and net N mineralisation rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grassland soils of different age. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 2075–2087, 2004.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVARES, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.
- CHRISTENSON, L.M.; LOVETT, G.M.; WEATHERS, K.C. The influence of tree species, nitrogen fertilization, and soil C to N ratio on gross soil nitrogen transformations. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 638-646, 2009.
- D'ANDRÉA, M.S.C. **Mineralização de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 40 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Agrônoma) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- DE ARMAS, R.; VALADIER, M.H.; CHAMPIGNY, M.L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 531-535, 1992.
- HOLST, J.; BRACKINA, R.; ROBINSONA, N.; LAKSHMANANB, P.; SCHMIDTA, S. Soluble inorganic and organic nitrogen in two Australian soils under sugarcane cultivation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 155, p. 16–26, 2012.
- MORAES, M.I.M. **Mineralização bruta (amonificação) de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 625 p.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, p. e19045, 2011.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; OKADA, K. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 413-419, 2003.

SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; SAHRAWAT, K.L.; BERRY, W.L.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; WATANABE, T.; SUENAGA, K.; RONDON, M.; RAO, I.M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-Challenges and opportunities. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 25, p. 303–335, 2006.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADOB, M. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIHASHI, A. T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C. E.; BERRY, W. L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, p. 17302-17307, 2009.

TRIVELIN, P.C.O. Isótopos que não emitem radiações: PARA QUE SERVEM? **Visão Agrícola**, Piracicaba, p. 25-26, 2004.

TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J. Adubação nitrogenada e a sustentabilidade de agrossistemas. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 7, p. 193-219, 2011.

TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FERREIRA, D.A.; VITTI, A.C.; FORTES, C.; FARONI, C.E.; OLIVEIRA, E.C.A.; CANTARELLA, E. Impact of sugarcane trash on fertilizer requirements for São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 345-352, 2013.

VIDELA, C.D.C. **Mineralização bruta do nitrogênio em um Molisol do sudeste da Província de Buenos Aires (Argentina)**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 287-293, 2011.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dinâmica do nitrogênio no solo

Os nutrientes inorgânicos considerados como essenciais aos vegetais são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. O nitrogênio (N) é considerado um elemento essencial, classificado como macronutriente primário para os vegetais por participar das mais diversas estruturas orgânicas e, relacionar-se aos mais importantes processos fisiológicos que ocorrem nas plantas. Taiz e Zeiger (2013) definiram elemento essencial como sendo: “um componente intrínseco na estrutura ou no metabolismo de uma planta ou cuja ausência causa anormalidades graves no crescimento, desenvolvimento e reprodução vegetal”.

Os índices atuais alcançados de produtividade no setor agrícola se devem ao uso de fertilizantes, sobretudo de origem mineral, sendo o N é reconhecidamente um nutriente de grande importância por ser requerido em elevadas quantidades pelas culturas. Dados levantados por Cunha et al. (2014) apontaram um consumo de fertilizantes nitrogenados no Brasil na ordem de 12,2 milhões de toneladas, para o período de 2009 a 2012, sendo excluído deste valor o consumo em áreas de reflorestamento e pastagens (ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA, 2013).

A ciclagem do N no solo é caracterizada por uma série de reações químicas e microbianas, que podem resultar em baixa eficiência de uso pelos vegetais dos fertilizantes nitrogenados, especialmente em situações onde a mineralização líquida de N é elevada (MARIANO et al., 2013). Desse modo, estudos voltados às taxas brutas em solos agrícolas podem ajudar a desvendar os caminhos percorridos pelo N, evitando-se perdas e garantindo um manejo mais adequado do nutriente nos agrossistemas.

O N é um elemento que apresenta um ciclo biogeoquímico complexo por ser naturalmente encontrado no ambiente em grande diversidade de compostos químicos, apresenta múltiplas transformações que ocorrem no sistema solo-planta-atmosfera e, por ser dependente da ação de microrganismos (Figura 1) (CANTARELLA, 2007).

Figura 1 - Ciclo do N no solo. Adaptado de Jansson e Persson (1982) e Herbet (1982)

O N possui seis níveis de oxidação ou valência, a saber: NH_3 (amônia; valência -3); HONH_2 (hidroxilamina; valência -1); N_2 (dinitrogênio; valência 0); HNO (nitroxila; valência +1); NO_2 (nitrito; valência +3); NO_3^- (nitrato; valência +5), o que lhe permite desempenhar seu complexo papel nos processos vitais (CANTARELLA, 2007; TRIVELIN; FRANCO, 2011).

No ar atmosférico o N como molécula dinâmica diatômica (N_2) é o elemento mais abundante (78 % em volume), entretanto as plantas não são capazes de assimilá-lo desse compartimento sem a ajuda de uma microbiota do solo especializada na fixação do N-atmosférico (FBN). No solo, ele pode ser encontrado nas formas de N-orgânico e N-inorgânico, representado nas formas: NH_4^+ , NH_3 , NO_2^- e NO_3^- (CANTARELLA, 2007).

O N-orgânico, complexado na matéria orgânica do solo (MOS), pode representar cerca de 95 % do N total do solo (NTS), por isso é natural que a disponibilidade do elemento às plantas seja baixa (CANTARELLA, 2007). Ácidos nucléicos, bases nitrogenadas, proteínas, peptídeos, ureia, quitina, quitobiase e peptidoglicano são exemplos de formas conhecidas de N-orgânico encontradas na natureza. Entretanto, a grande parte do N-orgânico encontra-se em formas

complexas, muitas delas desconhecidas, sendo apenas uma pequena parte desse material mineralizado. Do N-orgânico total encontrado nos solos apenas cerca de 2 a 5 % são mineralizados por ano, mas de acordo com o tipo de solo este valor pode representar o suficiente no suprimento exigido pelas culturas agrícolas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Diversos autores comprovaram que a principal fonte de N às culturas é derivada da MOS, por meio então, do processo da mineralização (OLK, 2008; DOURADO-NETO et al., 2010; FRANCO et al., 2011)

Para haver liberação do N-inorgânico da MOS é necessária a atuação de microrganismos heterotróficos (quimiorganotróficos). Esse processo que consiste na transformação do N-orgânico em N-mineral é denominado de mineralização, sendo fundamental para a ciclagem do N no sistema (CANTARELLA, 2007). Uma vez presente no solo o N-inorgânico fica sujeito ao consumo e/ou transformações concorrentes. Desse modo, contrapondo-se a mineralização, ocorre o processo de imobilização, que é a incorporação do N-inorgânico em formas orgânicas e que também é mediado por ação da microbiota do solo.

A mineralização do N é composta pelos processos de amonificação e nitrificação, os quais são essências no fornecimento das formas inorgânicas do nutriente para os vegetais. A mineralização é influenciada por fatores abióticos (umidade, temperatura e aeração), associada à qualidade do material orgânico em decomposição (relação C/N) e a quantidade de N-total, presentes no solo. Estes fatores são controladores do desenvolvimento da biomassa microbiana que é responsável pela ciclagem do N (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A amonificação, muitas vezes conhecida como mineralização de N, é o processo de conversão de N-orgânico nas formas amônio (NH_4^+) e/ou amônia (NH_3) (CANTARELLA, 2007). Esta transformação ocorre por meio da degradação enzimática dos compostos orgânicos (LADD; JACKSON, 1982), de forma intracelular ou extracelular (MYROLD; BOTTOMLEY, 2008), sendo governada pela microbiota do solo (fungos, arqueias e bactérias) que ao final do processo excretam o N- NH_4^+ no solo. A disponibilidade de N- NH_4^+ pelos microrganismos irá ocorrer em situações onde o material orgânico apresente estreita relação C/N (BRADY; WEIL, 2007).

Na presença de O_2 os processos mineralização/imobilização são expressivos, enquanto que em condições anóxicas estas transformações ocorrem mais lentamente devido diferenciação das populações microbianas atuantes nos diferentes meios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Dando sequência ao processo de amonificação, pode ocorrer nos solos a nitrificação, que consiste numa primeira etapa na oxidação do NH_4^+ à NO_2^- e posteriormente em NO_3^- . Essas transformações são mediadas por bactérias quimioautotróficas que se utilizam da energia gerada nesses processos para a sobrevivência. As bactérias do gênero *Nitrosomonas* são as principais responsáveis pela transformação inicial, a nitrificação, mas foi observado recentemente que bactérias do gênero *Nitrospira* também agem nesse processo, sendo estas encontradas principalmente em áreas agrícolas. E são as bactérias do gênero *Nitrobacter* responsáveis pelo segundo processo, a nitratação (SCHIMIDT; BELSER, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; CANTARELLA, 2007).

A taxa de nitrificação nos solos é influenciada pela temperatura, umidade, quantidade de NH_4^+ presente solo, acidez do solo, presença e atividade dos microrganismos nitrificadores, uso de fertilizantes, relação C/N da MOS, presença de substâncias tóxicas mas, especialmente, pela presença e concentração de O_2 , pois as bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação não atuam em ambientes anaeróbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; CANTARELLA, 2007; SAHRAWAT, 2008). A adubação e a correção da acidez são práticas normais realizadas pelos agricultores no manejo de solos, que favorecem a atividade de microrganismos nitrificadores, acentuando a quantidade de NO_3^- no solo. Como analisado por D'Andréa et al. (2004) e Subbarao et al. (2006a), o predomínio de NO_3^- no solo é observado principalmente em sistemas com culturas anuais.

Contudo, a produção do NO_3^- (nitrificação) acaba gerando agravantes indesejáveis. Subbarao et al. (2006b) descreveram as diferentes formas de perdas ocasionadas durante o processo de nitrificação sendo elas: a emissão dos gases N_2 , e NO e N_2O ; em condições anaeróbias há ocorrência da desnitrificação do NO_3^- e; além da lixiviação do íon no perfil do solo. As perdas gasosas de N reduz a eficiência do fertilizante causando impactos no ambiente.

Sahrawat (1980) verificou que para uma fertilização nitrogenada na forma de NH_4^+ , 90 % deste foi transformado em NO_3^- após quatro semanas. Somado a isto, Subbarao et al. (2006a) citaram o quão rápida é a conversão, e afirmaram que as taxas de nitrificação são geralmente superiores nos sistemas agrícolas em relação a ecossistemas naturais.

Stark e Hart (1997) comprovaram que o tempo de residência do NO_3^- no solo é reduzido, devido aos processos de consumo desse íon, que se apresentam bastante

ativos. Porém, esta conversão é uma importante fonte de perda de N do sistema e de poluição da atmosfera, uma vez que apresenta o potencial de liberação de gases, dentre eles o NO e N₂O, danosos ao ambiente. Assim, buscar maiores entendimentos nessas transformações é importante por permitir melhor compreensão do comportamento do ciclo do N e, também, da disponibilidade do nutriente às plantas.

2.2 Assimilação do nitrogênio pelas plantas

Os vegetais são capazes de assimilar as formas inorgânicas de N, amônio e NO₃⁻ absorvidas do solo e, ainda obter o N por relações simbióticas com bactérias, proveniente do N molecular (N₂), e assimilar a amônia (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em relação ao N-orgânico, cientistas demonstraram em estudos realizados em laboratório que as plantas assimilam algumas formas do N complexado da MOS (CHAPIN et al., 1993; KIELLAND, 1994; SCHIMEL; CHAPIN, 1996; KIELLAND, 1997; NASHOLM et al., 1998; LIPSON; MONSON, 1998; SCHILLER et al., 1998; RAAB et al., 1999; JONES; KIELLAND, 2002; HENRY; JEFFERIES, 2002). Outros estudos avaliaram a capacidade dos vegetais, auxiliados pelas micorrizas, em absorver aminoácidos (FINLAY et al., 1992), proteínas (ABUZINADAH; READ, 1986; FINLAY et al., 1992), amino-açúcares (KERLEY; READ, 1995) e peptídeos (BAJWA; READ, 1985; ABUZINADAH; READ, 1989). Schimel e Bennett (2004) discutiram que estas formas orgânicas do N absorvidas pelos vegetais são monômeros produzidos à partir da despolimerização da MOS (Figura 2) e, concluíram que a assimilação de N-orgânico é um processo bastante comum ao menos em ambientes onde o N mineral disponível às plantas é insuficiente.

Para Taiz e Zeiger (2013) o crescimento vegetal torna-se favorecido quando há o alcance das duas formas de N, NH₄⁺ e o NO₃⁻, pois ao serem assimiladas desencadeiam no interior da planta um balanço iônico benéfico. Entretanto, pesquisadores confirmaram que algumas espécies vegetais possuem a preferência pela forma amoniacal do N ao invés da nítrica (BUNDY; MEISINGER, 1994; RICHARDSON et al., 2009; ROBINSON et al., 2011).

Figura 2 - Assimilação pelo vegetais das formas de N do solo, adaptado de Schimel e Bennett (2004)

A distribuição das raízes, o teor de umidade, a taxa de desenvolvimento das plantas, os conteúdos de NH_4^+ e NO_3^- em solução no solo, são os fatores que influenciam no aproveitamento do N-mineral pelas plantas (RICHARDSON et al., 2009). Os níveis de NH_4^+ e NO_3^- encontrados no solo são provenientes de uma série de fatores, tais como, as condições ambientais (precipitação e temperatura) e do balanço entre os processos de mineralização e imobilização resultantes da atividade biológica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

O NH_4^+ , um cátion, no solo permanece adsorvido nas superfícies das partículas inorgânicas ou orgânicas que apresentam cargas negativas. Essa forma de N permanecendo adsorvido às partículas representa naturalmente uma reserva no solo ficando protegido e, ao mesmo tempo, disponível às plantas e à microbiota. O NO_3^- por ser um ânion é mantido dissolvido em solução sendo repelido pelas partículas do solo, ficando assim mais vulnerável às perdas, tal como a lixiviação (TAIZ; ZEIGER, 2013). De acordo com Clarkson (1985) tanto o NH_4^+ quanto o NO_3^- presentes no solo podem ser absorvidos em qualquer região da superfície das raízes.

Quando o NH_4^+ e o NO_3^- estão disponíveis em excesso, é possível haver absorção em níveis elevados pelas plantas e serem acumuladas nos tecidos, uma vez que este nutriente é móvel no interior vegetal. Essa habilidade vegetal é uma forma de se garantir sobre a competição contra os microrganismos pelo N-mineral. Entretanto por ser considerado tóxico, o NH_4^+ quando em excesso na planta é rapidamente transformado em aminoácidos. Enquanto que, o NO_3^- , pode ser acumulado e translocado sem causar adversidades no vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A absorção do NH_4^+ , que é auxiliada por transportadores vegetais, ocorre a favor de gradiente de energia livre sem ocasionar gastos de energia (LUDEWIG et

al., 2007). No interior da planta, o NH_4^+ reage com o glutamato que com a ajuda da enzima glutamina sintetase é convertido em glutamina. A glutamina quando em abundância impulsiona a enzima glutamato sintase dando origem a duas moléculas de glutamato. Os aminoácidos (glutamato e glutamina), após serem gerados provenientes do NH_4^+ absorvido pelas plantas, ficam sujeitos às reações de transaminações, para que o grupo amina (NH_2) constituinte possa ser transferido sintetizando outros aminoácidos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O NO_3^- é absorvido pelas raízes vegetais por meio de cotransportadores de nitrato-prótons e, esta absorção, ao contrário do NH_4^+ , requer consumo de energia (RICHARDSON, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013). No interior do vegetal, mais precisamente no citosol, ocorre a redução do NO_3^- em NO_2^- , conversão esta realizada pela enzima redutase do NO_3^- . O NO_2^- formado, considerado tóxico e reativo, é encaminhado para dentro dos plastídeos (raízes) e dos cloroplastos (folhas), onde novamente passará por uma redução, mas agora com auxílio da enzima redutase do NO_2^- , gerando por fim o NH_4^+ (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.3 Técnica isotópica com ^{15}N

Para acompanhar e quantificar os caminhos percorridos pelo N no solo pode ser feito o uso de técnicas isotópicas as quais são realizadas por meio do traçador ^{15}N . O primeiro trabalho publicado que envolveu os traçadores ^{14}N e ^{15}N no ambiente agrícola foi em meados da década de 40, desenvolvido por Norman e Werkman (1943). De acordo com Hauck et al. (1994), esta técnica tem sido bastante usada em processos de transformações e monitoramento do N.

Isótopos de um elemento químico possuem o mesmo número de prótons no núcleo dos átomos (mesmo número de elétrons na eletrosfera) e diferentes números de massa em sua constituição (diferente número de nêutrons no núcleo). Na natureza são naturalmente encontrados os isótopos de N de massas 14 e 15 sendo eles considerados estáveis, e por assim serem não emitem radiações. O ^{14}N apresenta abundância natural de 99,634 % de átomos enquanto que o ^{15}N apresenta 0,366 % (TRIVELIN, 2004).

Na condução de experimentos, pode ser feita alteração da concentração da abundância natural desses isótopos de N (normalmente aumentando-se a abundância de ^{15}N), processo denominado de enriquecimento isotópico, sendo

possível com esses compostos, chamados de traçadores, acompanhar o percurso e a distribuição do N do solo no ar ou para as águas (HAUCK et al., 1994) de forma quantitativa e qualitativa (TRIVELIN, 2004).

Mulvaney (1991) listou três questões fundamentais para estudos que envolvem técnicas isotópicas de transformações do N do solo:

- (i) o N-traçador deve ser distribuído uniformemente por todo o sistema em estudo;
- (ii) o processo ocorre a taxas constantes e;
- (iii) uma vez que a forma do N lábil passa para outro reservatório ele não retorna.

Complementando as questões de Mulvaney (1991), já em 1954, Kirkham e Bartholomew ressaltaram que os microrganismos envolvidos na dinâmica do N dos solos não fazem discriminação quanto ao uso dos traçadores ^{14}N e ^{15}N .

De acordo com Hart e Myrold (1996), existem quatro técnicas que podem avaliar as transformações utilizando o traçador ^{15}N :

- (i) traçador ^{15}N - o substrato ou fonte é marcado com ^{15}N , e o percurso do isótopo é observado através do tempo, de forma quantitativa e/ou qualitativa;
- (ii) diluição do isótopo ^{15}N - um reservatório de N do solo é marcado com ^{15}N e monitora-se a taxa de mudança de seu conteúdo e de seu enriquecimento de ^{15}N , devida diluição pela entrada de ^{14}N ;
- (iii) abundância natural de ^{15}N - pequenas diferenças no enriquecimento isotópico, resultado da ação microbiológica durante o período, avaliando as relações substrato-produto;
- (iv) distribuição dos isótopos de N - técnica do traçador ^{15}N utilizada exclusivamente para a reação de desnitrificação, onde o N do $^{15}\text{NO}_3^-$ da origem ao N_2O e N_2 .

Quando se deseja quantificar as taxas de amonificação e nitrificação brutas é necessário o uso da técnica diluição do isótopo ^{15}N que é a única capaz de gerar resultados de taxas brutas, que independem de transformações concorrentes como

a imobilização e nitrificação, tratando-se, pois, de índices reais de difícil mensuração (BARRACLOUGH et al., 1985; BOECKXA et al., 2004; CHRISTENSON et al., 2009).

Para estimar a taxa de amonificação bruta, a técnica envolve o enriquecimento do NH_4^+ do solo com o isótopo ^{15}N (marcação isotópica com NH_4^+ exógeno enriquecido em ^{15}N). O NH_4^+ do solo é originário da amonificação da MOS que possui abundância natural do isótopo ^{15}N . O NH_4^+ do solo, após a marcação, deverá sofrer diluição isotópica pela amonificação da MOS, pelo influxo de NH_4^+ com abundância isotópica natural para N, já que nas vias de consumo de NH_4^+ pela nitrificação e imobilização biológica, por exemplo, é extraído tanto o ^{14}N como o ^{15}N em proporção constante, em um dado intervalo de tempo (VIDELA, 2004; D'ANDRÉA, 2012).

As taxas de amonificação bruta são geralmente baixas, não assumem valores maiores que $10 \text{ mg de N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (VIDELA, 2004). Essa transformação apresenta maiores taxas nas camadas superficiais dos solos, decrescendo com a profundidade no solo. Esse fato pode ser atribuído, possivelmente, à menor atividade microbiana nas camadas em subsuperfície e, também, pelo menor teor de MOS com a profundidade (ZAMAN et al., 2004; D'ANDRÉA, 2012).

A taxa de nitrificação bruta dos solos, que também pode ser avaliada pela técnica de diluição do isótopo ^{15}N , se assemelha do descrito para a amonificação bruta. Contudo, nesse caso marca-se o compartimento NO_3^- do solo com ^{15}N (marcação com NO_3^- exógeno enriquecido em ^{15}N) e monitora-se a diluição do isótopo no NO_3^- do solo, em um dado período de tempo, que ocorrerá devido a entrada de NO_3^- com abundância natural nos isótopos de N, originário do processo de nitrificação do NH_4^+ com abundância natural (BARRACLOUGH et al., 1985).

Observar as taxas brutas de transformação do N oriundos do N-orgânico gera conhecimento do potencial do solo em disponibilizar N às plantas. Apesar da grande relevância, poucos são os trabalhos envolvendo solos tropicais que exploram essas taxas.

Davidson et al. (1991) pesquisaram, em amostras de solos não perturbadas, a eficiência da metodologia da diluição do isótopo ^{15}N sobre as taxas brutas de mineralização, imobilização e nitrificação. Embora tenham feitos algumas ressalvas das limitações do método, quando corretamente utilizado, torna-se uma importante ferramenta na medição desses processos. Assim, estudos diversos podem ser realizados por meio da técnica de diluição do isótopo ^{15}N . Parker e Schimel (2010)

utilizaram recentemente a técnica da diluição do isótopo ^{15}N , para quantificar as taxas de amonificação e nitrificação brutas, com o intuito de observar a magnitude que plantas invasoras exercem sobre estas taxas envolvidas na ciclagem do N.

Existem ainda outras técnicas capazes de quantificar as transformações do N no solo, as quais não utilizam dos traçadores isotópicos. Os métodos mais utilizados baseados na incubação-lixiviação de amostras de solo, por um período que variam de 1 a 32 semanas, em condições aeróbias e anaeróbias, em local onde umidade e temperatura são controladas, e quantificam a mineralização líquida de N (MLN) (KEENEY; BREMNER, 1966; STANFORD; SMITH, 1972).

A metodologia da MLN foi considerada ideal para mensurar o N disponível às plantas, porém, com o desenvolvimento científico observou-se as limitações desta técnica. Por ser realizada sem a presença do vegetal, a MLN permite que o N mineralizado, que a princípio poderia ser assimilado, seja imobilizado, gerando resultados embora positivos, de pequena grandeza e até valores negativos. Assim, foi concluído que o resultado da MLN é um índice e, não podendo ser considerado como estimativa do potencial do solo em disponibilizar N aos vegetais (SCHMIDT et al., 1999; SCHIMEL; BANNETT, 2004).

Conforme Videla (2004), as técnicas de avaliação de MLN são consideradas “medições simplistas”, por não excluirmos os processos que consomem o NH_4^+ liberado ao solo, portanto não demonstram o que realmente ocorreria no sistema. Observando a Figura 3, fica evidente que independente das taxas de mineralização e imobilização o produto da MLN pode apresentar valores equivalentes, devido a baixa atividade microbiana do solo ou ainda pelos processos ocorrerem em caminhos opostos. Contudo, comprova-se a eficiência e a importância de utilizar como ferramenta de estudo, as taxas brutas, no intuito de verificar o potencial do solo em fornecer N-mineral proveniente dos processos de amonificação e nitrificação (D’ANDRÉA, 2012).

Situação 1:

Situação 2:

Figura 3 - Diferentes situações esquemáticas do processo de Mineralização Líquida (VIDELA, 2004)

2.4 Cana-de-açúcar

A cultura cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é de elevada importância para o setor energético brasileiro, por ser uma fonte de energia alternativa ambientalmente sustentável e renovável. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), o Estado de São Paulo continua sendo destaque nas projeções do setor canavieiro brasileiro. Estimativas para a safra de 2014/2015 indicaram área plantada com cana-de-açúcar de cerca de 9,1 milhões de hectares, sendo que a produção esperada da cultura, em termos de cana moída de 671,7 milhões de toneladas tem previsão de aumento de 2 % em relação a safra de 2013/2014 (CONAB, 2014). Entretanto, apesar de o país ser líder mundial na produção de cana-de-açúcar, sua produtividade média (73 t ha^{-1}) ainda está muito aquém do potencial produtivo genético da cultura, que pode alcançar valores superiores a 300 t ha^{-1} de colmos (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008; DE OLIVEIRA, 2011; CONAB, 2014).

A produtividade da cultura pode ser limitada pelas condições edafoclimáticas presentes, disponibilidade hídrica, e teores de nutrientes no solo, além de práticas inadequadas de manejo (OLIVEIRA, 2011). Relacionado aos fertilizantes nitrogenados, estudos apontam que a cana-de-açúcar apresenta melhor desenvolvimento quando exposta a maiores teores de N do solo na forma de NH_4^+ em relação ao NO_3^- (DE ARMAS et al., 1992; ROBINSON et al., 2011). No estudo de De Armas et al. (1992) foi observado maior peso e altura de parte aérea, maior desenvolvimento foliar e maior diâmetro de caule em plantas de cana-de-açúcar que foram nutridas com NH_4^+ comparativamente às nutridas com NO_3^- . Outro trabalho que mostrou fortes indícios da preferência da cana-de-açúcar pela forma mineral de N-NH_4^+ foi apresentado por Robinson et al. (2011). O exemplo exposto aponta para o desenvolvimento de estudos voltados ao manejo de canaviais, visando disponibilizar a cultura a forma amoniacal de N como uma estratégia no aumento de produtividade canavieira no Brasil.

Nesse sentido, o manejo da cultura cana-de-açúcar tem sofrido transformações nos últimos anos. A colheita mecanizada sem despalha a fogo (popularmente conhecida como “cana-crua”) é uma prática que vem sendo bastante difundida nas áreas de produção. O sistema de colheita “cana-crua” garante a permanência dos resíduos culturais (folhas secas e verdes, ponteiros e pedaços de colmo) recobrindo

o solo e que, conseqüentemente, desencadeia mudanças no comportamento biológico, físico e químico dos agrossistemas canavieiros. A palhada deixada sobre o solo possui alta da relação C/N, da ordem de 80, o que tende a promover aumento no processo de imobilização de N. Desse modo, tem-se recomendado incrementos nas doses de fertilizantes nitrogenados em áreas de “cana-crua”. Porém, pesquisas mais aprofundadas são necessárias para observar a reação comportamental no ciclo do N (ROSSETTO et al., 2010; OTTO et al., 2013).

Rossetto e Dias (2005) enfatizaram que a manutenção e o aumento da produtividade da cana-de-açúcar podem ser auxiliados pelo acréscimo de matéria orgânica proveniente dos resíduos vegetais da própria cultura (palhada, torta e vinhaça), além, é claro, de outros fatores determinantes como o uso de fertilizantes e corretivos.

Outra discussão relevante, diz respeito ao cálculo da fertilização nitrogenada. Para isso, deve ser levado em conta o quanto do nutriente é extraído e exportado pela cultura. Além disso, agricultores não consideram a contribuição da MOS na disponibilização de N através da mineralização. A recomendação de N, portanto, pode tornar-se excessiva, podendo parte do N aplicado ao solo ser perdido do sistema solo-planta (DINNES et al., 2002; SUBBARAO et al., 2006b). Avalia-se ainda, que 30 % dose de N-fertilizante aplicado é aproveitado pela cana-de-açúcar na primeira soca (FRANCO et al., 2011).

Foi observado em diversos estudos utilizando o traçador ^{15}N , que o N mineralizado do solo é também uma importante fonte de N requerido pelas plantas (TRIVELIN et al., 1995; PRASERTSAK et al., 2002; GAVA et al., 2003; OLK, 2008; DOURADO-NETO et al., 2010; FRANCO et al., 2011). Vitti et al. (2011), ainda confirmaram que o N proveniente da mineralização da palhada e das raízes, aumenta significativamente com a evolução do ciclo da cana-de-açúcar, mas ressalva que este N não é tão expressivo para a nutrição vegetal. Holst et al. (2012) também considera que, pelo fato da baixa eficiência dos fertilizantes nitrogenados, compreende-se que a cana-de-açúcar absorva grande conteúdos de N provenientes da mineralização do solo.

Com o uso das práticas conservacionistas (sem a queima prévia da palha da cultura para a colheita), diversos autores discutem sobre o N remanescente dos resíduos vegetais (TRIVELIN et al., 2002) e estimam um retorno de 30 a 60 kg ha⁻¹ N para o solo (MEIER et al., 2006; ROBERTSON; THORBURN, 2007), auxiliando,

portanto, a reciclagem e a manutenção do N no sistema. Entretanto, Trivelin et al. (2013) concluíram que este retorno entra em equilíbrio após 40 anos de manutenção dos resíduos sobre o solo.

Basanta et al. (2003), avaliando os efeitos causados pela colheita da cana-de-açúcar sem queima, havendo depósito de resíduos vegetais da cultura sobre o solo, avaliaram que em sistema de cana-crua a ciclagem do N-fertilizante torna-se mais eficiente, reduzindo a dependência dos fertilizantes nitrogenados.

2.1 Braquiária

Outro expressivo setor agrícola no Brasil diz respeito à produção de carne bovina, que continua sendo realizada predominantemente de forma extensiva. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2011), apenas 3 % dos animais no país são criados sob sistema intensivo. O rebanho é descrito com em torno de 208 milhões de cabeças criado em 172 milhões de hectares de pastagem, o que faz do Brasil o segundo maior produtor mundial em carne bovina.

No Brasil, era comum até a década de 70, as pastagens serem constituídas de vegetação nativas ou “naturalizadas”, como o capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), o capim-gordura (*Melinis minutiflora*) e, em destaque, o capim-colonião (*Panicum maximum*). Mas foi entre as décadas de 70 e 80, que plantas do gênero *Brachiaria* passaram a ocupar as áreas de pastagens de forma expressiva, consequentemente, substituindo as gramíneas consideradas de baixa produção. A princípio as terras foram sendo renovadas com a implantação da *Brachiaria decumbens*. Mas, com a chegada de uma praga, conhecida por cigarrinha-das-pastagens, o capim-braquiarão - *Brachiaria brizantha* cv. Marandu - passou então ser a gramínea de maior cultivo. De acordo com Costa et al. (2007), esta espécie continua sendo a mais utilizada nas pastagens (MARTHA JÚNIOR et al., 2007).

A implantação e o contínuo uso das espécies do gênero *Brachiaria* até os dias de hoje, se deve à boa adaptabilidade às condições edafoclimáticas tropicais (BARCELLOS, 1996; PAULINO; TEIXEIRA, 2009). A rusticidade e o bom desenvolvimento em solos de baixa fertilidade garantiram o potencial de uso desta espécie principalmente nas regiões do Cerrado.

Tem-se estimado atualmente, em torno de 61 milhões de hectares de pastagens cultivadas no Cerrado. No entanto, os pastos dessa região encontram, na atualidade, degradados e os solos inapropriados para o desenvolvimento de lavouras de grãos. Este fato, unido ao manejo inadequado e a forma extrativista dos agropecuaristas na exploração destas áreas culminaram na perda de produtividade e qualidade da gramínea e numa degradação do solo ainda mais acentuada, tornando-se o sistema insustentável. Essa agravante afeta diretamente a produção de carne, que por sua vez está sobre crescente demanda com o aumento populacional terrestre (MARTHA JÚNIOR et al., 2007).

Tal problema, característico no setor agropecuário do país, faz pesquisadores buscarem estudos para adequar o manejo através do uso de corretivos e fertilizantes. Fagundes et al. (2006), por exemplo, observou melhor desenvolvimento vegetal (alongamento foliar, porcentagem de colmo, índice de área foliar) e menor percentual de material morto com a utilização de doses crescentes de N em *B. decumbens*. Rodrigues (2002), que desenvolveu seu estudo em área de pastagem degradada realizando adubação corretiva, também observou efeitos significativos entre a fertilização nitrogenada e a produção de matéria seca da parte aérea e de raízes, concluindo que foi o nutriente que mais atuou sobre os atributos estudados.

Todavia, mesmo com diversas pesquisas científicas realizadas, o setor continua enfrentando dificuldades. Os custos da produção do gado de corte, entre os anos de 2012 e 2013, obtiveram um aumento médio de 13,5 %, reduzindo assim a rentabilidade do produtor (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2013). Outra questão desfavorável relacionada à pecuária, no Cerrado, é a forte demanda/procura do uso da terra pelas culturas de cana-de-açúcar e soja (MARTHA JÚNIOR et al., 2007).

2.5 Exsudados de raízes de braquiárias: efeito inibitório na nitrificação

As raízes além de absorver água e nutrientes, apresenta também a finalidade de excretar substâncias orgânicas ao solo. Essas substâncias são classificadas como exsudados, secreções e mucilagens e são capazes de afetar os fatores físicos, químicos e biológicos do ambiente. É possível uma planta liberar até 100 mg g⁻¹ raiz dia⁻¹ de compostos orgânicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Alguns compostos excretados agem de forma benéfica sobre a vegetação e sobre a comunidade microbiana do solo, porém há outros que podem inibir o desenvolvimento tanto das plantas quanto as atividades da microfauna. Este efeito é conhecido como alelopatia, em que os compostos químicos excretados pelas plantas e/ou os resíduos vegetais deixados sobre o solo atuam nos elementos do ambiente de forma direta ou indireta (ALMEIDA, 1988; SOUZA et al., 2006).

De acordo com Parker e Schimel (2010), existem plantas capazes de alterar a disponibilidade do N afetando as taxas de absorção deste nutriente pelas plantas e ainda os processos microbiológicos envolvidos. Algumas espécies de gramíneas forrageiras também podem afetar o funcionamento do ciclo do N no solo, sobretudo no processo de nitrificação (CANTARELLA, 2007). Como exemplo, Brown e Morra (2009), observaram que resíduos de espécies da família Brassicaceae apresentam uma substância capaz de inibir o processo de nitrificação no solo.

Atualmente, inúmeros trabalhos de um específico grupo de pesquisa internacional têm avaliado o efeito inibitório que espécies de *Brachiaria* exercem sobre a nitrificação (SUBBARAO et al., 2003, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008, 2009; GOPALAKRISHNAN et al., 2007). Tais estudos comprovam que substâncias exsudadas pelas *B. humidicola*, *B. decumbens*, *B. dictyonara*, *B. hybrid* e *B. brizantha* promovem efeito inibitório da nitrificação biológica no solo.

Subbarao et al. (2009), observaram que o efeito inibitório é proveniente da substância exsudada, conhecida por diterpeno cíclico, a qual foi denominada de “braquiolactana” (Figura 4). Uma vez liberada no solo, a braquiolactana inibe a atividade da bactéria *Nitrosomonas europaea* ocasionando a paralisação das enzimas amônia mono-oxigenase e hidroxilamina oxidoreductase, que são essenciais no processo de nitrificação (SUBBARAO et al., 2007a, 2007b, 2008).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura química da braquiolactana, exsudada de *Brachiaria humidicola* (SUBBARAO et al., 2009)

A braquiolactana é um composto pertencente à família dos terpenos. Os terpenos são substâncias produzidas pelas plantas a partir da acetil-CoA ou de intermediários glicólicos. Estão classificadas como metabólicos secundários, isto é, são compostos orgânicos que não atuam de forma direta no crescimento e desenvolvimento vegetal e podem ser restritos quanto à espécie (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Souza et al. (2006), avaliou que o crescimento de varias culturas (algodão, arroz, braquiária, feijão, milho e soja) foi afetado quando teores de matéria seca de *B. decumbens* foram incorporados ao solo. Em todas as culturas foi verificada uma redução no conteúdo de NO_3^- do solo, confirmando o efeito alelopático exercido pela braquiária.

Gopalakrishnan et al. (2009), observou em seu estudo que o composto exsudado pela *B. humidicola* não atinge outras populações microbianas do solo ou o desenvolvimento da planta. Dessa forma, a promoção da inibição da nitrificação biológica a partir do cultivo com a espécie forrageira parece ser uma forma bastante interessante, já que pode mitigar perdas ocasionadas durante o processo da nitrificação.

Atualmente existem diversos produtos sintéticos disponíveis no mercado com o objetivo de inibir a nitrificação do NH_4^+ presente em fontes de N (Nitrapirina, DCD, DCP, DMPP, N-MPPA). Entretanto, segundo Fillery (2007), os resultados podem não ser satisfatórios e, o retorno econômico investido nestas tecnologias ainda é incerto. O autor ainda explicitou que embora os inibidores sintéticos da nitrificação sejam de mais baixo custo, aqueles produzidos a partir de raízes das plantas ou de microrganismos natisfera de pastagens seriam os mais eficientes.

Comparando com os inibidores sintéticos mais utilizados: nitrapirina e dicianodiamida, com a braquiolactana, esta última apresenta grande potencial como inibidora mais efetiva da nitrificação. A substância natural demonstrou valores de supressão da nitrificação entre 60 a 96 % (SUBBARAO et al., 2009).

Referências

ABUZINADAH, R.A.; READ, D.J. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. III. Protein utilization by *Betula*, *Picea*, and *Pinus* in mycorrhizal association with *Hebeloma crustuliniforme*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 103, p. 507–514, 1986.

_____. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants IV. The utilization of peptides by birch (*Betula pendula* L.) infected with different mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 112, p. 55–60, 1989.

ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.S. **Agricultura tropical: quatro anos décadas de inovação tecnológica, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2008. v. 1: Produção e produtividade agrícola, 2008.

ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 1988. 60 p. (IAPAR. Circular, 53).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Perfil da pecuária brasileira, 2011**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 15 mai. 2014.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Anuário estatístico de setor de fertilizantes - 2012**. São Paulo, 2013. 176 p.

BAJWA, R.; READ, D.J. The biology of mycorrhizae in the Ericaceae. IX. Peptides as nitrogen sources for the ericoid endophyte and for mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 101, p. 459–467, 1985.

BARCELLOS, A.O. Sistemas extensivos e semi-intensivos de produção: pecuária bovina de corte nos Cerrados. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO BIODIVERSIDADE E PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE ALIMENTOS E FIBRAS NOS CERRADOS, 8., 1996, Brasília. **Anais...** p. 130-136.

BARRACLOUGH, D.; GEENS, E.L.; DAVIES, G.P.; MAGGS, J.M. The use of single and double labelled ^{15}N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 593–603, 1985.

BASANTA, M.V.; DOURADO-NETO, D.; REICHART, K.; BACCHI, O.O.S.; OLIVEIRA, J.C.M.; TRIVELIN, P.C.O.; TIMM, L.C.; TOMINAGA, T.T.; CORRECHEL, V.; CASSARO, F.A.M.; PIRES, L.F.; MACEDO, J.R. Management effects of nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 116, p. 235–248, 2003.

BOECKXA, P.; ACCOEA, F.; BUSSCHAERTA, J.; HOFMANB, G.; VAN CLEEMPUTA, O. Gross N transformation rates and net N mineralisation rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grassland soils of different age. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 2075–2087, 2004.

BRADY, N.; WEIL, R.R. **The nature and properties of soils**. 14thed. New Jersey: Prentice-Hall, 980 p., 2007.

BROWN, P.D.; MORRA, M.J. Brassicaceae tissues as inhibitors of nitrification in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 7706–7711, 2009.

BUNDY, L.G.; MEISINGER, J.J. Nitrogen availability indices. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. pt. 2: Microbiological and biochemical properties, p. 951-984.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVARES, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CHAPIN III, F.S.; MOILANEN, L.; KIELLAND, K. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. **Nature**, London, v. 361, p. 150–153, 1993.

CHRISTENSON, L.M.; LOVETT, G.M.; WEATHERS, K.C. The influence of tree species, nitrogen fertilization, and soil C to N ratio on gross soil nitrogen transformations. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, n.2, p. 638-646, 2009.

CLARKSON, D.T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 77-116, 1985.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 1: Safra 2014/2015; n. 1: Primeiro levantamento, Brasília, 25 p., 2014.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Balanço 2013 perspectivas 2014**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

COSTA, B.R.F.; PIERANGELI, M.A.P.; RUPPIN, R.F. Caracterização da fertilidade de solos da região do Vale do Alto Guaporé, sudoeste do estado de Mato Grosso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 21., 2007, Gramado. **Anais...** Gramado, 2007.

CUNHA, J.F.; FRANCISCO, E.A.B.; CASARIN, V.; PROCHNOW, L.I. **Balanço de nutrientes na agricultura brasileira: 2009 a 2012**. Piracicaba, 2014. 13 p. (Informações Agronômicas, 145).

D'ANDRÉA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; GUILHERME, L.R.G. Estoque de carbono e nitrogênio e formas de nitrogênio mineral em um solo submetido a diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 179-186, 2004.

D'ANDRÉA, M.S.C. **Mineralização de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 40 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Agrônoma) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

DAVIDSON, E.A.; HART, S.C.; SHANK, C.A.; FIRESTONE, M.K. Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. **Journal of Soil Science**, Baltimore, v. 42, p. 335-349, 1991

DE ARMAS, R.; VALADIER, M.H.; CHAMPIGNY, M.L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p.531-535, 1992.

DINNES, D.L.; KARLEN, D.L.; JAYNES, D.B.; KASPAR, T.C.; HATFIELD, J.L.; COLVIN, T.S.; CAMBARDELLA, C.A. Nitrogen management strategies to reduce nitrate leaching in tile drained Midwestern soils. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 153–171, 2002.

DOURADO-NETO, D.; POWLSON, D.; ABU-BAKAR, R.; BACCHI, O.O.S.; BASANTA, M.V.; THO CONG, P.; KEERTHISINGHE, G.; TIMM, L.C.; WANG, J.Y.; ZAGAL, E.; KESSEL, C. Multi season recoveries of organic and inorganic-15 in tropical cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 139-152, 2010.

FAGUNDES, J.L.; FONSECA, D.M.; MISTURA, C.; MORAIS, R.V.; VITOR, C.M.T.; GOMIDE, J.A.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; CASAGRANDE, D.R.; COSTA, L.T. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiária em pastagem adubada com nitrogênio avaliadas nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p.2 1-29, 2006.

FILLERY, I.R.P. Plant-based manipulation of nitrification in soil: a new approach to managing N loss? **Plant and Soil**, The Hague, v. 294, p. 1-4, 2007.

FINLAY, R.D.; FROSTEGARD, A.; SONNERFELDT, A.M. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl.ex Loud. **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, p. 105-115, 1992.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.121, p.29-41, 2011.

GAVA, G.J.C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W. Recuperação do nitrogênio (^{15}N) da uréia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 621-630, 2003.

GOPALAKRISHNAN, S.; WATANABE, T.; PEARSE, S.J.; ITO, O.; HOSSAIN, Z.A.K.M.; SUBBARAO, G.V. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria humidicola* roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 55, p. 725–733, 2009

GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p.1385-1388, 2007.

HART, S.C.; MYROLD, D.D. ^{15}N tracer studies of soil nitrogen transformations. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225-245.

HAUCK, R.D.; MEISINGER, J.J.; MULVANEY, R.L. Practical considerations in the use of nitrogen tracers in agricultural and environmental research. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. pt. 2: Microbiological and biochemical properties, p. 907-950.

HENRY, H.; JEFFERIES, R. Free amino acid, ammonium and nitrate concentrations in soil solutions of a grazed coastal marsh in relation to plant growth. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 25, p. 665–675, 2002.

HERBET, J. Nitrogen. In: BONNEAU, M.; SOUCHER, B. (Ed.). **Constituents and properties of soil**. New York: Academic Press, 1982. p. 435-442.

HOLST, J.; BRACKINA, R.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Soluble inorganic and organic nitrogen in two Australian soils under sugarcane cultivation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 155, p. 16–26, 2012.

JANSSON, S.L.; PERSSON, J. Mineralization and immobilization of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA; SSSA, 1982. p. 225-252.

JONES, D.; KIELLAND, K. Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 209-219, 2002.

KEENEY, D.R.; BREMNER, J.M. Comparison and evaluation of laboratory methods of obtaining an index of soil nitrogen availability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 58, p. 498-503, 1966.

KERLEY, S.J.; READ, D.J. The biology of mycorrhizal in the Ericaceae. XVIII. Chitin degradation by *Hymenoscyphus ericae* and transfer of chitin-nitrogen to the host plant. **New Phytologist**, Cambridge, v. 131, p. 369–375, 1995.

KIELLAND, K. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. **Ecology**, Ithaca, v. 75, p. 2373-2383, 1994.

_____. Role of free amino acids in the nitrogen economy of arctic cryptogams. **Écoscience**, Sainte-Foy, v. 4, p. 75-79, 1997.

KIRKHAM, D.; BATHOLOMEW, W.V. Equations for following nutrient transformations in soil, utilizing tracer data. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 18, p. 33-34, 1954.

LADD, J.N.; JACKSON, R.B. Biochemistry of ammonification. In: STEVENSON, F.J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA; SSSA, 1982. p. 173-228.

LIPSON, D.; MONSON, R. Plant-microbe competition for soil amino acids in the alpine tundra: effects of freeze-thaw and dry-rewet events. **Oecologia**, Berlin, v. 113, p. 406-414, 1998.

LUDEWIG, U.; NEUHAUSER, B.; BYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2301-2308, 2007.

MARIANO, E.; TRIVELIN, P.C.O.; LEITE, J.M.; MEGDA, M.X.V.; OTTO, R.; FRANCO, H.C.J. Incubation methods for assessing mineralizable nitrogen in soils under sugarcane. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 450-461, 2013.

MARTHA JÚNIOR, G.B.; VILELA, L.; BARCELLOS, A.O.; SOUZA, D.M.G.; BARIONI, L.G. Pecuária de corte no Cerrado: aspectos históricos e conjunturais. In: MARTHA JÚNIOR, G.B.; VILELA, L.; SOUZA, D.M.G. (Ed.). **Cerrado: uso eficiente de corretivos e fertilizantes em pastagens**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. p. 17-42.

MEIER, E.A.; THORBURN, P.J.; WEGENER, M.K. BASFORD, K.E. The availability of nitrogen from sugarcane trash on contrasting soils in the wet tropics of North Queensland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 75, p. 101-114, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MULVANEY, R.L. Some recent advances in the use of nitrogen-15 for research on nitrogen transformations in soil. In: FAO. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies**. Vienna, 1991. p. 283-296.

MYROLD, D.D.; BOTTOMLEY, P.J. Nitrogen mineralization and immobilization. In: SCHEPERS, J.S.; RAUN, W.R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural systems**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 2008. p. 157-172. (Agronomy Monograph, 49).

NASHOLM, T.; EKBLAD, A.; NORDIN, A.; GIESLER, R.; HOGBERG, M.; HOGBERG, P. Boreal forest plants take up organic nitrogen. **Nature**, London, v. 392, p. 914-916, 1998.

NORMAN, A.G.; WERKMAN, C.H. The use of N¹⁵ in determining N recovery from plant materials decomposing in soil. **Journal of the American Society of Agronomy**, Madison, v. 35, p. 1023-1025, 1943

OLIVEIRA, E.C.A. **Balanço nutricional da cana-de-açúcar relacionado à adubação nitrogenada**. 2011. 213 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

OLK, D.C. Organic forms of soil nitrogen. In: SCHEPERS, J.S.; RAUN, W.R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural systems**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 2008. p. 57-100. (Agronomy Monograph, 49).

OTTO, R.; MULVANEY, R.L.; KHAN, S.A.; TRIVELIN, P.C.O. Quantifying soil mineralization to improve fertilizer nitrogen management of sugarcane. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 893-904, 2013.

PARKER, S.S.; SCHIMEL, J.P. Invasive grasses increase nitrogen availability in California grassland soils. **Invasive Plant Science and Management**, Lawrence, v. 3, p. 40-47, 2010.

PAULINO, V.T.; TEIXEIRA, E.M.L. **Sustentabilidade de pastagens: manejo adequado como medida redutora da emissão de gases de efeito estufa**. Nova Odessa: IZ, 2009. 16 p. (CPG – Produção Animal Sustentável, Ecologia de Pastagens). Disponível em: <<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1261419672.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

PRASERTSAK, P.; FRENEY, J.R.; DENMEAD, O.T.; SAFFIGNA, P.G.; PROVE, B.G.; REGHENZANI, J.R. Effects of fertilizer placement on nitrogen loss from sugarcane in tropical Queensland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Amsterdam, v. 62, p. 229-239, 2002.

RAAB, T.; LIPSON, D.; MONSON, R. Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: plant and soil processes. **Ecology**, Ithaca, v. 80, p. 2408–2419, 1999.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 305–339, 2009.

ROBERTSON, F.A.; THORBURN P.J. Decomposition of sugarcane harvest residue in different climatic zones. **Soil Research**, Rome, v.45, p. 1–11, 2007.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, p. e19045, 2011.

RODRIGUES, R.C. **Calcário, nitrogênio e enxofre para a recuperação do capim-braquiária cultivado em solo proveniente de uma pastagem degradada**. 2002. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ROSSETTO, R.; DIAS, F.L.F. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar:** indagações e reflexões. Piracicaba: IPNI, 2005. 6 p. (Encarte de informações Agronômicas, 110).

ROSSETTO, R.; DIAS, F.L.F.; LANDELL, M.G.A.; CANTARELLA, H.; TAVARES, S.; VITTI, A.C.; PERECIN, D.N and K fertilization of sugarcane ratoons harvested without burning. **Proceeding International Society Cane Technology**, Veracruz, v. 27, p. 1-8, 2010.

SAHRAWAT, K.L. Nitrification in some tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.65, p. 281–286, 1980.

_____. Factors affecting nitrification in soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 39, p. 1436-1446, 2008.

SCHILLER, P.; HEILMEIER, H.; HARTUNG, W. Uptake of amino acids by the aquatic resurrection plant *Chamaejasme intrepidus* and its implication for N nutrition. **Oecologia**, Berlin, v. 117, p. 63-69, 1998.

SCHIMEL, J.P.; BENNETT, J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. **Ecology**, Ithaca, v. 85, p. 591-602, 2004.

SCHIMEL, J.P.; CHAPIN III, F.S. Tundra plant uptake of amino acid and NH_4^+ nitrogen in situ: plants compete well for amino acid N. **Ecology**, Ithaca, v. 77, p. 2142–2147, 1996.

SCHMIDT, I.K.; JONASSON, S.; MICHELSEN, A. Mineralization and microbial immobilization of N and P in arctic soils in relation to season, temperature and nutrient amendment. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 11, p. 147–160, 1999.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C.A. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, p. 657-668, 2006.

STANFORD, F.; SMITH, S.J. Nitrogen mineralization potentials of soil. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 36, p. 465-472, 1972.

STARK, J.M.; HART, S.C. High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forest. **Nature**, London, v. 385, p. 64-65, 1997.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; OKADA, K. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 413-419, 2003.

SUBBARAO, G.V.; WANG, H. Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W. L. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 290, p. 245–257, 2007b.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; WANG, H. Y.; BERRY, W. L. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 288, p. 101-112, 2006a.

SUBBARAO, G.V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W.L. Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil**, The Hague, v. 294, p. 5–18, 2007a.

SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; SAHRAWAT, K.L.; BERRY, W.L.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; WATANABE, T.; SUENAGA, K.; RONDON, M.; RAO, I.M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-Challenges and opportunities. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 25, p. 303–335, 2006b.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; BERRY, W.L. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. **Plant and Soil**, The Hague, v. 313, p. 89–99, 2008.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADOB, M. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIHASHI, A. T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C. E.; BERRY, W. L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, p. 17302-17307, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TRIVELIN, P.C.O. Isótopos que não emitem radiações: PARA QUE SERVEM? **Visão Agrícola**, Piracicaba, p. 25-26, 2004.

TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J. Adubação nitrogenada e a sustentabilidade de agrossistemas. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 7, p. 193-219, 2011.

TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L.; RODRIGUES, J.C.S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-¹⁵N e uréia-¹⁵N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 1375-1385, 1995.

TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FERREIRA, D.A.; VITTI, A.C.; FORTES, C.; FARONI, C.E.; OLIVEIRA, E.C.A.; CANTARELLA, E. Impact of sugarcane trash on fertilizer requirements for São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 345-352, 2013.

TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C.; G. A. SARRIÉS. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 637-646, 2002.

VIDELA, C.D.C. **Mineralização bruta do nitrogênio em um Molisol do sudeste da Província de Buenos Aires (Argentina)**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 287-293, 2011.

ZAMAN, M.; MATSUSHIMA, M.; CHANG, S. X.; INUBUSHI, K.; NGUYEN, L.; GOTO, S.; KANEKO, F.; YONEYAMA, T. Nitrogen mineralization, N₂O production and soil microbiological properties as affected by long-term applications of sewage sludge composts. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 101–109, 2004.

3 TEMPO DE AGITAÇÃO PARA MICRODIFUSÃO (RECUPERAÇÃO) DE NITROGÊNIO MINERAL EM AMOSTRAS LÍQUIDAS

Resumo

Microdifusão é uma técnica utilizada para a concentração de N-NH_4^+ e N-NO_3^- (após redução à NH_4^+) presentes em extratos de solo. A retenção do N é realizada por meio de uma armadilha contendo um disco de microfibras acidificado, envolto por uma película de politetrafluoroetileno. O objetivo do estudo foi determinar o tempo de agitação necessário para a máxima recuperação via microdifusão do N mineral presente em amostras líquidas. Foram feitas soluções com água ultrapura contendo diferentes concentrações de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e ^{15}N -mineral ($\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$). As amostras foram submetidas à agitação por 24, 48, 72 e 96 h, sendo utilizada uma armadilha por amostra. MgO e liga de Devarda foram utilizados para alcalinização do meio e redução do NO_3^- à NH_4^+ respectivamente. A avaliação foi feita através da retenção da $^{15}\text{NH}_3$ (proveniente do $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e, da redução do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ em $^{15}\text{NH}_3$) em disco de microfibras acidificado que na sequência, foi analisado em espectrômetro de massas. O tempo de 48 h foi ideal para a recuperação quantitativa do N-NH_4^+ e N -mineral. Para a recuperação isotópica de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e de ^{15}N -mineral, o tempo de 24 h mostrou-se ser eficiente.

Palavras-chave: Concentração de N; N-NH_4^+ ; N-NO_3^- ; Análise isotópica de ^{15}N

Abstract

Microdiffusion is a technique used to concentrate $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (after reduction to $\text{NH}_4^+\text{-N}$) present in soil extracts. The capture of N is performed by a trap containing an acidified microfiber disk, covered by a polytetrafluoroethylene film. The aim of the study was to determine the shaking time required for maximum recovery via microdiffusion of the mineral N present in liquid samples. Solutions were made with ultrapure water containing different concentrations of $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ and mineral- ^{15}N ($^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $^{15}\text{NO}_3^-\text{-N}$). Samples were shaken for 24, 48, 72 and 96 h, and a N trap was used. MgO and Devarda's alloy were used to raise the pH and reduce NO_3^- to NH_4^+ respectively. The evaluation was performed by capture the $^{15}\text{NH}_3$ (from the $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ and the reduction of $^{15}\text{NO}_3^-\text{-N}$ in $^{15}\text{NH}_3$) in an acidified microfiber disk, followed by analysis in a mass spectrometer. The shaking time of 48 h is recommended for the quantitative recovery of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and mineral N. For isotope recovery of $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ and mineral- ^{15}N , the time of 24 h proved to be effective.

Keywords: Concentration of N; $\text{NH}_4^+\text{-N}$; $\text{NO}_3^-\text{-N}$, ^{15}N isotope analysis

3.1 Introdução

Estudos que envolvem a ciclagem do N podem ser realizados por meio de técnicas isotópicas com o traçador ^{15}N (SØRENSEN; JENSEN, 1991). A avaliação de taxas brutas de mineralização de N do solo é realizada com base na técnica da diluição do isótopo ^{15}N (BARRACLOUGH et al., 1985), sendo que o composto marcado em ^{15}N aplicado no solo, sofre diluição pela entrada de ^{14}N , proveniente das transformações naturais ocorrida no ambiente, como exemplos, pela amonificação e nitrificação. Para isso, faz-se necessário o uso de técnicas capazes de avaliar a abundância isotópica.

Existem diversas técnicas que auxiliam na concentração da substância marcada para posteriormente ser analisada em espectrômetro de massas. As técnicas conhecidas como difusão consistem na concentração de pequenos teores de N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) presente em extratos de solução de solo e amostras de água, de forma quantitativa e qualitativa, isto é, soluções marcadas com ^{15}N ou não (MACKOWN et al., 1987; BROOKS et al., 1989; BURKE et al., 1990; SØRENSEN; JENSEN, 1991; HERMAN et al., 1995; STARK; HART, 1996; GOERGES; DITTERT, 1998).

Dentro deste contexto, Sørensen e Jensen (1991) desenvolveram o método da microdifusão. Este tem a função de concentrar teores de ^{15}N por meio da retenção da NH_3 , sem ocasionar alteração na abundância isotópica. Esta técnica permite que o N-mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) da solução do solo seja convertido em N-NH_3 . O NH_3 , por ser volátil, é difundido no sistema de microdifusão. Este sistema é constituído por um disco de microfibras de vidro acidificado e envolto por uma fita de politetrafluoroetileno (PTFE), o qual tem a função de assegurar o N na forma de NH_4^+ . Em sequência, o disco de microfibras de vidro contendo o N é analisado em espectrômetro de massas.

A difusão do N-mineral no sistema de microdifusão ocorre durante o tempo em que as amostras permanecem agitando. De acordo com o trabalho de Sørensen e Jensen (1991), o período de agitação necessário para ocorrer a máxima difusão de N é de 72 h. Todavia, alguns estudos utilizaram o período de agitação de 48 h no processo de microdifusão do N-NH_4^+ presente no extrato de solo (VIDELA, 2004; MORAES, 2012). O tempo de agitação para recuperação do N-NO_3^- , após adição de liga de Devarda, apenas foi reportado por Sørensen e Jensen (1991), que obtiveram

o tempo de 72 h de agitação. Desse modo, a possível redução no tempo de agitação representa maior operacionalidade do método. Contudo, a redução no tempo de agitação deve proporcionar alta recuperação quantitativa do N adicionado. Com uso do traçador ^{15}N , é possível ainda verificar a recuperação isotópica (SØRENSEN; JENSEN, 1991).

Desse modo, foram realizadas avaliações com os objetivos de: (i) determinar o tempo de agitação necessário para difundir o teor de N-NH_4^+ ou N-mineral presente na amostra e, (ii) o tempo necessário para se obter a máxima recuperação isotópica.

3.2 Material e Métodos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4×2 , com três repetições. Os tratamentos constaram de quatro tempos de agitação para microdifusão do N (24, 48, 72 e 96 h) e duas quantidades de N adicionadas (50 e 100 μg para N-NH_4^+ e 100 e 200 μg para N-mineral).

As amostras de N-mineral constaram das seguintes formas de N: $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com abundância isotópica de 0,72 % átomos de ^{15}N e K^{15}NO_3 com abundância isotópica de 0,52 % átomos de ^{15}N . As amostras de N-NH_4^+ foram provenientes do $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e possuíam abundância isotópica de 0,72 % átomos de ^{15}N . As amostras de N-mineral foram compostas por 100 mL de água ultrapura, 0,2 g de MgO calcinado, 100 e 200 μg de N e um sistema de microdifusão para a reter o N-NH_4^+ . Os diferentes valores de N são resultado da somatória das formas $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e K^{15}NO_3 , gerando abundância isotópica de 0,62 % átomos de ^{15}N . As amostras de N-NH_4^+ foram compostas por 100 mL de água ultrapura, 0,2 g de MgO calcinado, 50 e 100 μg na forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e um sistema de microdifusão.

Para desenvolver a metodologia da microdifusão, proposta por Sørensen e Jensen (1991), inicialmente foi confeccionado um sistema para a retenção de N-NH_4^+ . Esse sistema é composto por um disco de filtro de microfibras de vidro (Whatman® GF/A; GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, GBR) acidificado com 10 μL de KHSO_4 2,5 mol L^{-1} e envolto por uma película de PTFE. A película de PTFE visa proteger e impedir a entrada de solução nos discos durante a agitação, devido à sua característica hidrofóbica.

Em seguida, as amostras acondicionadas em frascos de vidros, foram fechadas e permaneceram agitando em ambiente escuro para dificultar a

proliferação de algas que poderiam consumir o N contido na solução. Durante a etapa de agitação, a NH_3 (proveniente do NH_4^+ presente na solução em meio alcalino) é difundida através da película de PTFE (permeável a NH_3) e reage com a solução ácida adicionada ao filtro do sistema de microdifusão. Desse modo, a NH_3 é convertida em NH_4^+ e, este fica assegurado no filtro.

Após cada período de agitação, os sistemas de microdifusão foram retirados das soluções e mantidos em dessecador para remoção total da umidade. Secos, os filtros foram colocados em cápsulas de estanho, pesados e, levados para determinação de abundância de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL, Sercon Inc., Crewe, GBR).

A recuperação quantitativa do N adicionado em cada parcela experimental foi determinada a partir da equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{N recuperado}}{\text{N adicionado}} \times 100$$

onde *Recuperação (%)* é percentagem de recuperação do N presente em solução; *N recuperado* é a quantidade (μg) de N retido pelo sistema de microdifusão e *N adicionado* representa a quantidade de N (μg) contida inicialmente na amostra.

Os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA) utilizando-se o teste F, e em caso de significância, as médias foram comparadas entre si pelo teste t (LSD), ambos a $P \leq 0,05$.

3.3 Resultados e Discussão

Os valores de recuperação das quantidades de ^{15}N -mineral adicionadas foram influenciados apenas pelos diferentes tempos de agitação utilizados (Tabela 1). A recuperação do ^{15}N -mineral nos tempos de agitação de 24 e 96 h foi de 68,1 e 69,3 % respectivamente. Por outro lado, os tempos de 48 e 72 h de agitação apresentaram elevados valores de recuperação do N aplicado, acima de 95 % nos dois casos. Desse modo, os referidos períodos de agitação (48 e 72 h) são recomendados para obtenção de altos valores de recuperação de N-mineral presente em amostras de água e extratos de solo obtidos pelo uso de sais diversos (cloreto de potássio e sulfato de potássio, por exemplo).

Tabela 1 – Análise de variância (ANOVA) para valores de recuperação do N adicionado e de abundância de ^{15}N em amostras contendo 100 e 200 μg de N-mineral ($^{15}\text{NH}_4^+ + ^{15}\text{NO}_3^-$) e 50 e 100 μg de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ após período de agitação de 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de variação	¹⁵ N-mineral	N- ¹⁵ NH ₄ ⁺	¹⁵ N-mineral	N- ¹⁵ NH ₄ ⁺
	Recuperação (%)		Átomos de ¹⁵ N com correção (%)	
Dose (µg)				
100 / 50	79,5	74,8	0,60	0,72
200 / 100	85,0	66,9	0,59	0,71
Tempo (h)				
24	68,1 ^{b1}	71,8	0,63 ^a	0,72 ^a
48	96,7 ^a	85,6	0,60 ^b	0,72 ^a
72	95,0 ^a	64,0	0,58 ^b	0,74 ^a
96	69,3 ^b	61,9	0,58 ^b	0,67 ^b
Teste F				
P dose	0,164	< 0,001	0,597	0,175
P tempo	< 0,001	< 0,001	0,012	0,001
P dose x tempo	0,206	0,010	0,396	0,131

¹: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ($P \leq 0,05$)

Os valores de recuperação do $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ apresentaram interação entre o tempo de agitação e as doses de N-NH_4^+ avaliadas (Tabela 1). Portanto, o desdobramento da interação *dose x tempo* para a recuperação (%) do $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ está localizado na Tabela 2. Para as amostras que continham 50 μg de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$, os tempos de 24, 72 e 96 h de agitação apresentaram os menores valores de recuperação, situando-se abaixo de 72 %. Todavia, o tempo de 48 h apresentou o maior valor, com recuperação de 50 de μg $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ igual a 87,8 %. Para a dose de 100 μg $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$, o período de agitação de 48 h também se mostrou adequado, obtendo 83,4 % de recuperação, enquanto que o tempo de 24 h recuperou apenas 71,6 % (Tabela 2). Com os menores valores, os tempos de agitação de 72 e 96 h apresentaram recuperação de 57,5 e 55,0 % respectivamente. Os resultados obtidos em 48 h de agitação para recuperação do teor de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ foram maiores que os verificados por Moraes (2012), porém menores que os obtidos por Sørensen e Jensen (1991).

Tabela 2 – Desdobramento da interação *dose x tempo*, relacionada à recuperação (%) do N adicionado via microdifusão, avaliada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h de agitação, para amostras contendo 50 e 100 µg de N- $^{15}\text{NH}_4^+$

Tempo (h)	Recuperação ¹ (%)	
	50 µg N	100 µg N
24	72,0 ^{bA2}	71,6 ^{bA}
48	87,8 ^{aA}	83,4 ^{aA}
72	70,5 ^{bA}	57,5 ^{cB}
96	68,8 ^{bA}	55,0 ^{cB}

¹: calculada como [(N recuperado/N adicionado)x100]; ²: Letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($P \leq 0,05$)

Tanto para os resultados de recuperação da abundância de ^{15}N -mineral quanto para o de N- $^{15}\text{NH}_4^+$, fez-se a eliminação do valor de abundância natural (subtraindo-se do resultado da amostra obtido no espectrômetro de massas o valor de 0,366 %), pelo método da diluição isotópica de ^{15}N , obtendo valores de átomos de ^{15}N com correção do branco (%), encontrados na Tabela 1. Foi avaliado que independente da dose de N utilizada, o tempo de agitação alterou os resultados da recuperação isotópica.

Para o ^{15}N -mineral era esperado recuperação isotópica de aproximadamente 0,62 % em átomos de ^{15}N , dada a mistura igualitária das soluções marcadas isotopicamente [$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^+$ e K^{15}NO_3] nas amostras. Neste caso, a recuperação no tempo de 24 h de agitação mostrou-se eficiente. Entretanto, os demais tempos de agitação avaliados (48, 72 e 96 h) apresentaram valores da abundância de ^{15}N -mineral abaixo do previsto (Tabela 1). Com isso, é necessário que a agitação das amostras seja realizada durante até 24 h, embora com menor valor de recuperação do ^{15}N -mineral, para preservação da abundância isotópica de ^{15}N originalmente presente. A recuperação do N- $^{15}\text{NH}_4^+$ foi ideal e significativa nos tempos de 24, 48 e 72 h de agitação, diferindo-se do tempo de 96 h, que apresentou valores reduzidos de abundância de ^{15}N (Tabela 1). Não é possível descrever com clareza a causa do fracionamento isotópico de ^{15}N nas amostras de N-mineral após 24 h, e de N- NH_4^+ após 96 h de agitação. Possivelmente o fracionamento isotópico foi devido à maior saída de ^{15}N em relação à de ^{14}N do interior da armadilha para retenção (sistema de microdifusão) após determinado período de agitação.

3.4 Conclusão

Para amostras não marcadas e com baixa quantidade de N presente, é recomendável que o processo de microdifusão sob agitação constante seja realizado pelo período de 48 h, para maior recuperação do N-mineral pelo sistema de microdifusão. Todavia, em amostras marcadas em ^{15}N , é recomendável que a agitação seja efetuada em até 24 h, para obtenção de valor isotópico similar ao contido inicialmente na amostra. Após o período de 24 h, pode ocorrer fracionamento do ^{15}N , especialmente em amostras com presença de $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$.

Referências

BARRACLOUGH, D.; GEENS, E.L.; DAVIES, G.P.; MAGGS, J.M. The use of single and double labelled ^{15}N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 593–603, 1985.

BROOKS, P.D.; STARK, J.M.; MCINTEER, B.B.; PRESTON, P. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 53, p. 1707-1711, 1989.

BURKE, I.C.; O'DEEN, L.A.; MOSIER, A.R.; PORTER, L.K. Diffusion of soil extracts for nitrogen and nitrogen-15 analyses by automated combustion/mass spectrometry. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 54, p. 1190-1192, 1990.

GOERGES, T.; DIITTER, K. Improved diffusion technique for ^{15}N : ^{14}N analysis of ammonium and nitrate from aqueous samples by stable isotope spectrometry. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 29, p. 361-368, 1998

HERMAN, D.J.; BROOKS, P.D.; ASHRAF, M.; AZAM, F.; MULVANEY, R.L. Evaluation of methods for nitrogen-15 analysis of inorganic nitrogen in soil extracts. Diffusion methods. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 26, p. 1675-1685, 1995

MACKOWN, C.T.; BROOKS, P.D.; SMITH, M.S. Diffusion of nitrogen-15 Kjeldahl digests for isotope analysis. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 51, p. 87-90, 1987.

MORAES, M.I.M. **Mineralização bruta (amonificação) de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 83 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SØRENSEN, P.; JENSEN, E.S. Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to a polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 5, p. 201–203, 1991.

STARK, J.M.; HART, S.C. High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forest. **Nature**, London, v. 385, p. 64-65, 1997.

VIDELA, C.D.C. **Mineralização bruta do nitrogênio em um Molisol do sudeste da Província de Buenos Aires (Argentina)**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

4 MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DO N-NITRATO EM AMOSTRAS LÍQUIDAS

Resumo

A nitrificação bruta do N do solo somente é estimada por meio do traçador ^{15}N , onde o $^{15}\text{NO}_3^-$ presente no extrato de solo é concentrado em uma armadilha acidificada para posterior análise isotópica. Desse modo, foram avaliados dois métodos de recuperação do $^{15}\text{N-NO}_3^-$ adicionado em amostras de contendo solução de KCl. O primeiro método foi caracterizado pela eliminação prévia do N-NH_4^+ por meio da alcalinização com MgO com agente álcali e posterior captura do NO_3^- pelo uso de liga de Devarda. A segunda metodologia foi efetuada por meio da diluição isotópica proveniente da retenção do N-mineral total ($\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$). Adicionalmente, foram avaliadas duas marcas do reagente KCl disponíveis usualmente no mercado, visando identificar possível contaminação com N-mineral. Os resultados do estudo indicam que ambas as metodologias utilizadas para recuperação do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ foram eficientes, com obtenção de valor isotópico semelhante ($P < 0,05$) ao existente inicialmente. O método de exclusão prévia do N-NH_4^+ é recomendado, visto a maior operacionalidade do mesmo em relação ao da diluição isotópica. Ambas as marcas de KCl não apresentaram contaminação significativa de N-mineral nas amostras, podendo ser utilizadas seguramente.

Palavras-chave: N-NO_3^- ; N-NH_4^+ ; Extrato de KCl; Microdifusão

Abstract

The gross N nitrification in the soil is only estimated by the tracer ^{15}N , where the $^{15}\text{NO}_3^-$ present in the soil extract is concentrated in an acidified trap for subsequent isotopic analysis. Thus, two methods of recovery the added $^{15}\text{NO}_3^-$ -N to samples containing KCl were tested. The first method was characterized by prior removal of NH_4^+ -N by alkalization using MgO as alkali agent and subsequent capture of NO_3^- by using Devarda's alloy. The second protocol was performed using the isotope dilution procedure, by recovery the total mineral N ($^{15}\text{NH}_4^+$ -N and $^{15}\text{NO}_3^-$ -N). Additionally, two KCl brands usually available in the market were evaluated in order to identify possible contamination with mineral N. The results indicate that both methods used for recovery the $^{15}\text{NO}_3^-$ -N were efficient, obtaining similar isotopic value ($P < 0.05$) to the initially added. The method of NH_4^+ -N removal is recommended, since most of the same operation in relation to the isotope dilution. Both KCl brands showed no significant contamination of mineral N and can be used safely.

Keywords: NO_3^- -N; NH_4^+ -N; KCl extracts; Microdiffusion

4.1 Introdução

A nitrificação do NH_4^+ encontrado no solo é uma importante etapa do ciclo deste elemento, que garante o fornecimento de NO_3^- às plantas. Mensurar as taxas brutas de transformação de N do solo representa o potencial deste solo em disponibilizar N-mineral aos vegetais (VIDELA, 2004). A taxa de nitrificação bruta, obtida por meio da técnica diluição do isótopo ^{15}N no reservatório de N-NO_3^- (BARRACLOUGH et al., 1985), ainda é um tema pouco estudado em solos de clima tropical. Portanto, é de suma importância avaliar os procedimentos laboratoriais utilizados na referida metodologia, e aplicar mudanças, se necessário, para adequação do protocolo para regiões tropicais.

Para calcular a taxa de nitrificação bruta dos solos faz-se a marcação isotópica no compartimento NO_3^- do solo com ^{15}N e monitora-se o empobrecimento deste com a entrada de NO_3^- com abundância natural nos isótopos de N, originário do processo de nitrificação do NH_4^+ com abundância natural (BARRACLOUGH et al., 1985). Para avaliar a abundância isotópica de ^{15}N , torna-se necessário o uso do método da microdifusão, adaptado de Sørensen e Jensen (1991), para concentração do N do extrato em um disco de microfibras de vidro acidificado. Porém, quando o intuito é estimar a taxa de nitrificação bruta, existe a possibilidade de uso de duas metodologias para recuperação do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ nos extratos de solo: (i) pela eliminação prévia do N-NH_4^+ após alcalinização do meio e posterior volatilização de NH_3 , sendo o NO_3^- reduzido à NH_4^+ e capturado (ii) pela diluição isotópica provenientes de N-NH_4^+ e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ presentes no extrato do solo e posterior mensuração da abundância isotópica do ^{15}N oriundo do N-NO_3^- .

Para que o N-NH_4^+ existente na solução do solo seja eliminado é necessário ser feito um pré-tratamento às amostras, de acordo com Brooks et al. (1989), realizado antes do uso da técnica da microdifusão. Dessa forma, não há interferência isotópica nos resultados de $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$. Parker e Schimel (2010), estudando taxas brutas e líquidas de transformações de N do solo, fizeram uso dessa metodologia para a análise do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$. Outro método que pode ser utilizado é o de diluição isotópica, onde se recupera o N-mineral total presente no extrato. Entretanto, o resultado obtido em espectrômetro de massas, é oriundo do balanço de massas provenientes de N-NH_4^+ (abundância natural) e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ (marcado

isotopicamente). Neste caso, para obter o valor de abundância do ^{15}N proveniente apenas do NO_3^- , há necessidade da realização de cálculo matemático.

O KCl é um sal amplamente utilizado na extração de N-mineral presente em amostras de solo (MULVANEY, 1996). Contudo, a presença de quantidades expressivas de NH_4^+ e NO_3^- em lotes do reagente de diferentes fabricantes foi reportada por Cantarella e Trivelin (2001). Em estudos como os de amonificação e nitrificação bruta, onde a quantidade de N presente nos extratos de KCl é baixa, contaminações elevadas de NH_4^+ e NO_3^- podem comprometer sobremaneira as análises químicas, especialmente por diluir a abundância isotópica de ^{15}N . Assim, é de grande importância avaliar a qualidade dos reagentes contendo o sal KCl comercializados comumente no Brasil, visando identificar possíveis teores elevados das formas de N-mineral no sal.

Desse modo, a hipótese levantada neste estudo é de que ambas as metodologias utilizadas para mensuração da abundância isotópica de ^{15}N oriundo do reservatório de N- NO_3^- do solo são eficientes. Assim, objetivou-se, através do uso da técnica da microdifusão adaptada, avaliar a recuperação de N- $^{15}\text{NO}_3^-$ e de ^{15}N -mineral presentes em soluções de KCl por meio da adição de N- NH_4^+ e N- NO_3^- enriquecidos em ^{15}N . A interferência do sal KCl foi verificada pelo conteúdo de N-mineral presente nas soluções preparadas à partir de duas marcas do reagente disponíveis no mercado.

4.2 Material e Métodos

Os tratamentos constaram de dois métodos para recuperação da abundância original do $^{15}\text{N-NO}_3^-$ (eliminação prévia do N- NH_4^+ e diluição isotópica). Duas marcas do reagente KCl disponíveis no mercado, Merck Millipore® (Código 104936, Merck KGaA, Darmstadt, ALE) e Carlo Erba® (Código 471177, Carlo Erba Reagents, Milão, ITA) foram avaliados quanto à possível presença de N-mineral (especialmente NH_4^+) no sal em questão. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Para determinar a concentração de N- $^{15}\text{NO}_3^-$ com a eliminação prévia do N- NH_4^+ , foram adicionados em recipientes de vidro, 100 mL de solução de KCl 2 mol L⁻¹, além de 200 µg de N, sendo 100 µg de N- $^{15}\text{NO}_3^-$ na forma de K $^{15}\text{NO}_3$ com 0,52 % de átomos de ^{15}N e, outros 100 µg de N- $^{15}\text{NH}_4^+$, como ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ com 0,72 % de

átomos de ^{15}N e 0,2 g de MgO . Foram utilizadas as duas marcas de reagente no preparo da solução de KCl . Após isso, foi adicionado 0,2 g de MgO calcinado em cada um dos frascos, para alcalinização do meio. Em seguida, os frascos foram mantidos abertos, e acondicionados em capela de exaustão por 72 h, para volatilização do NH_3 formado após adição do alcalinizante ao meio. Após esse período, adicionou-se em cada frasco o sistema de microdifusão (disco de microfibras de vidro acidificado) e Liga de Devarda (pó finamente moído composto pelos metais Al , Cu e Zn , responsáveis pela redução do NO_2^- e NO_3^- à NH_4^+). Assim, as amostras permaneceram por 24 h agitando, em ambiente escuro, para captura da fração $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$, tal como resultados obtidos no Capítulo 3. Durante a agitação, o NO_3^- da solução é reduzido a NH_4^+ , que este em ambiente alcalino é transformado em NH_3 . Volátil, a NH_3 permeia a película de PTFE que envolve o disco de filtros de microfibras de vidro, que por estar acidificada, captura a NH_3 e converte em NH_4^+ .

Para avaliar a concentração de ^{15}N -mineral pelo método de diluição isotópica, recipientes de vidro receberam, 100 mL de solução de KCl 2 mol L^{-1} (preparada com as duas marcas de KCl , como descrito anteriormente), 200 μg de N (100 μg de $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ na forma de K^{15}NO_3 com 0,52 % de átomos de ^{15}N e, 100 μg de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ como $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com 0,72 % de átomos de ^{15}N), 0,2 g de MgO , 0,2 g de Liga de Devarda e o sistema de microdifusão. Neste caso, não houve liberação do N-NH_4^+ nativo, e abundância de ^{15}N formada pela mistura das duas formas de N foi equivalente a 0,62 % de átomos em excesso de ^{15}N . Os recipientes de vidro foram agitados por 24 h em agitador orbital, como descrito acima.

Para os dois métodos de recuperação da abundância do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$, amostras controle foram adicionadas no estudo. Para esse tratamento, adicionou-se nos frascos de vidro apenas a solução de KCl (100 mL), além do alcalinizante MgO , o redutor liga de Devarda e o sistema de microdifusão para captura do N . Procedeu-se da mesma forma para recuperação exclusiva do N-NO_3^- e do N -mineral total, conforme metodologia supracitada.

A análise estatística dos resultados de abundância isotópica de ^{15}N proveniente do N-NO_3^- foi efetuada utilizando-se o teste de hipóteses pelo teste t de Student ($P \leq 0,05$). Para o método de eliminação prévia do N-NH_4^+ , a hipótese a ser testada foi de que H_0 era igual a 0,52 % átomos em excesso de ^{15}N (oriundo apenas do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$). Para o método de diluição isotópica, o valor de H_0 era equivalente a 0,62 % átomos em excesso de ^{15}N (obtido pela mistura de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$).

4.3 Resultados e Discussão

A recuperação da abundância isotópica do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ utilizando-se a metodologia da eliminação prévia do N-NH_4^+ foi significativamente equivalente ao valor esperado para essa metodologia, de 0,520 % átomos em excesso de ^{15}N ($P < 0,05$), independentemente da marca utilizada de KCl, coincidindo, assim, com o valor da abundância isotópica do K^{15}NO_3 utilizado (Tabela 3). A obtenção dos resultados analíticos foi dada pelo espectrômetro de massas e, pela realização do cálculo de diluição isotópica eliminando o valor do branco de cada amostra. Para tanto, fez-se a subtração do valor de ^{15}N das amostras controle (abundância natural de 0,366 %). O mesmo procedimento foi utilizado por Sørensen & Jensen (1991), que também descontaram do valor obtido a abundância natural de ^{15}N . Portanto, a eliminação do N-NH_4^+ nativo do extrato de solo e a posterior recuperação do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ através da técnica da microdifusão adaptada se apresenta como uma metodologia viável para ser utilizada em estudos envolvendo a determinação das taxas brutas de nitrificação de N.

Da mesma forma, a abundância isotópica do ^{15}N -mineral utilizando-se a metodologia de diluição isotópica também proporcionou valores de % de átomos de ^{15}N significativamente iguais ($P < 0,05$) ao valor originalmente presente, de 0,620 % (Tabela 4). Como descrito anteriormente, foi necessária a subtração da abundância de ^{15}N das amostras controle para a obtenção dos valores em % de átomos do referido isótopo. Como observado para o método de eliminação do N-NH_4^+ , os reagentes não interferiram no resultado obtido, indicando também baixa concentração de N-mineral no sal em questão.

A partir da constatação de que ambas as metodologias utilizadas na recuperação do N-NO_3^- e sua respectiva abundância isotópica de ^{15}N , é possível discorrer sobre as vantagens operacionais do método que se baseia na eliminação prévia do N-NH_4^+ nativo do solo por meio da alcalinização do meio com MgO. Esta metodologia apresenta maior facilidade de uso em relação ao método de diluição isotópica do N-mineral, pois, ao contrário desta última, a técnica de eliminação do N-NH_4^+ não requer a mensuração das formas amoniacal e nítrica de N no extrato, sendo necessária apenas a quantificação dos teores de N-NO_3^- . Além disso, o pré-tratamento visando à eliminação do N-NH_4^+ apresenta-se altamente eficiente, desde

que as amostras sejam acondicionadas no interior de capela de exaustão, para eliminação total do gás NH_3 (PARKER; SCHIMEL, 2010).

A partir da constatação de que ambas as metodologias utilizadas na recuperação do N-NO_3^- e sua respectiva abundância isotópica de ^{15}N , é possível discorrer sobre as vantagens operacionais do método que se baseia na eliminação prévia do N-NH_4^+ nativo do solo por meio da alcalinização do meio com MgO . Esta metodologia apresenta maior facilidade de uso em relação ao método de diluição isotópica do N-mineral, pois, ao contrário desta última, a técnica de eliminação do N-NH_4^+ não requer a mensuração das formas amoniacal e nítrica de N no extrato, sendo necessária apenas a quantificação dos teores de N-NO_3^- . Além disso, o pré-tratamento visando à eliminação do N-NH_4^+ apresenta-se altamente eficiente, desde que as amostras sejam acondicionadas no interior de capela de exaustão, para eliminação total do gás NH_3 (PARKER; SCHIMEL, 2010).

Foi observado ainda que as duas marcas de KCl utilizadas no estudo apresentaram reduzidos valores de contaminação com N-mineral (dados não apresentados), sendo ambas recomendadas para estudos dessa natureza. Contudo, é recomendável a determinação prévia da concentração de N-NH_4^+ e N-NO_3^- na solução de KCl antes do procedimento de extração do N-mineral solúvel e trocável presente em amostras de solo, afim de se evitar contaminações, especialmente de NH_4^+ , dada a heterogeneidade dos lotes de reagente fabricados pelas indústrias químicas (CANTARELLA; TRIVELIN, 2001).

Tabela 3 - Resultados da recuperação isotópica de $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ pelo método de eliminação prévia do N-NH_4^+ via alcalinização do meio, provenientes de soluções de KCl formuladas à partir duas marcas disponíveis do reagente no mercado

Reagente KCl	$\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$	
	% de átomos sem correção	% de átomos com correção
Merck Millipore ®	0,486	0,524*
Carlo Erba ®	0,481	0,518*

*: $P < 0,05$ pelo teste t de Student, considerando-se o valor de H_0 igual a 0,520 % de átomos em excesso de ^{15}N

Tabela 4 - Resultados da recuperação de ^{15}N -mineral ($\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+ + \text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$) pelo método de diluição isotópica, provenientes de soluções de KCl formuladas à partir duas marcas disponíveis do reagente no mercado

Reagente KCl	^{15}N -mineral	
	% de átomos sem correção	% de átomos com correção
Merck Millipore ®	0,607	0,616*
Carlo Erba ®	0,581	0,617*

*: $P < 0,05$ pelo teste t de Student, considerando-se o valor de H_0 igual a 0,620 % de átomos em excesso de ^{15}N

4.4 Conclusão

As metodologias de eliminação prévia do N-NH_4^+ nativo do solo e de diluição isotópica do N-mineral apresentam-se eficientes para determinação da abundância isotópica de ^{15}N do reservatório de NO_3^- . A metodologia onde o N-NH_4^+ é eliminado é altamente recomendada, devido à sua alta operacionalidade. As duas marcas do reagente KCl utilizadas no presente estudo apresentaram reduzidos valores de contaminação com N, sendo recomendadas para estudos dessa natureza.

Referências

BARRACLOUGH, D.; GEENS, E.L.; DAVIES, G.P.; MAGGS, J.M. The use of single and double labelled ^{15}N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 593–603, 1985.

BROOKS, P.D.; STARK, J.M.; MCINTEER, B.B., PRESTON, T. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 53, p. 1707–1711, 1989.

MULVANEY, R.L. Nitrogen – inorganic forms. In: SPARKS, D.L.; PAGE, A.L.; HELMKE, P.A.; LOEPPERT, R.H.; SOLTANPOUR, P.N.; JOHNSTON, C.T.; SUMMER, M.E. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA; ASA, 1996. pt. 3: Chemical methods, p. 1123-1184. (Agronomy Series, 5).

PARKER, S.S.; SCHIMEL, J.P. Invasive grasses increase nitrogen availability in California grassland soils. **Invasive Plant Science and Management**, Lawrence, v. 3, p. 40-47, 2010.

SØRENSEN, P.; JENSEN, E.S. Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to a polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.5, p.201–203, 1991.

VIDELA, C.D.C. **Mineralização bruta do nitrogênio em um Molisol do sudeste da Província de Buenos Aires (Argentina)**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

5 AJUSTE NA ABUNDÂNCIA ISOTÓPICA DE ^{15}N PARA TAXA DE AMONIFICAÇÃO E NITRIFICAÇÃO BRUTAS DE NITROGÊNIO EM SOLOS TROPICAIS

Resumo

As taxas de transformações brutas de N ainda são pouco estimadas em solos de regiões tropicais. Por isso, é necessário checar se as metodologias utilizadas usualmente para solos temperados são apropriadas também para solos tropicais. Em solos de regiões temperadas, é comum a utilização de compostos altamente enriquecidos em ^{15}N (abundância da ordem de 90 % de átomos) para estudos das taxas brutas de amonificação e nitrificação. Desse modo, os reservatórios NH_4^+ e NO_3^- de três solos com textura contrastante foram marcados com ^{15}N a partir de soluções com abundância isotópica de 50 % de átomos e dose aplicada de $3 \mu\text{g N g}^{-1}$ de solo. Os teores de N (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) foram quantificados e, avaliou-se a abundância isotópica de ^{15}N por espectrometria de massas. Foi observada a diluição da abundância de átomos de ^{15}N dos reservatórios de N mineral marcados, permitindo assim o cálculo das taxas brutas. Com base nos resultados do presente estudo, é recomendável a utilização de valores de abundância inferiores a 50 % em átomos de ^{15}N , visando maior precisão analítica no cálculo das taxas brutas de amonificação e nitrificação.

Palavras-chave: Reservatório de N-mineral; Diluição do isótopo; Mineralização de N

Abstract

Gross rates of N transformations are little known in tropical soils. Therefore it is necessary to check if the protocols usually used for temperate soils are also suitable for tropical soils. In soils from temperate regions, it is common to use compounds highly enriched in ^{15}N (abundance of approximately 90 atom% ^{15}N) for studies of gross rates of ammonification and nitrification. Thus, the pools NH_4^+ and NO_3^- of three soils with contrasting texture were labelled with ^{15}N -solutions enriched with 50 atom% and a dose of $3 \mu\text{g N g}^{-1}$ of soil was applied. Mineral N ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$) content was measured, and the ^{15}N abundance was determined by mass spectrometry. The ^{15}N abundance in the labelled pools decreased over time, thus allowing the calculation of gross N rates. Based on the results of this study, it is recommended to use ^{15}N -labeled compounds with abundance below 50 atom%, seeking greater analytical precision to calculate gross rates of ammonification and nitrification.

Keywords: Mineral N pool; Pool dilution; N mineralization

5.1 Introdução

Os processos de amonificação e da nitrificação que ocorrem nos solos são essenciais para o funcionamento do ciclo do N e, responsáveis por disponibilizar o N combinado da matéria orgânica do solo (MOS) às plantas. Estudos visando essas transformações brutas do N são ainda pouco explorados (VIDELA, 2004), principalmente em regiões de clima tropical. Por isso, análises mais aprofundadas sobre as técnicas utilizadas na determinação das taxa brutas são necessárias para avaliar possíveis adaptações para os solos situados em regiões tropicais.

A mensuração de taxas de mineralização brutas só é possível de ser realizada com o uso da técnica diluição do isótopo ^{15}N (BARRACLOUGH et al., 1985; BOECKXA et al., 2004; CHRISTENSON et al., 2009). Para tanto, marca-se o compartimento $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ do solo com ^{15}N (marcação com $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ exógeno enriquecido em ^{15}N) e monitora-se a diluição do isótopo no solo, em um período específico de tempo. A partir da mineralização do N orgânico, no caso da amonificação bruta, e nitrificação do NH_4^+ , no caso da nitrificação bruta, ocorre diluição do reservatório marcado com ^{15}N , possibilitando assim os cálculos das taxas brutas dos processos no solo (BARRACLOUGH et al., 1985).

Trabalhos realizados objetivando-se quantificar as taxas brutas de mineralização do N do solo são semelhantes quanto ao desenvolvimento da metodologia utilizada (BARRACLOUGH et al., 1985; VIDELA, 2004; PARKER; SCHIMEL, 2010). Porém, o valor do enriquecimento isotópico em ^{15}N , para reproduzir a técnica da diluição do referido isótopo, é bastante diverso. Estudos desenvolvidos no Brasil, para calcular a taxa de amonificação bruta, aplicaram ao solo solução contendo N-NH_4^+ enriquecida a uma taxa de até 15 % de átomos de ^{15}N , na dose de $10 \mu\text{g N g}^{-1}$ de solo (VIDELA, 2004; MORAES, 2012; D'ANDRÉA, 2012). Pilbeam e Warren (1995), avaliando a taxa bruta de amonificação em solos do semiárido do Quênia, no continente Africano, usaram solução com N-NH_4^+ enriquecidas a uma taxa de até 10 % de átomos de ^{15}N . Entretanto, os demais trabalhos realizados, principalmente com solos de regiões temperadas, utilizaram marcações com valores entre de 50 a 99 % de átomos de ^{15}N , com doses variadas de N aplicadas ao solo (DAVIDSON et al., 1991; RECOUS et al., 1999; ZAMAN et al., 1999; CORRE et al., 2002; BENGTSSON et al., 2003, 2005; PARKER; SCHIMEL, 2010; DONG et al., 2012).

A baixa marcação isotópica utilizada nos trabalhos de Videla (2004) e Moraes (2012) foi possibilitada pela maior dose de N aplicada ao solo ($10 \mu\text{g N g}^{-1}$ de solo), o que pode ter contribuído para a menor taxa de diluição do reservatório de N-NH_4^+ nos solos estudados. Todavia, é recomendado que seja evitada a utilização de doses elevadas de N-NH_4^+ , para que não ocorra modificação no tamanho do compartimento NH_4^+ nos solos, com consequente alteração na taxa bruta de amonificação (MURPHY et al., 2003). Por outro lado, a aplicação de doses mais baixas (RECOUS et al., 1999; DONG et al., 2012), objetivando-se não alterar o reservatório a ser marcado, apresenta a limitação de ser necessária, em alguns casos, a aplicação de quantidade conhecida de um padrão contendo N-NH_4^+ ou N-NO_3^- ao extrato de solo (técnica conhecida como “adição padrão”) para que uma quantidade mínima de N esteja presente na solução para ser então concentrada em discos de microfibras de vidro, para posterior análise isotópica. Uma alternativa ao método da adição padrão prevê a utilização de amostras com maior quantidade de solo, como preconizado por Videla (2004) e Moraes (2012), que utilizaram amostras incubadas com 80 g de solo seco. Contudo, reduz-se a operacionalidade e aumentam-se os custos com KCl para preparo de solução extratora.

Além das limitações citadas acima, a utilização de soluções com alto enriquecimento no isótopo de ^{15}N apresenta a desvantagem do maior custo financeiro para aquisição do isótopo, dado a elevada marcação isotópica. Outra questão pertinente diz respeito ao processo de análise das amostras por espectrometria de massas. Amostras com elevada % de átomos de ^{15}N podem causar contaminação na linha durante o processo de análise espectrométrica, fenômeno este também conhecido como “efeito memória”, comprometendo a precisão e acurácia dos resultados. Além disso, é necessário dispor de padrões de trabalho com valores de abundância de ^{15}N compatíveis com as amostras a serem analisadas.

Baseado no que foi descrito acima, a hipótese é de que a técnica da diluição do isótopo para estimar as taxas brutas de amonificação e nitrificação de solos tropicais não requer alta marcação isotópica em ^{15}N . Com isto, foram utilizados solos com texturas contrastantes com o objetivo de se avaliar o enriquecimento isotópico (% em átomos de ^{15}N) necessário para desenvolver as metodologias da amonificação e nitrificação brutas de N.

5.2 Material e Métodos

Para desenvolvimento do estudo, foram utilizados três solos cultivados sucessivamente com cana-de-açúcar por várias décadas. As áreas de cana-de-açúcar representam experimentos envolvendo a aplicação de doses de N em soqueiras da cultura e eram localizadas em municípios pertencentes ao estado de São Paulo, Brasil. O solo amostrado em Santa Maria da Serra, Novo Horizonte e Piracicaba foram classificados de acordo com Embrapa (2013) como NEOSSOLO QUARTZARÊNICO distrófico (NQd), LATOSSOLO VERMELHO AMARELO distrófico (LVAd) e LATOSSOLO VERMELHO eutrófico (LVe) respectivamente. As propriedades físico-químicas dos solos estão detalhadas na Tabela 5. A amostragem de solo foi realizada com auxílio de trado do tipo holandês na profundidade 0-20 cm, apenas em parcelas controle dos experimentos (sem aplicação recente de N), realizando-se de oito amostragens simples para a composição de uma amostra composta por parcela.

Em laboratório, as amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 40° C, por um mínimo 48 h. Secas, as mesmas foram moídas em moinho de solo e peneiradas em peneira de malha ≤ 2 mm de abertura e, armazenadas em recipientes plásticos herméticos até a realização das análises. O pH foi determinado utilizando-se solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ na relação 1:2,5 (solo:solução), de acordo com Raij et al. (2001). O C orgânico do solo (COS) foi determinado por oxidação via $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ com aquecimento externo (NELSON; SOMMERS, 1996), enquanto que o N total do solo (NTS) foi obtido via digestão com H_2SO_4 e posterior destilação das amostras (BREMNER, 1996). A composição textural foi determinada pelo método do densímetro (GEE; BAUDER, 1986). A caracterização físico-química dos solos encontra-se na Tabela 5.

5.2.1 Taxa de amonificação bruta

Para estimar a taxa de amonificação bruta (TAB), em recipientes de vidro foram adicionados 20 g de solo (com base em massa seca), realizou-se o umedecimento a 60 % da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) (ISO, 2003) com água desionizada e cobertos com tampa plástica, com objetivo de se evitar a perda de umidade excessiva das amostras. As amostras de solo permaneceram pré-

incubadas por 14 dias em câmara tipo BOD (MA-415, Marconi LTDA, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 25°C. A umidade dos solos e a temperatura de incubação utilizadas neste estudo foram baseadas de acordo com trabalho prévio desenvolvido por Moraes (2012), que verificou índices ótimos na taxa de amonificação bruta em incubações seguindo-se as condições climáticas supracitadas.

Durante o período de pré-incubação das amostras, a reposição de água foi efetuada a cada 48 h, quando necessário, preservando-se a umidade pré-estabelecida de cada amostra de solo. A pré-incubação é um procedimento importante em estudos dessa natureza, pois permite o restabelecimento da atividade microbiana do solo e, estabilização do conteúdo de N mineral do solo (MATAR et al., 1991; VIDELA, 2004; MORAES, 2012). No tempo de 72 h antes da marcação isotópica em ^{15}N , as tampas plásticas que protegiam as amostras foram retiradas, permitindo-se assim a redução na umidade do solo. Essa estratégia foi adotada visando evitar que, com a aplicação da solução contendo $^{15}\text{NH}_4^+$, a umidade ultrapassasse o valor estimado em 60 % da CMRA. Desse modo, as amostras receberam uma alíquota pré-determinada de solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com auxílio de pipeta automática, na dose de $3 \mu\text{g N g}^{-1}$ de solo, com um excesso isotópico de 50,7 % em átomos de ^{15}N , para o desenvolvimento do método da diluição do isótopo. Após aplicação da solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ajustou-se a umidade das amostras de solo para 60 % da CMRA com auxílio de água desionizada. Essa operação foi realizada com o objetivo de favorecer a melhor distribuição do $^{15}\text{NH}_4^+$ adicionado nas parcelas experimentais.

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas de solos cultivados com cana-de-açúcar, coletados na camada de 0-20 cm do perfil. Valores representam média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$)

Solo ¹	pH	COS	NTS	Areia	Silte	Argila
	CaCl ₂					
LVe	4,9 $\pm$ 0,1	13,5 $\pm$ 0,7	1,26 $\pm$ 0,07	289 $\pm$ 11	121 $\pm$ 5	591 $\pm$ 8
LVAd	4,5 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,3	0,60 $\pm$ 0,02	745 $\pm$ 3	35 $\pm$ 3	220 $\pm$ 6
NQd	5,2 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	0,26 $\pm$ 0,00	878 $\pm$ 37	28 $\pm$ 3	94 $\pm$ 36

¹: LVe: LATOSSOLO VERMELHO eutrófico, LVAd: LATOSSOLO VERMELHO AMARELO distrófico, NQd: NEOSSOLO QUARTZARÊNICO distrófico (EMBRAPA, 2013); pH: determinado segundo Raij et al. (2001); COS: carbono orgânico do solo (BREMNER, 1996); NTS: nitrogênio total do solo (NELSON; SOMMERS, 1996); areia, silte e argila determinados com base em Gee e Bauder (1986)

A extração do N-NH_4^+ foi realizada em amostras distintas em dois tempos. O primeiro tempo se deu em 24 h após a marcação isotópica e, o segundo tempo em 96 h, conforme avaliações prévias estudadas por Moraes (2012). A extração das formas minerais de N ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$) foi realizada de acordo com Cantarella e Trivelin (2001), sendo utilizado 100 mL de solução de KCl 2 mol L^{-1} na relação 1:5 (solo: solução – m/v), mantida sob agitação por 1 hora em agitador orbital. Em sequência, as soluções foram filtradas em papel de filtro pré-lavado com solução de KCl 2 mol L^{-1} e água ultrapura. Após a filtragem, foi determinada a concentração de N-NH_4^+ de cada amostra por meio do sistema de injeção em fluxo (FIA). O N-NH_4^+ foi determinado por condutimetria, onde os íons NH_4^+ são alcalinizados por solução de NaOH 1,5 mol L^{-1} , transformando-se em NH_3 . A NH_3 , sendo volátil, percorre uma câmara de difusão gasosa vedada com fita de politetrafluoroetileno (PTFE) e é detectada por uma célula de condutância (REIS et al., 1997).

Em sequência, foi avaliada a concentração do $^{15}\text{N-NH}_4^+$ pelo método da microdifusão, desenvolvido por Sørensen e Jensen (1991), mas com as adaptações conforme o Capítulo 3. Para tanto, foram confeccionados o sistema de microdifusão. Em recipientes de vidro foi adicionada quantidade de extrato de KCl equivalente a 100 $\mu\text{g N-NH}_4^+$ (quantidade mínima para posterior determinação em espectrômetro de massas), juntamente com um sistema de microdifusão e 0,2 g de MgO calcinado. Para extratos de solo que apresentaram valores abaixo de 100 $\mu\text{g N-NH}_4^+$, foi realizado o método da adição padrão, pela aplicação de 1 mL de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (equivalente a 60 $\mu\text{g de N}$), atingindo assim o conteúdo de N mínimo para análise em espectrômetro de massas. Em seguida, os recipientes foram submetidos à agitação por 48 h, em ambiente escuro para dificultar a proliferação de algas que poderiam consumir o N contido na solução. Durante a etapa de agitação, o NH_3 (proveniente do NH_4^+ presente na solução em meio alcalino) é difundido através da película de politetrafluoroetileno (PTFE), permeável ao NH_3 , e reage com a solução ácida adicionada ao filtro do sistema de microdifusão. Desse modo, o NH_3 é convertido em NH_4^+ e, este fica assegurado no filtro.

Após o período de agitação, os sistemas de microdifusão foram retirados das soluções e mantidos em dessecador para remoção total da umidade. Secos, os filtros foram colocados em cápsulas de estanho, pesados e, levados para determinação de abundância de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL, Sercon Inc., Crewe, GBR) (VIDELA, 2004; MORAES, 2012). Os

resultados de abundância isotópica utilizados neste estudo foram obtidos pelo cálculo de diluição isotópica subtraindo o valor do branco (abundância natural de 0,366 %) de cada amostra.

Para determinação da taxa de AB é necessário que haja diluição do reservatório de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ previamente marcado pela entrada de $^{14}\text{N-NH}_4^+$ com abundância natural, proveniente da amonificação da MOS. Dessa forma, a taxa de AB é calculada pela seguinte equação, de acordo com Barraclough et al. (1985):

$$^*A_t = \frac{^*A_0}{\left(1 + \frac{(\theta_t)}{A_0}\right)^{m/\theta}}$$

onde $^*A_t$ é o excesso isotópico do reservatório de NH_4^+ (abundância de ^{15}N da amostra subtraída do valor de abundância natural de 0,366 % de ^{15}N) no tempo final t_t (96 h); $^*A_0$ representa o excesso isotópico do reservatório de NH_4^+ no tempo inicial t_0 (24 h); t é intervalo tempo em dias ($t_t - t_0$); A_0 indica o tamanho do reservatório NH_4^+ no solo (mg kg^{-1}) no tempo inicial t_0 (24 h); $\theta = (^*A_t - ^*A_0)/t$; m é igual à taxa de amonificação bruta ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

5.2.2 Taxa de nitrificação bruta

Para calcular a taxa de nitrificação bruta (TNB), tal como na TAB, 20 g das amostras de solo foram acondicionadas em recipientes de vidro, umedecidas a 60 % da CMRA e mantidas pré-incubadas em câmara tipo BOD por duas semanas, sob temperatura de 25°C. Após o período de pré-incubação, cada amostra recebeu solução de K^{15}NO_3 com auxílio de pipeta automática, a uma taxa de 3 μg de N g^{-1} de solo, com um excesso isotópico de 53,6 % em átomos de ^{15}N . Do mesmo modo que na amonificação bruta (AB), a nitrificação bruta (NB) foi determinada por meio da diluição isotópica do reservatório de $^{15}\text{NO}_3^-$ pela nitrificação do NH_4^+ com abundância natural de ^{15}N . Depois de aplicada a solução marcada com $^{15}\text{N-NO}_3^-$, restabeleceu-se a umidade dos solos para 60 % da CMRA e as mesmas permaneceram incubadas em BOD, sob as mesmas condições anteriormente estabelecidas.

Do mesmo modo que a extração de N-NH_4^+ , a extração de N-NO_3^- foi realizada em amostras distintas em dois tempos, sendo o primeiro tempo 24 h depois da

marcação isotópica e o segundo, a 96 h. As amostras de solo receberam 100 mL de solução de KCl 2 mol L⁻¹ na relação 1:5 (solo:solução – m/v), desse modo permaneceram agitando por 1 hora e, em seguidas foram filtradas em papel filtro (CANTERELLA; TRIVELIN, 2001). As soluções extratoras foram analisadas pelo sistema de injeção em fluxo (FIA), com o intuito de quantificar o conteúdo de N-NO₃⁻. Nesta determinação, os íons NO₃⁻ foram reduzidos a NO₂⁻ após passagem por uma coluna de cádmio, com posterior reação do NO₂⁻ com sulfanilamida, sendo a determinação realizada por espectrofotometria (GINÉ et al., 1980).

Com a finalidade de obter a concentração do N-¹⁵NO₃⁻, foi realizado o método da microdifusão, com as adaptações provenientes do Capítulo 3. Neste caso, também foram elaborados os sistemas de microdifusão, para captura do ¹⁵N. Inicialmente, o pré-tratamento das amostras eliminando o N-NH₄⁺ nativo presente, de acordo com estudo do Capítulo 4. Para isso, foram adicionados em recipientes de vidro quantidade de extrato de KCl equivalente a 100 µg N-NO₃⁻ e 0,2 g de MgO calcinado. Em seguida, as amostras foram destampadas e acondicionadas no interior de uma capela de exaustão por 72 h para eliminação do N-NH₄⁺ via NH₃. Após 72 h, adicionou-se em cada frasco o sistema de microdifusão e 0,2 g de liga de Devarda (pó finamente moído composto pelos metais Al, Cu e Zn, responsáveis pela redução do NO₂⁻ e NO₃⁻ à NH₄⁺). Assim, as amostras permaneceram por 24 h sob agitação, para garantia da captura pelo sistema de microdifusão do NO₃⁻ reduzido à NH₃.

Depois da agitação, os sistemas de microdifusão permaneceram em dessecador para eliminação da umidade. Secos, os filtros foram colocados em cápsulas de estanho, pesados e levados para determinação de abundância de ¹⁵N retido em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL, Sercon Inc., Crewe, GBR).

Depois de realizado a quantificação do N-NO₃⁻ e do método laboratorial da microdifusão para determinações de abundância calculada de ¹⁵N-NO₃⁻ (pelo método da diluição isotópica, subtraindo o valor 0,366 % das amostras), foram realizados cálculos para estimar a taxa de NB, através da equação descrita por Barraclough et al. (1985), fazendo-se as modificações necessárias.

5.2.3 Análises estatísticas

Os resultados obtidos de concentração de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , abundância isotópica de $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$, TAB e TNB foram submetidos à análise estatística (ANOVA) utilizando-se o teste F, e em caso de significância, as médias foram comparadas entre si pelo teste t (LSD) ($P \leq 0,05$).

5.3 Resultados e Discussão

Foi verificado no solo arenoso (NQd) os menores valores de N-NH_4^+ ($3 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo) após 24 h da aplicação do ^{15}N , distinguindo-se dos demais solos (Tabela 6). Após 96 h da aplicação do ^{15}N , o solo LVe apresentou maior valor no conteúdo de N-NH_4^+ em relação ao LVAd e NQd. Para o N-NO_3^- extraído após 24 h da marcação isotópica, o solo argiloso (LVe) apresentou maior conteúdo de N-NO_3^- , com valores intermediários para o LVAd e o solo NQd com os valores mais baixos. Após 96 h da marcação do reservatório N-NO_3^- , foi verificado o mesmo padrão descrito para a extração após 24 h. Os menores valores de N-mineral verificados no solo NQd podem ser explicados pelo menor conteúdo de C orgânico e N total, além da textura do mesmo (Tabela 5), que incidem diretamente na atividade microbiológica e consequentemente sobre a mineralização e nitrificação (MARIANO et al., 2013).

Com exceção ao solo LVAd, houve redução nos valores de N-NH_4^+ entre as extrações realizadas após 24 e 96 h após a marcação com ^{15}N (Tabela 6). O decréscimo de N-NH_4^+ obtido entre os dois tempos evidencia o consumo desta fração, ocasionado pelas rotas que o N está sujeito a sofrer, como a nitrificação e/ou imobilização. Videla (2004) e Moraes (2012) observaram resultados semelhantes. Houve aumento no tamanho do reservatório de N-NO_3^- entre os dois tempos de extração nos solos LVe e LVAd, evidenciando a entrada de NO_3^- oriundo da nitrificação do NH_4^+ . O solo NQd não apresentou alteração conteúdo de N-NO_3^- , possivelmente atribuída à baixa atividade de microrganismos nitrificadores.

As médias de enriquecimento isotópico de ^{15}N da fração N-NH_4^+ variaram de 14,9 a 33,7 % em átomos de ^{15}N na primeira extração, enquanto que na segunda extração, os conteúdos de enriquecimento diminuíram para 17,8 a 9,7 % de ^{15}N (Tabela 6). Esta situação reflete a entrada do ^{14}N proveniente da amonificação.

Tabela 6 - Conteúdo de N-NH_4^+ , de N-NO_3^- e abundância de ^{15}N nas respectivas frações do N-mineral do solo, avaliados na primeira extração (24 h) e segunda extração (96 h) após a aplicação do traçador nas parcelas experimentais

Solo	N-NH_4^+		N-NO_3^-		$\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$		$\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$	
	$\mu\text{g g}^{-1}$				% de átomos com correção			
	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
LVe	5,7 ^{aA1}	2,4 ^{bB}	19,6 ^{aB}	23,3 ^{aA}	20,9 ^{bA}	10,1 ^{bB}	6,6 ^{cA}	6,0 ^{cA}
LVA _d	6,9 ^{aA}	6,1 ^{aA}	8,4 ^{bA}	10,1 ^{bA}	14,9 ^{cA}	9,7 ^{bB}	14,4 ^{bA}	13,0 ^{bB}
NQ _d	3,0 ^{bA}	1,2 ^{bB}	3,5 ^{cA}	3,4 ^{cA}	33,7 ^{aA}	17,8 ^{aB}	23,4 ^{aA}	22,3 ^{aA}

¹: Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha, separadamente para N-NH_4^+ , N-NO_3^- , $\text{N-}^{15}\text{NH}_4^+$ e $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$, não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($P \leq 0.05$)

Os valores obtidos de enriquecimento do isótopo de ^{15}N da fração N-NO_3^- no primeiro tempo de extração variaram de 6,6 a 23,4 % de ^{15}N e, no segundo tempo, os resultados permaneceram entre 6,0 e 22,3 %. A maior estabilidade na abundância de $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$ entre os tempos é explicada pela menor transformação que esse ânion sofre no solo em relação ao NH_4^+ , onde este último é nitrificado e imobilizado intensamente. No caso do NO_3^- , ocorre menor taxa de imobilização do mesmo em relação ao NH_4^+ pelos microrganismos (RECOUS et al., 1990), além da baixa taxa de desnitrificação desse ânion em condições aeróbias (WEIER et al., 1996).

A diluição na abundância de átomos de ^{15}N ocorrida entre as extrações efetuadas após 24 e 96 h da aplicação dos tratamentos permitiu os cálculos das taxas brutas de amonificação e nitrificação. Entretanto, os valores da abundância de ^{15}N ficaram, em alguns casos, acima do limite (10 % de átomos de ^{15}N) considerado adequado para análise no espectrômetro de massas em questão. Problemas como a ocorrência de “efeito memória” entre as amostras e a ausência de padrões de trabalho com elevada abundância de ^{15}N (acima de 10 %) devem ser evitados. Desse modo, é recomendável a utilização de compostos marcados em ^{15}N com menor abundância do isótopo, com valores próximos a 20 e 10 % de átomos de ^{15}N para estudos envolvendo a amonificação e nitrificação bruta de N respectivamente.

Em relação à TAB (Gráfico 1), os valores podem ser considerados relativamente baixos, sendo que os solos LVe e LVA_d apresentaram as maiores taxas, 1,39 e 1,41 $\text{mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ respectivamente, possivelmente explicado pelo maior conteúdo de C orgânico e N total dos referidos solos em relação ao NQ_d, com

menores valores de TAB ($0,67 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Os valores de TAB verificados no presente estudo são semelhantes aos obtidos por Pilbeam e Warren (1995) e Videla (2004). Moraes (2012) avaliou a TAB em dois solos do estado de São Paulo cultivados com cana-de-açúcar e verificou valores semelhantes aos obtidos neste trabalho.

A TNB mostrou-se inferior à TAB, independentemente do solo ($P < 0,01$). Este resultado pode ser consequência da menor diversidade de microrganismos atuantes na nitrificação comparada com a amonificação. A conversão do N orgânico à NH_4^+ é realizada por uma ampla gama de microrganismos, que incluem fungos, bactérias e arqueias, enquanto que o processo de nitrificação (compreendido pela nitritação e nitratação) é efetuado por microrganismos específicos, como as bactérias do gênero *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* e *Nitrospira* (CANTARELLA, 2007). Além disso, fatores abióticos como disponibilidade de N-NH_4^+ , oxigênio, pH, umidade e temperatura do solo afetam diretamente este processo (CANTARELLA, 2007).

Gráfico 1 - Taxas de amonificação (TAB) e nitrificação brutas de N (TNB) em solos cultivados com cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil. LVe: LATOSSOLO VERMELHO eutrófico; LVAd: LATOSSOLO VERMELHO distrófico; NQd: NEOSSOLO QUARTZARÊNICO distrófico. Letras maiúsculas iguais para valores de TAB e letras minúsculas iguais para valores de TNB não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($P \leq 0,05$)

O solo LVe apresentou TNB de $0,71 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de N, enquanto que o LVd e NQd indicaram menores valores ($0,45$ e $0,14 \text{ mg de N kg}^{-1} \text{ de solo dia}^{-1}$ de N respectivamente) (Gráfico 1). Assim como descrito anteriormente para a TAB, a menor atividade microbiológica nos solos LVAd e NQd pode explicar os reduzidos valores de TNB obtidos nos solos em questão. Os valores de TNB no presente estudo são inferiores ao verificados por outros autores que avaliaram a TNB em solos de regiões temperadas (ZAMAN et al., 1999; PARKER; SCHIMEL, 2010).

5.4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que não é recomendável a utilização de compostos com alto enriquecimento do isótopo ^{15}N para estudo da técnica da diluição do isótopo. Menores valores de abundância de ^{15}N devem ser empregados para estudos dessa natureza.

A técnica da diluição do isótopo foi eficiente para cálculo da TAB e TNB dos solos, ocorrendo diluição da abundância de ^{15}N nos reservatórios marcados com o isótopo. Foram observados valores reduzidos de TAB e TNB no solo mais arenoso.

Referências

BARRACLOUGH, D.; GEENS, E.L.; DAVIES, G.P.; MAGGS, J.M. The use of single and double labelled ^{15}N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 593–603, 1985.

BENGTSSON, G.; BENGTSON, P.; MANSSON, K.F. Gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 143–154, 2003.

BENGTSON, P.; FALKENGREN-GRERUP, U.; BENGTSSON, G. Relieving substrate limitation-soil moisture and temperature determine gross N transformation rates. **Oikos**, Kobenhavn, v. 111, p. 81-90, 2005.

BOECKXA, P.; ACCOEA, F.; BUSSCHAERTA, J.; HOFMANB, G.; VAN CLEEMPUTA, O. Gross N transformation rates and net N mineralisation rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grassland soils of different age. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 2075–2087, 2004.

BREMNER, J.M. Nitrogen total. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. pt. 3. Chemical methods. Madison: SSSA, 1996. p.1085-1121.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O. Determinação de nitrogênio inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor. In: RAIJ, B.V.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. (Ed.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2001.p. 270-276.

CHRISTENSON, L.M.; LOVETT, G.M.; WEATHERS, K.C. The influence of tree species, nitrogen fertilization, and soil C to N ratio on gross soil nitrogen transformations. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 638-646, 2009.

CORRE, M.D.; SCHNABEL, R.R.; STOUT, W.L. Spatial and seasonal variation of Gross nitrogen transformations and microbial biomass in Northeastern US grassland. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 445-457, 2002.

D'ANDRÉA, M.S.C. **Mineralização de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 40 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Agrônoma) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

DAVIDSON, E.A.; HART, S.C.; SHANK, C.A.; FIRESTONE, M.K. Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. **Journal of Soil Science**, Baltimore, v. 42, p. 335-349, 1991.

DONG, W.X.; HU, C.S.; ZHANG, Y.M.; WU, D. Gross mineralization, nitrification and N_2O emission under different tillage in the North China Plain. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.97, p. 237-247, 2012.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.

GEE, G.W.; BAUDER, J.W. Particle-size analysis. In: KLUTE, A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Physical and mineralogical methods. Madison: ASA; SSSA, 1986. p.383-411.

GINÉ, M.F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flows injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 191-197, 1980.

MARIANO, E.; TRIVELIN, P.C.O.; LEITE, J.M.; MEGDA, M.X.V.; OTTO, R.; FRANCO, H.C.J. Incubation methods for assessing mineralizable nitrogen in soils under sugarcane. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 450-461, 2013.

MATAR, A.E.; BECK, D.P.; PALA, M.; GARABET, S. Nitrogen mineralization potentials of selected Mediterranean soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.22, p.23-36, 1991.

MORAES, M.I.M. **Mineralização bruta (amonificação) de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MURPHY, D.V.; RECOUS, S.; STOCKDALE, E.A.; FILLERY, I.R.P.; JENSEN, L.S.; HATCH, D.I.; GOULDING, K.W.T. Gross nitrogen fluxes in soil: Theory, measurement and application of ^{15}N pool dilution techniques. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 79, p. 69-118, 2003.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. pt 3. Chemical methods. Madison: SSSA, 1996. p.961-1010.
PARKER, S.S.; SCHIMMEL, J.P. Invasive grasses increase nitrogen availability in California grassland soils. **Invasive Plant Science and Management**, Lawrence, v. 3, p. 40-47, 2010.

PILBEAM, C.J.; WARREN, G.P. Use of ^{15}N for fertilizer N recovery and N mineralization studies in semi-arid Kenya. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 123-128, 1995.

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

RECOUS, S.; MARY, B.; FAURIE, G. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in cultivated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 22, p. 913-922, 1990.

RECOUS, S.; AITA, C.; MARY, B. In situ changes in gross N transformations in bare soil after addition of straw. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 31, p. 119-133, 1999.

REIS, B.F.; KRUG, F.J.; VIEIRA, J.A.; GINÉ, M.F. Development of a flow injection system with two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, p. 523-528, 1997.

SØRENSEN, P.; JENSEN, E.S. Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to a polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.5, p.201–203, 1991.

VIDELA, C.D.C. **Mineralização bruta do nitrogênio em um Molisol do sudeste da Província de Buenos Aires (Argentina)**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

WEIER, K.L.; McEWAN, C.W.; VALLIS, I.; CATCHPOOLE, V.R.; MYERS, R.J. Potential for biological denitrification of fertilizer nitrogen in sugarcane soils. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 47, p. 67-79, 1996.

ZAMAN, H.J.D.; CAMERON, K.C.; FRAMPTON, C.M. Gross nitrogen mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and the soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer at different water potentials. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, p. 178-186, 1999.

6 AMONIFICAÇÃO E NITRIFICAÇÃO BRUTA EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR E BRAQUIÁRIA

Resumo

Os processos de amonificação e a nitrificação dos solos são fundamentais, pois disponibilizam N-mineral (NH_4^+ e NO_3^-) às plantas. Assim, o conhecimento das taxas brutas desses processos é de grande importância. Foi demonstrado que a cana-de-açúcar tem preferência por NH_4^+ à NO_3^- , podendo apresentar maior produtividade quando nutrida por NH_4^+ . Adicionalmente, estudos recentes indicaram que a nitrificação no solo pode ser inibida por exsudados radiculares de espécies do gênero *Brachiaria*. Assim, objetivou-se quantificar a taxa de amonificação (TAB) e nitrificação bruta (TNB) em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária. Foram determinadas a TAB e TNB de 18 solos cultivados com cana-de-açúcar, seis solos com pastagens diversas, além de um solo de floresta (referência). Os solos de cana-de-açúcar apresentaram valores reduzidos de TAB e TNB. Não foi possível calibrar os índices TAB, TNB e TAB/TNB como preditores do N mineralizável em solos sob cultivo de cana-de-açúcar. Para os solos provenientes de pastagens, verificaram-se valores extremamente baixos de TNB em locais com cultivo de *Brachiaria humidicola*.

Palavras-chave: Mineralização de N; Inibição da nitrificação; Exsudatos de raízes; *Saccharum* spp.; *Brachiaria* spp.

Abstract

The ammonification and nitrification process of soils are critical because they release mineral N (NH_4^+ e NO_3^-) to the plants. Thus, the knowledge of gross rates of these processes is quite important. It was shown that sugarcane has a preference to uptake NH_4^+ instead of NO_3^- , and may have higher yield when supplied with only NH_4^+ . In addition, recent studies have indicated that nitrification in the soil can be inhibited by root exudates of *Brachiaria* species. Thereby, the aims of this study were to quantify the gross rates of ammonification (GRA) and nitrification (GRN) in soils cropped with sugarcane and pasture. GRA and GRN were determined in 18 soils under sugarcane, six soils cropped with some pasture types and a soil under forest (reference). Soils under sugarcane showed low values of GRA and GRN. The calibration of GRA, GRN and GRA/GRN as indexes to predict the mineralizable N in soils under sugarcane was unsuccessful. For pastures, it was verified extremely low values of GRN in soils under *Brachiaria humidicola*.

Keywords: N mineralization; Inhibition of nitrification; Root exudates; *Saccharum* spp. *Brachiaria* spp.

6.1 Introdução

A colheita da cana-de-açúcar sem despalha a fogo, prática agrícola que permite o recobrimento de resíduos culturais sobre o solo, traz alterações no comportamento biológico, físico e químico do ambiente, melhorando a fertilidade dos solos canavieiros em comparação com áreas com queima prévia da cultura (VIEIRA, 2009). Em relação ao N, Cantarella et al. (2007) demonstraram que grande parte do nutriente mineral absorvido pela cultura é proveniente do solo, disponibilizado por meio dos processos de mineralização e nitrificação atuantes. Entretanto, Vitti et al. (2011) indicaram que o N resultante da mineralização da palhada de cana-de-açúcar não é tão expressivo para a nutrição vegetal, dada a baixa taxa de mineralização deste resíduo vegetal no campo ao longo do ciclo da cana-de-açúcar.

Contudo, Franco et al. (2011) observaram que o N proveniente do fertilizante tem menor contribuição no ciclo de cana planta em relação à soqueira da cultura. Em ambos os casos, todavia, a principal fonte de N para a cultura foi o N mineral disponibilizado pelo solo (FRANCO et al., 2011). Um tópico recente que tem despertado a atenção da comunidade científica mundial diz respeito à preferência da cana-de-açúcar por NH_4^+ em detrimento ao NO_3^- (DE ARMAS et al., 1992; ROBINSON et al., 2011). No mesmo estudo, os pesquisadores verificaram ainda a baixa capacidade de variedades australianas de cana-de-açúcar no armazenamento de NO_3^- em vacúolos no interior da planta (ROBINSON et al., 2011). Desse modo, é possível que a utilização de fertilizantes amoniacais associados com aditivos inibidores do processo de nitrificação no solo possa aumentar o aproveitamento do N-fertilizante para culturas que tenham preferência por NH_4^+ , incluindo a cana-de-açúcar.

Outro importante setor agrícola no Brasil com grande extensão territorial são as pastagens, sendo grande parte das áreas cultivadas com espécies do gênero *Brachiaria* (MARTHA JÚNIOR et al., 2007). Estudos alentadores verificaram que algumas espécies de *Brachiaria*, tais como a *B. humidicola*, *B. decumbens*, *B. dictyonara*, *B. hybrid* e *B. brizantha*, exsudam pelo sistema radicular uma substância identificada como diterpeno cíclico. Esta substância é capaz de inibir a atividade de bactérias nitrificantes, afetando negativamente a taxa bruta de nitrificação (TBN) no solo (SUBBARAO et al., 2003, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008, 2009; GOPALAKRISHNAN et al., 2007, 2009).

Com isto, espera-se encontrar em pastagens cultivadas com as espécies de braquiárias citadas acima, maior proporção de N mineral na forma de NH_4^+ em relação à de NO_3^- . A alta ocorrência de pastagens degradadas no Brasil, associada à elevada demanda de terras no Cerrado para cultivo da cana-de-açúcar (MARTHA JÚNIOR et al., 2007), apresenta um cenário interessante para a expansão de canaviais em solos anteriormente ocupados por pastagem, especialmente do gênero *Brachiaria*. O cultivo de cana-de-açúcar nesses solos pode favorecer a manutenção do NH_4^+ aplicado via fertilizante amoniacal, devido à presença dos exsudatos (braquiolactana) disponibilizados ao longo do tempo pela pastagem. Com isso, pode ocorrer maior aproveitamento do N-fertilizante e consequente aumento na produtividade de colmos e açúcar. Portanto, estas questões demandam elucidar o potencial comportamento das formas minerais de N em áreas agrícolas, avaliar a suposta eficiência do N proveniente da matéria orgânica do solo e contribuir com sugestões para mudanças no manejo nesses sistemas.

Do exposto anteriormente podem ser propostas as seguintes hipóteses: (i) solos tradicionais de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, possuindo maiores taxas de amonificação (TAB) que de nitrificação bruta, apresentam maiores produtividades de colmo em relação à solos com maiores taxas de nitrificação bruta, dada a possibilidade de preferência da cultura cana-de-açúcar pelo N na forma amoniacal; (ii) solos sob pastagens cultivados por muito tempo com espécies do gênero *Brachiaria*, comparados com os de cultivo tradicional com cana-de-açúcar, possuem menor taxa de nitrificação bruta, consequentemente, menores teores de N- NO_3^- e maiores concentrações de N- NH_4^+ .

Baseado nas hipóteses acima, objetivou-se quantificar as taxas de amonificação e de nitrificação brutas em solos: (i) cultivados sucessivamente com cana-de-açúcar por longo período; (ii) sob pastagens, com histórico de cultivo de espécies do gênero *Brachiaria*. Desse modo será avaliada a influência do sistema de cultivo sobre os processos de mineralização (amonificação e nitrificação brutas) do N em solos. Em solos cultivados com cana-de-açúcar será avaliada se há uma relação das taxas de amonificação e nitrificação brutas com a produtividade da cultura (resposta à fertilização nitrogenada).

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Amostras experimentais

Os solos utilizados neste estudo são provenientes de municípios localizados no Estado de São Paulo, Brasil. As amostragens de solo foram realizadas em 18 áreas cultivadas com cana-de-açúcar, 6 áreas com espécies de braquiárias e 1 área com fragmento de floresta estacional semidescídua (área de referência, sem histórico de ação antrópica). A descrição das áreas experimentais se encontra na Tabela 7.

Todos os solos cultivados com cana-de-açúcar são oriundos de experimentos envolvendo a aplicação de doses de N em soqueiras colhidas sem despalha a fogo. Em 11 sítios foram aplicadas as doses de 50, 100, 150 kg ha⁻¹ de N, enquanto que nas demais áreas (7), foram utilizadas as doses de 50, 100, 150 e 200 kg ha⁻¹ de N. Também foram incluídas parcelas controle (sem aplicação de N) em todos os experimentos. Em todas as parcelas também se aplicou P e K (na forma de superfostato triplo e cloreto de potássio, respectivamente) de acordo com as recomendações de Spironelo et al. (1997). As amostras de solo foram coletadas com auxílio de trado do tipo holandês na profundidade 0-20 cm, apenas nas parcelas controle (sem aplicação de N), realizando-se de 9 a 12 amostragens simples para a composição de uma amostra composta por parcela. O delineamento experimental usado nos sítios foi em blocos ao acaso, com quatro ou cinco repetições.

Os solos de pastagem (cultivados com espécies do gênero *Brachiaria*) foram coletados no campo experimental da EMBRAPA (Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária) - Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos. As amostragens foram realizadas em locais com diferentes tipos de solos e variedades de braquiárias. Em todas as áreas de pastagem não há histórico de aplicação recente de N na cultura. Do mesmo modo que o realizado nas áreas sob cana-de-açúcar, a amostragem de foi efetuada na camada de 0-20 cm do perfil de solo. As amostras de solo provenientes do fragmento de floresta estacional semidescídua também foram coletados no campo experimental da EMBRAPA, em local próximo às áreas sob pastagem. Nos solos sob pastagem e floresta, foram obtidas quatro amostras compostas por área experimental. Para a composição de uma amostra composta de solo, se efetuou a coleta de 8 a 10 amostras simples por parcela.

No laboratório, inicialmente foram removidas raízes de plantas e macrofauna presentes nas amostras de solo. Em seguida, as amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 40°C por aproximadamente 48 h. Posteriormente, as mesmas foram moídas em moinho de solo e peneiradas em peneira de malha ≤ 2 mm de abertura e, armazenadas em recipientes plásticos herméticos.

Tabela 7 - Descrição das áreas experimentais cultivadas com cana-de-açúcar, braquiárias e solo de floresta estacional semidescídua

(continua)

Local	Município	Coordenadas	Solo ¹	Vegetação	Variedade/Cultivar ²	Ano de amostragem
1	Piracicaba	22°35'S 47°37'W	LVd	Cana-de-açúcar	SP89-1115	2009
2	Novo Horizonte	21°31'S 49°19'W	LVAAd	Cana-de-açúcar	SP91-1285	2011
3	Jaboticabal	21°19'S 48°10'W	LVe	Cana-de-açúcar	SP80-3280	2007
4	Assis	22°30'S 50°24'W	LVd	Cana-de-açúcar	SP83-2847	2008
5	Novo Horizonte	21°32'S 49°20'W	LVAAd	Cana-de-açúcar	CTC-15	2011
6	Piracicaba	22°40'S 47°38'W	NVe	Cana-de-açúcar	IAC91-1099	2011
7	Piracicaba	22°41'S 47°38'W	LVe	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2011
8	Jaú	22°33'S 48°17'W	LVd	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2011
9	Sta. Maria da Serra	22°13'S 48°36'W	NQd	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2011
10	Piracicaba	22°40'S 47°38'W	NVe	Cana-de-açúcar	IAC91-1099	2010
11	Tabapuã	20°58'S 49°03'W	AVd	Cana-de-açúcar	RB955970	2012
12	Tabapuã	20°57'S 49°03'W	AVd	Cana-de-açúcar	RB955970	2012
13	Pereira Barreto	20°43'S 51°07'W	LVd	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2012
14	Novo Horizonte	21°31'S 49°19'W	LVAAd	Cana-de-açúcar	SP91-1285	2012
15	Novo Horizonte	21°32'S 49°20'W	LVAAd	Cana-de-açúcar	CTC-15	2012
16	Sta. Maria da Serra	22°13'S 48°36'W	NQd	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2012

Tabela 7 - Descrição das áreas experimentais cultivadas com cana-de-açúcar, braquiárias e solo de floresta estacional semidescídua
(conclusão)

Local	Município	Coordenadas	Solo	Vegetação	Variedade/Cultivar ²	Ano de amostragem
17	Jaú	22°33'S 48°17'W	LVd	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2012
18	Piracicaba	22°41'S 47°38'W	LVe	Cana-de-açúcar	SP81-3250	2012
19	São Carlos	21°59'S 47°51'W	LVA	Pastagem	<i>Brachiaria humidicola</i>	2013
20	São Carlos	21°58'S 47°51'W	LVA	Pastagem	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés	2013
21	São Carlos	21°57'S 47°50'W	NQ	Pastagem	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i> cv. Marandu	2013
22	São Carlos	21°57'S 47°50'W	NQ	Pastagem	<i>B. decumbens</i> e <i>B. brizantha</i> cv. Marandu	2013
23	São Carlos	21°57'S 47°51'W	NQ	Pastagem	<i>B. decumbens</i> , <i>B. humidicola</i> e <i>P. notatum</i>	2013
24	São Carlos	21°57'S 47°51'W	NQ	Pastagem	<i>B. decumbens</i> , <i>B. humidicola</i> e <i>P. notatum</i>	2013
25	São Carlos	21°57'S 47°51'W	NQ	Floresta	Estacional semidescídua	2013

¹: LVd: LATOSSOLO VERMELHO distrófico; LVAd: LATOSSOLO VERMELHO AMARELO distrófico; LVe: LATOSSOLO VERMELHO eutrófico; NVe: NITOSSOLO VERMELHO eutrófico; NQd: NEOSSOLO QUARTZARÊNICO distrófico; AVd: ARGISSOLO VERMELHO distrófico (EMBRAPA, 2013). ²: *P. notatum*: *Paspalum notatum*.

6.2.2 Determinações físico-químicas do solo

Os atributos físico-químicos de cada amostra de solo foram analisados em laboratório, sendo os resultados descritos na Tabela 8. O pH do solo foi determinado utilizando-se solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ na relação 1:2,5 (solo:solução), de acordo com Raij et al. (2001). A composição textural das amostras de solo foi determinada pelo método do densímetro (GEE; BAUDER, 1986).

A determinação do C orgânico do solo (COS), realizada segundo Nelson e Sommers (1996), consistiu na oxidação do C orgânico à CO_2 por meio de solução de 5 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ e 7,5 mL de H_2SO_4 18 mol L^{-1} , em elevada temperatura (150°C) por 30 min em bloco digestor. Após o período de digestão, foi adicionado às amostras 0,2 mL de solução indicadora (ácido N-fenilantranílico), com posterior titulação com solução de $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Para obtenção do conteúdo de N total do solo (NTS) foi realizada digestão ácida de acordo com Bremner (1996). Amostras de solo foram adicionadas em tubo digestor, adicionando-se 1 mL de KMnO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, 2 mL de H_2SO_4 9 mol L^{-1} , uma gota de álcool octílico e 0,5 g de Fe reduzido. Desse modo, os tubos foram mantidos em bloco digestor por 45 min a 100°C para redução do NO_2^- e NO_3^- à NH_4^+ . Em sequência, foi adicionado aos tubos 1,1 g de mistura digestora (composta por K_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e Se, relação 100:10:1, respectivamente) e 3 mL de H_2SO_4 18 mol L^{-1} , assim foram levados para o bloco digestor onde permaneceram por 2,5 h a 250°C e 5 h a 350°C . Após a digestão, as amostras foram transferidas para balão de destilação e, a destilação ocorreu com auxílio de 10 mL de NaOH 18 mol L^{-1} , sendo a amostra recebida em 2 mL de H_3BO_3 2%. Logo após destiladas, as amostras foram tituladas com H_2SO_4 $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ padronizado.

A capacidade máxima de retenção de água (CMRA) de cada solo foi calculada de acordo com ISO (2003), com pequenas modificações. Em copos plásticos de 50 mL, perfurados na base e selados com membrana (abertura de malha de 100 Mesh), foram adicionados 20 g de solos (em duplicata). Os copos permaneceram por 3 h em bandejas plásticas contendo lâmina de água, visando à saturação dos poros via ascensão capilar. Em seguida, os copos plásticos contendo os solos saturados foram transferidos para bandejas contendo areia úmida e mantidos por 2 h para drenagem da água livre e consequente obtenção da capacidade máxima de retenção de água. Após este período, uma porção do solo umedecido foi transferida

para recipiente metálico e levadas à estufa para secagem a 105°C por 24 h. Com base nos valores de umidade obtidos, determinou-se a capacidade máxima de retenção de água (CMRA) de cada amostra de solo.

Os teores de N-NH_4^+ e N-NO_3^- dos solos foram obtidos de acordo com a metodologia proposta por Canterella e Trivelin (2001). Amostras de solo seco receberam solução de KCl 2 mol L^{-1} , na relação 1:5 (solo:solução – m/v) e, desse modo permaneceram agitando por 1 h. Na sequência, as soluções foram filtradas em papel de filtro. Após a filtragem, o conteúdo de N–mineral foi determinado por meio de sistemas de análise por injeção em fluxo (AIF). O N-NH_4^+ foi obtido por condutimetria (REIS et al., 1997), enquanto que o N-NO_3^- foi mensurado por colorimetria (GINÉ et al., 1980).

Tabela 8 - Propriedades físico-químicas de solos cultivados com cana-de-açúcar e pastagem, e floresta estacional semidescídua, coletados na camada de 0-20 cm. Valores representam média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$ ou 5)

(continua)

Solo ¹	pH CaCl ₂	COS g kg ⁻¹	NTS	C/N	Areia	Silte g kg ⁻¹	Argila	CMRA g g ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg kg ⁻¹	N-NO ₃ ⁻
Cana-de-açúcar										
LVd	4,5 $\pm$ 0,1	21,1 $\pm$ 0,4	1,25 $\pm$ 0,02	16,9 $\pm$ 0,4	449 $\pm$ 4	74 $\pm$ 4	477 $\pm$ 0	0,410 $\pm$ 0,005	9,2 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 1,4
LVA	4,5 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,3	0,60 $\pm$ 0,02	10,9 $\pm$ 0,2	745 $\pm$ 3	36 $\pm$ 3	220 $\pm$ 6	0,301 $\pm$ 0,007	4,6 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 1,2
LVe	4,9 $\pm$ 0,0	15,1 $\pm$ 0,4	1,38 $\pm$ 0,03	10,9 $\pm$ 0,1	246 $\pm$ 2	137 $\pm$ 6	618 $\pm$ 6	0,460 $\pm$ 0,002	9,7 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1
LVd	4,8 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,6	0,43 $\pm$ 0,04	11,8 $\pm$ 0,3	858 $\pm$ 6	23 $\pm$ 3	120 $\pm$ 4	0,268 $\pm$ 0,003	4,8 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0
LVA	4,9 $\pm$ 0,0	5,5 $\pm$ 0,4	0,47 $\pm$ 0,04	13,9 $\pm$ 1,2	815 $\pm$ 18	31 $\pm$ 2	154 $\pm$ 16	0,250 $\pm$ 0,004	3,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,6
NVe	4,5 $\pm$ 0,0	13,4 $\pm$ 0,2	1,03 $\pm$ 0,01	12,9 $\pm$ 0,3	419 $\pm$ 11	89 $\pm$ 3	492 $\pm$ 12	0,381 $\pm$ 0,002	9,3 $\pm$ 0,7	3,3 $\pm$ 0,4
LVe	5,0 $\pm$ 0,2	14,5 $\pm$ 0,6	1,31 $\pm$ 0,08	11,1 $\pm$ 0,2	303 $\pm$ 15	132 $\pm$ 7	566 $\pm$ 22	0,407 $\pm$ 0,004	5,9 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,6
LVd	4,7 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,4	0,57 $\pm$ 0,02	12,7 $\pm$ 0,3	763 $\pm$ 5	20 $\pm$ 1	217 $\pm$ 6	0,269 $\pm$ 0,004	3,8 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,7
NQd	5,2 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,2	0,26 $\pm$ 0,00	14,9 $\pm$ 0,6	900 $\pm$ 12	21 $\pm$ 4	78 $\pm$ 8	0,215 $\pm$ 0,002	1,8 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
NVe	4,9 $\pm$ 0,1	15,6 $\pm$ 0,2	1,23 $\pm$ 0,03	12,7 $\pm$ 0,2	312 $\pm$ 2	86 $\pm$ 2	602 $\pm$ 0	0,390 $\pm$ 0,004	9,5 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,1
AVd	4,7 $\pm$ 0,0	4,3 $\pm$ 0,1	0,41 $\pm$ 0,01	10,3 $\pm$ 0,2	812 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4	161 $\pm$ 6	0,256 $\pm$ 0,003	3,3 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3
AVd	5,2 $\pm$ 0,0	4,5 $\pm$ 0,1	0,38 $\pm$ 0,01	11,8 $\pm$ 0,3	805 $\pm$ 4	44 $\pm$ 4	151 $\pm$ 0	0,253 $\pm$ 0,001	3,2 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,3
LVd	5,0 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,1	0,56 $\pm$ 0,01	10,8 $\pm$ 0,1	820 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	151 $\pm$ 0	0,256 $\pm$ 0,024	3,6 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3
LVA	4,9 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,3	0,47 $\pm$ 0,03	10,8 $\pm$ 0,3	817 $\pm$ 15	26 $\pm$ 7	157 $\pm$ 16	0,223 $\pm$ 0,006	2,2 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,5
LVA	4,7 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1	0,58 $\pm$ 0,01	11,9 $\pm$ 0,2	743 $\pm$ 2	39 $\pm$ 11	219 $\pm$ 11	0,285 $\pm$ 0,002	3,4 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,2
NQd	5,2 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	0,26 $\pm$ 0,00	14,7 $\pm$ 0,3	878 $\pm$ 37	28 $\pm$ 3	94 $\pm$ 36	0,216 $\pm$ 0,002	0,6 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,2

Tabela 8 - Propriedades físico-químicas de solos cultivados com cana-de-açúcar e pastagem, e floresta estacional semidescídua, coletados na camada de 0-20 cm. Valores representam média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$ ou 5)

(conclusão)

Solo	pH CaCl ₂	COS g kg ⁻¹	NTS g kg ⁻¹	C/N	Areia g kg ⁻¹	Silte g kg ⁻¹	Argila g kg ⁻¹	CMRA g g ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg kg ⁻¹	N-NO ₃ ⁻ mg kg ⁻¹
LVd	4,5 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,2	0,58 $\pm$ 0,00	11,6 $\pm$ 0,4	760 $\pm$ 10	21 $\pm$ 5	220 $\pm$ 12	0,272 $\pm$ 0,003	2,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2
LVe	4,9 $\pm$ 0,1	13,5 $\pm$ 0,7	1,26 $\pm$ 0,07	10,7 $\pm$ 0,1	289 $\pm$ 11	121 $\pm$ 5	591 $\pm$ 8	0,404 $\pm$ 0,004	5,0 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 1,2
Pastagem										
LVA	4,6 $\pm$ 0,0	14,9 $\pm$ 0,0	0,95 $\pm$ 0,01	15,6 $\pm$ 0,1	609 $\pm$ 2	31 $\pm$ 2	361 $\pm$ 3	0,368 $\pm$ 0,006	7,5 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
LVA	5,4 $\pm$ 0,0	16,0 $\pm$ 0,0	1,17 $\pm$ 0,02	13,8 $\pm$ 0,2	632 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1	332 $\pm$ 1	0,342 $\pm$ 0,009	7,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
NQ	5,3 $\pm$ 0,0	23,2 $\pm$ 0,0	2,09 $\pm$ 0,01	11,1 $\pm$ 0,1	237 $\pm$ 4	146 $\pm$ 8	617 $\pm$ 6	0,531 $\pm$ 0,001	21,2 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,1
NQ	5,9 $\pm$ 0,0	20,9 $\pm$ 0,0	2,01 $\pm$ 0,00	10,4 $\pm$ 0,0	236 $\pm$ 1	186 $\pm$ 6	579 $\pm$ 7	0,534 $\pm$ 0,002	15,9 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1
NQ	4,9 $\pm$ 0,0	10,5 $\pm$ 0,0	0,71 $\pm$ 0,01	14,9 $\pm$ 0,3	709 $\pm$ 5	56 $\pm$ 3	236 $\pm$ 2	0,264 $\pm$ 0,004	20,5 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
NQ	4,6 $\pm$ 0,0	11,6 $\pm$ 0,0	0,85 $\pm$ 0,02	13,6 $\pm$ 0,3	677 $\pm$ 3	42 $\pm$ 2	282 $\pm$ 3	0,321 $\pm$ 0,009	20,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1
Floresta estacional semidescídua										
NQ	5,1 $\pm$ 0,0	24,3 $\pm$ 0,0	2,33 $\pm$ 0,05	10,4 $\pm$ 0,2	436 $\pm$ 1	73 $\pm$ 4	492 $\pm$ 3	0,395 $\pm$ 0,001	21,9 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 0,2

¹: LVd: LATOSSOLO VERMELHO distrófico; LVA: LATOSSOLO VERMELHO AMARELO distrófico; LVe: LATOSSOLO VERMELHO eutrófico; NVe: NITOSSOLO VERMELHO eutrófico; NQd: NEOSSOLO QUARTZARÊNICO distrófico; AVd: ARGISSOLO VERMELHO distrófico (EMBRAPA, 2013); pH determinado segundo Raij et al. (2001); COS: carbono orgânico do solo (BREMNER, 1996); NTS: nitrogênio total do solo (NELSON; SOMMERS, 1996); areia, silte e argila determinados com base em Gee e Bauder (1986); CMRA: capacidade máxima de retenção de água de acordo com ISO (2003), com modificações; N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ determinados segundo Cantarella e Trivelin (2001)

6.2.3 Incubação do solo

Como descrito no Capítulo 5, inicialmente as amostras de solo permaneceram sob pré-incubação para posterior determinação da TAB e TNB. Para isso, em recipientes de vidro foram adicionados 20 g de solo (com base em massa seca), realizou-se o umedecimento a 60 % da CMRA (estabelecida previamente) com água desionizada e cobertos com tampa plástica. As amostras de solo permaneceram pré-incubadas por 14 d em câmara tipo BOD (MA-415, Marconi LTDA, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 25°C. Durante a pré-incubação, a reposição de água foi efetuada a cada 48 h, quando necessário, preservando-se a umidade pré-estabelecida de cada amostra de solo. Para cada amostra de solo foram utilizadas seis repetições. Para a determinação das taxas brutas é necessário que os tratamentos (solos) sejam avaliados em dois tempos diferentes, portanto, três amostras foram utilizadas no tempo inicial e, as três restantes no tempo final.

6.2.4 Amonificação bruta (AB)

A metodologia para determinação da amonificação bruta tem o intuito de calcular a taxa de transformação do N-orgânico à N-NH_4^+ , através do uso de técnicas experimentais envolvendo o uso do isótopo ^{15}N , como foi detalhado no Capítulo 5. Após a pré-incubação, as amostras receberam uma alíquota pré-determinada de solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com auxílio de pipeta automática, na dose de $3 \mu\text{g}$ de N g^{-1} de solo, com um excesso isotópico de 20,2 % em átomos de ^{15}N (Figura 5a), baseado nos resultados obtidos no Capítulo 5. Após aplicação da solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ajustou-se a umidade das amostras de solo para 60 % da CMRA com auxílio de água desionizada, favorecendo a distribuição do $^{15}\text{NH}_4^+$ adicionado nas parcelas experimentais.

A extração do N-NH_4^+ foi realizada em amostras distintas, em dois períodos. A primeira extração foi efetuada 24 h após a marcação isotópica, enquanto que a segunda se deu em 96 h (Figura 5b). A extração das formas minerais de N (N-NH_4^+ + N-NO_3^-) foi realizada de acordo com Canterella e Trivelin (2001). Após a filtragem, foi determinada a quantidade de N-NH_4^+ de cada solução por meio de AIF condutimétrica supracitada (REIS et al., 1997).

Figura 5 - a) aplicação da solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; b) filtragem do solo com solução de KCL 2 mol L^{-1} ; c) solução extratora recebendo o sistema de microdifusão; d) sistemas de microdifusão em dessecador

Em sequência, foi avaliada a concentração do $^{15}\text{N-NH}_4^+$ pelo método da microdifusão, desenvolvido por Sørensen e Jensen (1991), mas com as adaptações conforme o Capítulo 3. Para isso, em recipientes de vidro foi adicionada quantidade de extrato de KCl equivalente a 100 $\mu\text{g N-NH}_4^+$, juntamente com um sistema de microdifusão (Figura 5c) e 0,2 g de MgO calcinado. Extratos de solo que apresentaram valores abaixo de 100 $\mu\text{g N-NH}_4^+$ receberam 60 $\mu\text{g N}$ na forma de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (método da adição padrão), atingindo assim o conteúdo de N mínimo para análise em espectrômetro de massas. Em seguida, os recipientes foram submetidos à agitação por 48 h, em ambiente escuro.

Após o período de agitação, os sistemas de microdifusão foram retirados das soluções e mantidos em dessecador (Figura 5d). Secos, os filtros foram colocados em cápsulas de estanho, pesados e, levados para determinação de abundância de $^{15}\text{N-NH}_4^+$ em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL, Sercon Inc., Crewe, GBR).

A TAB foi calculada pela seguinte equação, de acordo com Barraclough et al. (1985):

$$^*A_t = \frac{^*A_0}{\left(1 + \frac{(\theta_t)}{A_0}\right)^{m/\theta}}$$

onde $^*A_t$ é o excesso isotópico do reservatório de NH_4^+ (abundância de ^{15}N da amostra subtraída do valor de abundância natural de 0,366 % de ^{15}N) no tempo final t_t (96 h); $^*A_0$ representa o excesso isotópico do reservatório de NH_4^+ no tempo inicial t_0 (24 h); t é intervalo tempo em dias ($t_t - t_0$); A_0 indica o tamanho do reservatório

NH_4^+ no solo (mg kg^{-1}) no tempo inicial t_0 (24 h); $\theta = (*A_t - *A_0)/t$; m é igual à taxa de amonificação bruta ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

6.2.5 Nitrificação bruta (NB)

A técnica da NB tem o objetivo de avaliar a taxa de produção de N-NO_3^- no solo em estudo, para tanto foram realizados experimentos do mesmo modo que na AB. Porém, houve necessidade de adaptações para determinar a fração N-NO_3^- dos solos e, na análise da abundância de ^{15}N pelo método da microdifusão. Tal como na AB, 20 g das amostras de solo foram acondicionadas em recipientes de vidro, umedecidas a 60 % da CMRA do solo e mantidas pré-incubadas em câmara tipo BOD por 14 d, sob temperatura de 25°C .

Após o período de pré-incubação, cada amostra recebeu solução de K^{15}NO_3 com auxílio de pipeta automática, a uma taxa de $3 \mu\text{g de N g}^{-1}$ de solo, com um excesso isotópico de 10,13 % em átomos de ^{15}N , baseado nos resultados verificados no Capítulo 5. Depois de aplicada a solução marcada com $^{15}\text{N-NO}_3^-$, restabeleceu-se a umidade dos solos para 60% da CMRA e as mesmas permaneceram incubadas sob as mesmas condições anteriormente estabelecidas.

A extração de N-NO_3^- foi realizada em amostras distintas em dois tempos, sendo o primeiro tempo 24 h depois da marcação isotópica e o segundo, a 96 h. As amostras de solo receberam 100 mL de solução de $\text{KCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$ na relação 1:5 (solo:solução – m/v), desse modo permaneceram agitando por 1 hora e, em seguidas foram filtradas em papel filtro (CANTERELLA; TRIVELIN, 2001). Os extratos de KCl foram analisados por sistema de AIF colorimétrico supracitado (GINÉ et al., 1980).

Com a finalidade de obter a concentração do $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$, foi realizado o método da microdifusão, com as adaptações provenientes do Capítulo 3. Inicialmente, realizou-se a eliminação do N-NH_4^+ nativo presente nas amostras, de acordo com estudo do Capítulo 4. Para isso, foram adicionados em recipientes de vidro quantidade de extrato de KCl equivalente a $100 \mu\text{g N-NO}_3^-$ e 0,2 g de MgO calcinado, dessa modo as amostras foram levadas à capela onde permaneceram por 72 h (Figura 6a). Após este período, adicionou-se em cada frasco o sistema de microdifusão e liga de Devarda (Figura 6b e 6c). Assim, as amostras permaneceram por 24 h agitando, para determinar da fração ^{15}N -mineral.

Figura 6 - a) amostras mantidas em capela, para eliminação do NH_4^+ ; b) solução extratora recebendo liga de Devarda; c) detalhe da amostra com o sistema de microdifusão

Depois do período de agitação, os sistemas de microdifusão permaneceram em dessecador para eliminação da umidade residual. Secos, os filtros foram colocados em cápsulas de estanho, pesados e levados para determinação de abundância de ^{15}N retido em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL, Sercon Inc., Crewe, GBR). Depois de realizado a quantificação do N-NO_3^- e do método laboratorial da microdifusão para determinações de abundância de $\text{N-}^{15}\text{NO}_3^-$, foram realizados cálculos para estimar a taxa de NB, através da equação descrita por Barraclough et al. (1985).

6.2.6 Produtividade de cana-de-açúcar e reposta à fertilização nitrogenada

Nas áreas cultivadas com cana-de-açúcar foi avaliada a produtividade da cultura, colhendo-se, para tanto, as linhas centrais das parcelas sem despalha a fogo. A massa fresca da parte aérea da cultura foi mensurada por meio de célula de carga, obtendo-se assim a produtividade de colmos - TCH (toneladas de colmo por hectares; Mg ha^{-1}) e valor do Pol (teor de sacarose aparente; kg hg^{-1}). Com base no produto entre o TCH e o Pol da cana-de-açúcar, determinou-se a produtividade de açúcar – TPH (toneladas de açúcar por hectare; Mg ha^{-1}).

Para avaliar o índice de resposta à adubação nitrogenada em cada uma das áreas cultivadas com cana-de-açúcar, foi calculada a resposta à fertilização nitrogenada na produtividade de colmos (RFNPC) e açúcar (RFNPA), com base em Khan et al. (2001). A equação para cálculo da RFNPC é descrita a seguir:

$$\text{RFNPC (\%)} = \frac{(\text{TCH máxima} - \text{TCH controle})}{\text{TCH controle}} \times 100$$

onde *TCH máxima* representa a produtividade de colmos (Mg ha^{-1}) na dose de N que promoveu maior eficiência fisiológica e *TCH controle* indica a produtividade de colmos no tratamento controle (Mg ha^{-1}).

A resposta à fertilização nitrogenada na produtividade de açúcar (RFNPA) foi obtida por meio da seguinte equação:

$$\text{RFNPA (\%)} = \frac{(\text{TPH máxima} - \text{TPH controle})}{\text{TPH controle}} \times 100$$

onde *TPH máxima* representa a produtividade de açúcar (Mg ha^{-1}) na dose de N que promoveu maior eficiência fisiológica e *TPH controle* indica a produtividade de açúcar no tratamento controle (Mg ha^{-1}).

6.2.7 Análise dos resultados

Os resultados provenientes das áreas experimentais cultivadas com cana-de-açúcar, como o TCH e TPH foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e análise de regressão polinomial. Apenas quando o teste F foi significativo ($P \leq 0,10$), a RFNPC e RFNPA foram calculadas. Quando o teste F não foi significativo ($P > 0,10$), considerou-se o índice em questão com valor igual a zero. Os modelos de regressão polinomial utilizados foram o linear e quadrático. O modelo foi selecionado de acordo com a significância ($P \leq 0,10$) e análise do coeficiente de determinação (R^2) obtido.

A partir da obtenção dos índices RFNPC e RFNPA, foi possível verificar a existência ou não do nível crítico de N no solo, com base nos parâmetros TAB, TNB e TAB/TNB. Para tanto, foram elaborados gráficos correlacionando-se os valores de RFNPC e RFNPA com os de TAB, TNB e TAB/TNB. A identificação do nível crítico de N é obtida graficamente (Khan et al., 2001), a partir da separação entre locais responsivos e não responsivos ao N aplicado. Caso a separação entre as classes de resposta é obtida com sucesso, o nível crítico representa o conteúdo de N no solo acima do qual pequeno ou nenhum aumento de produtividade é esperado. Assim, é de se esperar que solos não responsivos ao N apresentem concentrações do nutriente no solo (obtidas pelos métodos TAB, TNB ou TAB/TNB) igual ou acima do nível crítico estabelecido.

Os valores de N-NH_4^+ , N-NO_3^- , TAB e TNB dos solos cultivados com pastagem e o solo amostrado de um fragmento de floresta estacional semidescídua foram comparados entre si por meio do erro padrão da média, uma medida de dispersão. O erro padrão da média foi calculado dividindo-se o desvio padrão da amostra pela raiz quadrada do número de observações da amostra.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 TAB e TNB em solos cultivados com cana-de-açúcar

Os resultados obtidos de TAB neste estudo foram menores que $4,86 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 9). Outros trabalhos apresentaram valores de até $6,50 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (PILBEAM; WARREN, 1995; CHRISTENSON et al., 2009; CHENG et al., 2011), confirmando a observação feita por Videla (2004), de que a TAB geralmente não apresentam valores maiores que $10 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

Em relação às áreas experimentais 1 e 3, ambas foram receberem aplicação de vinhaça por pelo menos dois anos antes do início dos experimentos realizados nesses locais. Como a vinhaça apresenta alta quantidade de C orgânico solúvel, a mesma se torna grande fonte de C lábil para os microrganismos do solo (MINHOTI; CERRI, 1987; PRATA et al., 2001). Os altos valores de TAB verificados em ambos os locais, acima da média dos demais solos, pode ser reflexo da aplicação deste resíduo da indústria sucroenergética.

Os locais 5 e 15, são solos referentes à mesma área experimental, porém amostrados em anos distintos (2011 e 2012, respectivamente). Antes da operação de replantio da cana-de-açúcar nesse local (reforma do canavial), foi realizada a semeadura de crotalária (*Crotalaria juncea*). Essa leguminosa, fixadora de N_2 atmosférico, é amplamente utilizada como adubo verde em canaviais do estado de São Paulo, e é caracterizada pela capacidade de fornecer ao solo grande quantidade de N mineral durante a mineralização de seus resíduos vegetais (AMBROSANO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005). Desse modo, a prática da adubação verde pode estar relacionada com os elevados valores de TAB obtidos nesses solos.

Entre os locais 8 e 17, solos também provenientes da mesma área de cultivo mas coletados em épocas diferentes (2011 e 2012), constatou-se valores de TAB

bastante diversificados, de 1,23 e 4,86 mg N kg⁻¹ dia⁻¹ respectivamente. Na amostragem realizada em 2011, foi realizada a operação de cultivo mecânico na entrelinha do canavial. Essa prática agrícola pode ter influenciado negativamente a microbiota do solo, pela exposição do solo amostrado à radiação solar (e consequente alta temperatura), reduzindo, assim, a atividade microbiológica.

Tabela 9 - Taxas de amonificação e nitrificação brutas e resposta à fertilização nitrogenada de solos cultivados com cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil

Local	TAB ¹	TNB ²	TAB/TNB	RFNPC ³	RFNPA ⁴
	mg N kg ⁻¹ dia ⁻¹			%	
1	1,78 ± 0,66	1,33 ± 0,57	1,34 ± 0,66	0	0
2	1,78 ± 0,39	1,08 ± 0,37	1,65 ± 0,71	0	0
3	3,06 ± 0,70	- ⁵	-	0	0
4	1,84 ± 0,15	-	-	30	33
5	2,05 ± 0,08	0,63 ± 0,16	3,25 ± 2,11	0	0
6	1,15 ± 0,34	0,70 ± 0,11	1,64 ± 0,49	44	0
7	1,01 ± 0,15	2,75 ± 0,78	0,37 ± 0,26	27	11
8	1,23 ± 0,26	0,87 ± 0,10	1,41 ± 0,22	0	0
9	0,66 ± 0,14	0,24 ± 0,04	2,75 ± 0,96	0	0
10	2,07 ± 0,59	0,59 ± 0,11	3,51 ± 1,75	42	30
11	0,51 ± 0,06	0,35 ± 0,08	1,46 ± 0,29	0	0
12	0,59 ± 0,06	0,35 ± 0,08	1,69 ± 0,73	0	0
13	0,51 ± 0,10	0,66 ± 0,17	0,77 ± 0,67	12	0
14	0,55 ± 0,10	0,23 ± 0,05	2,39 ± 0,45	0	0
15	1,67 ± 0,42	0,77 ± 0,10	2,17 ± 0,80	23	19
16	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,07	-	0	0
17	4,86 ± 0,95	0,00 ± 0,00	-	0	0
18	1,34 ± 0,37	0,64 ± 0,26	2,09 ± 0,70	0	0

¹: Taxa de amonificação bruta; ²: Taxa de nitrificação bruta; ³: Resposta a fertilização nitrogenada para produtividade de colmos; ⁴: Resposta a fertilização nitrogenada para produtividade de açúcar; ⁵: não determinado

Recous et al. (1999) avaliando a mineralização do N em solos com a ausência e presença de resíduos vegetais de trigo, observaram que a TAB aumenta em função da adição da palhada sobre o solo, com valores de TAB de 0,42 e 0,99 mg N kg⁻¹ dia⁻¹ respectivamente. Outra questão analisada foi que os resultados obtidos foram influenciados pela sazonalidade, com maiores valores de TAB no verão em relação ao inverno. Esses comportamentos também foram relatados por Garnier et al. (2003), que também avaliaram a TAB em solos com e sem resíduos de trigo em diferentes épocas do ano. Com adição de palhada de trigo fresca ao solo, Geisseler et al. (2009) verificaram valores de TAB um pouco acima da média dos demais autores, de até 8,4 mg N kg⁻¹ dia⁻¹.

Avaliando os resultados obtidos neste estudo e de outros trabalhos presentes na literatura, é possível afirmar que há muita dificuldade na comparação de resultados de TAB e TNB, pois estes parâmetros são fortemente influenciados por fatores abióticos (temperatura, umidade e aplicação de resíduos vegetais sobre o solo), bióticos (tamanho e distinção da comunidade microbiana do solo) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Videla (2004) ainda afirma esta dificuldade em confrontar resultados brutos de N devidas diferenças entre os tipos de solo e sistemas de manejo.

As TNB apresentaram valores entre 0,15 e 2,75 mg N kg⁻¹ dia⁻¹, assumindo em média resultados menores que as TAB. Valores da mesma magnitude foram verificados em outros estudos (ZAMAN et al., 1999; BENGTTSSON et al, 2003). Zaman et al. (1999) observaram aumento na TNB apenas em solos tratados com cloreto de amônio. Neste trabalho, a maioria dos solos apresentou menor valor de TNB em comparação com a TAB (relação TAB/TNB > 1), com exceção aos solos 7 e 13 (Tabela 9). Os baixos valores de TNB podem ser explicados por fatores como: (i) o processo de nitrificação ser dependente da disponibilidade de NH₄⁺ no solo, portanto, dependente de um substrato limitante quando comparado com o conteúdo de N orgânico (substrato para amonificação); (ii) ser controlado pela presença/ausência de oxigênio, portanto, quando um solo encontra-se compactado, menor será sua aeração, afetando negativamente este processo; (iii) ser afetado pela acidez do solo, pois os microrganismos atuantes na nitrificação requerem solos neutros (valores de pH entre 7,0 e 7,6), sendo baixa a atividade em solos ácidos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Como pode ser observado na Tabela 7, todos os solos do presente estudo apresentaram valores de pH (em CaCl₂) abaixo de 6,0.

Figura 7 – a) relação entre a resposta à fertilização nitrogenada para produtividade de colmos (RFNPC) e a taxa de amonificação bruta de N (TAB); b) relação entre a RFNPC e a taxa de nitrificação bruta de N (TNB); c) relação entre a resposta a fertilização nitrogenada para produtividade de açúcar (RFNPA) e a TAB; d) relação entre a RFNPA e a TNB; e) relação entre a RFNPC e TAB/TNB; f) relação entre a RFNPA e TAB/TNB.

Os resultados da Tabela 9 demonstram que apenas 33,3 % das áreas estudadas (locais 4, 6, 7, 10, 13 e 14) foram responsivos à fertilização nitrogenada na produtividade de colmos. Com base no critério criado por Otto et al. (2013), os solos dos locais 4, 6, 7 e 10 podem ser classificados como altamente responsivos (RFNPC > 25 %), enquanto que os solos dos locais 13 e 14 representam áreas moderadamente responsivas à fertilização nitrogenada (RFNPC ≤ 25 %). Os demais locais não apresentaram resposta à fertilização de N (RFNPC = 0). Para produtividade de açúcar (RFNPA), apenas 22,2 % das áreas (solos 4, 7, 10 e 15) apresentaram resposta à adubação com N.

Com base na Figura 7 (a, b, c, d, e, f), não foi possível definir o nível crítico de N no solo com base nos parâmetros TAB, TNB e TAB/TNB e os índices RFNPC e RFNPA. Uma possível explicação se deve à elevada ocorrência de sítios experimentais não responsivos ao N aplicado, o que comprometeu sobremaneira a calibração dos índices microbiológicos. Em estudo realizado por Khan et al. (2001), desenvolvido em solos cultivados com milho, os autores verificaram identificaram o nível crítico de N no solo obtido por meio do teste conhecido como ISNT (*Illinois Soil Nitrogen Test*). A alta ocorrência de locais responsivos ao N foi de suma importância para o resultado encontrado pelos autores supracitados.

6.3.2 TAB e TNB em solos de pastagens e floresta estacional semidescídua

Em solos de pastagens cultivados com espécies de *Brachiaria*, principalmente com *B. humidicola*, é natural a supressão da nitrificação devido ao composto exsudado por essa vegetação (SUBBARAO et al., 2003; SUBBARAO et al., 2009). Por isso, além dos valores de TAB e TNB, são apresentados os conteúdos de N-NH₄⁺ após 24 e 96 h da aplicação do (¹⁵NH₄)₂SO₄, assim como o de N-NO₃⁻ pela adição do K¹⁵NO₃ ao solo (Tabela 10).

As TAB médias mensuradas nos solos de pastagens variaram de 0,43 a 3,25 mg N kg⁻¹ dia⁻¹, enquanto que os valores de TNB foram extremamente baixos e até nulos, com exceção ao local 21. Como esperado, os solos de pastagens cultivados com *B. humidicola*, representados pelos solos 19, 23 e 24, apresentaram valores de TNB extremamente baixos. A interferência desta espécie sobre a nitrificação é ainda mais nítida quando analisados os valores de N-NH₄⁺ e de N-NO₃⁻ em comparação aos resultados dos demais solos que não estavam sob cultivo de *B. humidicola*.

(locais 20, 21 e 22). Portanto, foi pertinente a resposta obtida pelo solo 21, o qual apresentou alta TNB, além dos altos valores de N-NO_3^- como nos solos 20 e 22.

Outro fator que expõe a influência causada pela *B. humidicola* na nitrificação é o aumento das quantidades de N-NH_4^+ na extração realizada no tempo de 96 h em comparação à extração efetuada 24 h após a marcação com $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Isso indica que o N-NH_4^+ não foi consumido pelos caminhos o qual está sujeito a sofrer (imobilização e nitrificação). Nos demais locais (20, 21 e 22) houve decréscimo no conteúdo de N-NH_4^+ no intervalo entre as extrações, o que pode ser explicado pelo consumo N-NH_4^+ pelos processos de nitrificação e/ou imobilização. Videla (2004) e Moraes (2012) também observaram o efeito de queda nos valores N-NH_4^+ no intervalo entre as extrações com KCl. Avaliando os resultados, é confirmada a hipótese deste trabalho apenas quando nos referimos a locais sob pastagens cultivados por longo período com *B. humidicola*. Outras espécies de *Brachiaria* não interferiram negativamente no processo de nitrificação, como pode ser observado pelo conteúdo elevado de N-NO_3^- no solo.

Tabela 10 – Conteúdo de N-mineral obtido por extração com KCl após 24 e 96 h da aplicação de ^{15}N e taxas brutas de amonificação e nitrificação de solos sob pastagem e floresta estacional semidescídua

Local	N-NH ₄ ⁺		N-NO ₃ ⁻		TAB ¹	TNB ²
	24 h	96 h	24 h	96 h		
	mg kg ⁻¹				mg N kg ⁻¹ dia ⁻¹	
Pastagem						
19	32,4 ± 0,6	38,0 ± 0,6	3,7 ± 0,1	4,1 ± 0,2	3.25 ± 0.21	0.05 ± 0.02
20	1,8 ± 0,0	0,3 ± 0,0	29,3 ± 1,3	29,9 ± 1,5	0.98 ± 0.01	- ³
21	1,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	39,8 ± 1,0	43,2 ± 0,8	0.43 ± 0.05	1.77 ± 0.52
22	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	27,4 ± 1,3	26,2 ± 1,2	1.07 ± 0.04	-
23	22,3 ± 0,4	26,0 ± 0,2	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	1.30 ± 0.15	0.11 ± 0.02
24	40,8 ± 1,4	46,5 ± 1,6	3,5 ± 0,0	3,3 ± 0,1	2.19 ± 0.46	0.29 ± 0.21
Floresta estacional semidescída						
25	73,7 ± 0,8	70,3 ± 1,1	35,5 ± 1,0	38,7 ± 1,1	0,00 ± 0,00	1.59 ± 1.34

¹: Taxa de amonificação bruta; ²: Taxa de nitrificação bruta; ³: não determinado.

A TAB do solo proveniente do fragmento de floresta estacional semidescídua (solo 25) foi nula (Tabela 10). Valores de TAB de solos florestais em regiões tropicais são dificilmente encontrados na literatura para comparações. Entretanto, Parker e Schimel (2010) explicaram que a ciclagem do N pode ser afetada pelas diferentes espécies de plantas sobre o solo, além da estrutura química, fisiológica e da interação com os microrganismos que estas espécies podem apresentar. Outra provável explicação é de que a metodologia não foi adequada ao solo de floresta, onde a dinâmica da MOS é complexa. Os valores de N-NH_4^+ obtidos neste solo foram extremamente altos, da ordem de 70 mg kg^{-1} , o que pode ser proveniente tanto da intensa amonificação da MOS quanto da morte de microrganismos durante o processo de secagem das amostras de solo.

Embora o valor médio de TNB do fragmento de floresta foi de $1,59 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, este tratamento apresentou alta variabilidade entre as amostras de solo, com valores de TNB variando de 0,03 a $7,29 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Kiese et al. (2008) avaliaram a TNB em florestas tropicais da Austrália e apresentaram resultados sazonais de acordo com a precipitação anual, sendo verificados maiores valores no período chuvoso (em torno de $9 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) em relação ao período da seca ($4,61 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

6.4 Conclusão

A TAB de solos cultivados com cana-de-açúcar apresentou valores superiores à TNB, possivelmente explicado pela maior gama de microrganismos atuantes no processo de amonificação em relação à nitrificação. Todavia, não foi possível identificar o nível crítico de N para os parâmetros TAB, TNB e TAB/TNB. A ocorrência de diversas áreas com ausência de resposta ao N aplicado contribui sobremaneira para a obtenção desse resultado.

Os solos de pastagem cultivados com a espécie *B. humidicola* apresentaram valores extremamente baixos de TNB, confirmando a hipótese levantada neste estudo. Por outro lado, outras espécies de gramíneas, inclusive do gênero *Brachiaria*, não suprimiram com intensidade o processo de nitrificação. O plantio de cana-de-açúcar em solos com histórico de cultivo de *B. humidicola* pode ser uma estratégia interessante visando à inibição da nitrificação e consequente permanência do N mineral na forma amoniacal.

Referências

- AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; MURAOKA, T. Nitrogen mineralisation in soils amended with sunnhemp, velvet bean and common bean residues. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 133-137, 2003.
- ARAÚJO, A.S.F.; TEIXEIRA, G.M.; CAMPOS, A.X.; SILVA, F.C.; AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O. Utilização de nitrogênio pelo trigo cultivado em solo fertilizado com adubo verde (*Crotalaria juncea*) e/ou uréia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 284-289, 2005.
- BARRACLOUGH, D.; GEENS, E.L.; DAVIES, G.P.; MAGGS, J.M. The use of single and double labelled ¹⁵N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 593–603, 1985.
- BENGTSSON, G.; BENGTSON, P.; MANSSON, K.F. Gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 143–154, 2003.
- BOECKXA, P.; ACCOEA, F.; BUSSCHAERTA, J.; HOFMANB, G.; VAN CLEEMPUTA, O. Gross N transformation rates and net N mineralization rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grassland soils of different age. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 2075–2087, 2004.
- BOOTH, M.S.; STARK, J.M.; RASTETTER, E. Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: a synthetic analysis of literature data. **Ecological Monographs**, Lawrence, v. 75, p. 139–157, 2005.
- BREMNER, J.M. Nitrogen-total. In: SPARKS, D.L. **Methods of soil analysis: chemical methods**. Madison: SSSA, 1996. p. 1085-1121.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O. Determinação de nitrogênio inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor. In: RAIJ, B.V.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. (Ed.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2001.p. 270-276.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: IPNI, 2007. p. 355-392.
- CHENG, Y.; CAI, Z.; ZHANG, J.; CHANG, S.X. Gross N transformations were little affected by 4 years of simulated N and S depositions in an aspen-white spruce dominated boreal forest in Alberta, Canada. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 262, p. 571–578, 2011

CHRISTENSON, L.M.; LOVETT, G.M.; WEATHERS, K.C. The influence of tree species, nitrogen fertilization, and soil C to N ratio on gross soil nitrogen transformations. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 638-646, 2009.

DE ARMAS, R.; VALADIER, M.H.; CHAMPIGNY, M.L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 531-535, 1992.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, p. 29-41, 2011.

GARNIER, P.; NÉEL, C.; AITA, C.; RECOUS, S.; LAFOLIE, F.; MARY B. Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 555–568, 2003.

GEE, G.W.; BAUDER, J.W. Particle-size analysis. In: KLUTE, A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Physical and mineralogical methods. Madison: ASA; SSSA, 1986. p.383-411.

GEISSELER, D.; HORWATH, W.R.; DOANE, T.A. Significance of organic nitrogen uptake from plant residues by soil microorganisms as affected by carbon and nitrogen availability. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1281–1288, 2009.

GINÉ, M.F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flows injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 191-197, 1980.

GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p.1385-1388, 2007.

GOPALAKRISHNAN, S.; WATANABE, T.; PEARSE, S.J.; ITO, O.; HOSSAIN, Z.A.K.M.; SUBBARAO, G.V. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria humidicola* roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 55, p. 725-733, 2009.

HERRMANN, A.M.; WITTER, E. Predictors of gross N mineralization and immobilization during decomposition of stabilized organic matter in agricultural soil. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 59, p. 653–664, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction and survival. Genebra, 2003.

KHAN, S.A.; MULVANEY, R.L.; HOEFT, A.G. A simple soil test for detecting sites that are nonresponsive to nitrogen fertilization. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 1751–1760, 2001.

KIESE, R.; HEWETT, B.; BUTTERBACH-BAHL, K. Seasonal dynamic of gross nitrification and N₂O emission at two tropical rainforest sites in Queensland, Australia. **Plant and Soil**, The Hague, v. 309, p. 105–117, 2008.

MARTHA JÚNIOR, G.B.; VILELA, L.; BARCELLOS, A.O.; SOUZA, D.M.G.; BARIONI, L.G. Pecuária de corte no Cerrado: aspectos históricos e conjunturais. In: MARTHA JÚNIOR, G.B.; VILELA, L.; SOUZA, D.M.G. (Ed.). **Cerrado: uso eficiente de corretivos e fertilizantes em pastagens**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. p. 17-42.

MINHOTI, M.T.A.; CERRI, C.C. Decomposição de vinhaça em solo sob diferentes níveis de umidade: liberação de CO₂, formação de biomassa microbiana e imobilização de nitrogênio adicionado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 11, p. 25-30, 1987.

MORAES, M.I.M. **Mineralização bruta (amonificação) de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: _____. (Ed.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 285-359.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: SPARKS, D.L. **Methods of soil analysis: chemical methods**. Madison: SSSA, 1996. p. 961-1010.

OTTO, R.; MULVANEY, R.L.; KHAN, S.A.; TRIVELIN, P.C.O. Quantifying soil mineralization to improve fertilizer nitrogen management of sugarcane. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 893-904, 2013.

PARKER, S.S.; SCHIMEL, J.P. Invasive grasses increase nitrogen availability in California grassland soils. **Invasive Plant Science and Management**, Lawrence, v. 3, p. 40-47, 2010.

PILBEAM, C.J.; WARREN, G.P. Use of ¹⁵N fertilizer N recovery and N mineralization studies in semi-arid Kenya. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 123-128, 1995.

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

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

RECOUS, S.; AITA, C.; MARY, B. In situ changes in gross N transformations in bare soil after addition of straw. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.31, p. 119-133, 1999.

REIS, B.F.; KRUG, F.J.; VIEIRA, J.A.; GINÉ, M.F. Development of a flow injection system with two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, p.523-528, 1997.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFLOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, p. e19045, 2011.

SØRENSEN, P.; JENSEN, E.S. Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to a polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 5, p. 201–203, 1991.

SPIRONELO, A.; RAIJ, B. van; PENATTI, C.P.; CANTARELLA, H.; MORELLI, J.L.; ORLANDO FILHO, J.; LANDELL, M.G.A.; ROSSETTO, R. Cana-de-açúcar. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Fundação IAC, 1997. p. 237-239. (IAC. Boletim Técnico, 100).

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; OKADA, K. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p.413–419, 2003.

SUBBARAO, G.V.; WANG, H. Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W.L. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 290, p. 245–257, 2007b.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; WANG, H. Y.; BERRY, W. L. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 288, p. 101–112, 2006a.

SUBBARAO, G.V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W.L. Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil**, The Hague, v. 294, p. 5-18, 2007a.

SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; SAHRAWAT, K.L.; BERRY, W.L.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; WATANABE, T.; SUENAGA, K.; RONDON, M.; RAO, I. M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-Challenges and opportunities. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 25, p. 303–335. 2006b.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; BERRY, W.L. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. **Plant and Soil**, The Hague, v. 313, p. 89–99, 2008.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADOB, M. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIHASHI, A. T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C. E.; BERRY, W. L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, p. 17302-17307, 2009.

VIEIRA, M.X. **Eficiência agrônômica da adubação de soqueira de cana-de-açúcar com cloreto de amônio**. 2009. 134 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p. 287-293, 2011.

ZAMAN, H.J.D.; CAMERON, K.C.; FRAMPTON, C.M. Gross nitrogen mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and the soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer at different water potentials. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, p. 178-186, 1999.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As taxas de amonificação (TAB) e nitrificação brutas (TNB) refletem o potencial do solo em disponibilizar as formas de N-mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) passíveis de absorção pelas plantas. Para mensurar tais taxas, faz-se necessário o uso da técnica da diluição do isótopo, onde o reservatório de interesse (N-NH_4^+ ou N-NO_3^-) é enriquecido com ^{15}N . Contudo, a grande maioria dos estudos envolvendo essa técnica foi desenvolvida em solos de clima temperado, com características físico-químicas distintas de solos oriundos de regiões tropicais. Assim, a adequação de protocolos para mensuração da TAB e TNB para solos tropicais é de grande importância. Após a definição da metodologia a ser usada, a quantificação da TAB e TNB em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária pôde ser quantificada.

A técnica da microdifusão, utilizada para concentração do N-mineral presente em extrato de KCl sofreu adaptações em relação ao método originalmente proposto por Sørensen e Jensen (1991). Foi verificada a necessidade de redução no tempo de agitação, de 72 para 24 h, para manutenção do valor de abundância de ^{15}N originalmente presente em ambas as frações de N-mineral. Essa modificação na metodologia representou ganhos em operacionalidade no procedimento laboratorial.

Para quantificação da TNB, é preciso obter os valores de abundância de ^{15}N no reservatório NO_3^- . Para tanto, é necessário garantir a não influência do reservatório NH_4^+ na análise isotópica do ^{15}N . As duas técnicas avaliadas no estudo mostraram-se eficientes. Contudo, a metodologia de eliminação prévia N-NH_4^+ é recomendada por apresentar-se menos laboriosa em relação à metodologia que envolve a diluição isotópica.

A maioria dos trabalhos existentes na literatura que visam à predição das taxas brutas de N utiliza alto enriquecimento de ^{15}N nos compostos marcados. Tais estudos foram desenvolvidos com solos temperados, que apresentam elevados valores de TAB e TNB. Assim, foi constatado que para solos tropicais (agricultáveis e cultivados com cana-de-açúcar, no caso) não há necessidade de alta marcação com ^{15}N nos compostos, mesmo com aplicação de doses baixas de N ($3 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo, por exemplo).

Feitas as avaliações e adaptações pertinentes nas metodologias empregadas para quantificar as transformações brutas de N, pôde-se mensurar a TAB e a TNB em solos tropicais cultivados com cana-de-açúcar e pastagem. O estudo apontou

menores valores de TNB em relação à TAB, tanto para os solos sob cultivo de cana-de-açúcar quanto para pastagem, provavelmente em decorrência da menor atividade dos microrganismos responsáveis pela nitrificação quando comparado aos da amonificação.

A TAB para os solos cultivados com cana-de-açúcar variou de 0,00 a 4,86 mg N kg⁻¹ dia⁻¹ e a TNB, de 0,15 a 2,75 mg N kg⁻¹ dia⁻¹. Apesar da dificuldade de comparar resultados dos índices microbiológicos, decorrente das diferenças de fatores bióticos e abióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; VIDELA, 2004), foi possível determinar que as taxas brutas sofrem influência das práticas agrícolas adotadas, como cultivo mecânico e adubação verde. A falha na calibração dos índices TAB, TNB e TAB/TNB é devida à alta ocorrência de áreas não responsivas ao N. Desse modo, é importante investigar a causa do número elevado de locais onde não há incremento de produtividade de colmos e açúcar pelo N aplicado.

Os valores de TNB e dos conteúdos de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ em solos cultivados com *Brachiaria humidicola* permitem concluir que há supressão da nitrificação causada pelo composto exsudado por esta espécie, confirmando estudos realizados por pesquisadores (SUBBARAO et al., 2003, 2006a, 2006b, 2007, 2008, 2009; GOPALAKRISHNAN et al., 2007, 2009). Dessa forma, solos cultivados com *B. humidicola* são potencialmente interessantes para implantação de cana-de-açúcar, com base no estudo de Robinson et al. (2011), que relata a preferência da cultura por NH₄⁺ à NO₃⁻.

Referências

GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p.1385-1388, 2007.

GOPALAKRISHNAN, S.; WATANABE, T.; PEARSE, S.J.; ITO, O.; HOSSAIN, Z.A.K.M.; SUBBARAO, G.V. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria humidicola* roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 55, p. 725-733, 2009.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: _____. (Ed.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 285-359.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, p. e19045, 2011.

SØRENSEN, P.; JENSEN, E.S. Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to a polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 5, p. 201–203, 1991.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; OKADA, K. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p.413–419, 2003.

SUBBARAO, G.V.; WANG, H. Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W.L. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 290, p. 245–257, 2007.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; WANG, H. Y.; BERRY, W. L. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 288, p. 101–112, 2006a.

SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; SAHRAWAT, K.L.; BERRY, W.L.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; WATANABE, T.; SUENAGA, K.; RONDON, M.; RAO, I. M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-Challenges and opportunities. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 25, p. 303–335. 2006b.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; BERRY, W.L. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. **Plant and Soil**, The Hague, v. 313, p. 89–99, 2008.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADOB, M. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIHASHI, A. T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C. E.; BERRY, W. L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, p. 17302-17307, 2009.

VIDELA, C.D.C. **Mineralização bruta do nitrogênio em um Molisol do sudeste da Província de Buenos Aires (Argentina)**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.