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

Predição da necessidade de fertilizante nitrogenado pela cana-de-açúcar e reações do nitrogênio orgânico e mineral dissolvidos em palha e solo de canaviais

Eduardo Mariano

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

**Piracicaba
2015**

Eduardo Mariano
Engenheiro Agrônomo

Predição da necessidade de fertilizante nitrogenado pela cana-de-açúcar e reações do nitrogênio orgânico e mineral dissolvidos em palha e solo de canaviais

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Mariano, Eduardo

Predição da necessidade de fertilizante nitrogenado pela cana-de-açúcar e reações do nitrogênio orgânico e mineral dissolvidos em palha e solo de canaviais / Eduardo Mariano. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

146 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Saccharum* spp. 2. Nitrogênio mineralizável 3. Fornecimento de N pelo solo
4. Nitrogênio orgânico dissolvido 5. Imobilização microbiana I. Título

CDD 633.61
M333p

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

À minha mãe, Ivete, pelo amor incondicional, coragem e conselhos preciosos; ao meu pai, Valentim (in memoriam), pelos ensinamentos e exemplos de perseverança demonstrados.

DEDICO

Ao meu amado irmão, Leandro, pela pureza de seus gestos, que sempre me enchem de amor e paz.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo C. O. Trivelin, pela amizade, ensinamentos e disponibilidade nesses quase seis anos de sua orientação. Sou eternamente grato pela oportunidade a mim concedida.

Ao Prof. Dr. Davey L. Jones e Prof. Dr. Paul W. Hill, ambos da Bangor University, pelo privilégio da orientação, amizade e ensinamentos adquiridos. Muito aprendi dividindo a bancada do laboratório com vocês.

Aos membros examinadores das bancas de qualificação e doutoramento, pelos questionamentos, críticas e valiosas sugestões efetuadas.

A Carolina Z. Caon, pelo companheirismo, paciência, incentivo e auxílio irrestrito nas determinações laboratoriais.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelo ensino e infraestrutura de excelência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas - ESALQ/USP, pela oportunidade novamente concedida, agora neste doutoramento.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em especial ao Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE), pelo suporte técnico e laboratorial.

A Bangor University, em especial à Escola de Meio-ambiente, Recursos Naturais e Geografia (SENRGY), pela excepcional infraestrutura disponibilizada.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 2011/07955-0), bolsa BEPE (Processo nº 2013/3866-1), além do auxílio à pesquisa (BIOEN/FAPESP) concedido ao Prof. Trivelin (Processo nº 2011/14372-1), sem o qual este estudo não poderia ser realizado em plenitude.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos entre março a setembro de 2011.

Ao Prof. Dr. Rafael Otto, pela amizade, humildade e auxílio na idealização e condução do projeto de pesquisa do qual derivou este doutoramento.

Ao Dr. Heitor Cantarella, pela cessão de uso das áreas experimentais localizadas em Jaú, Piracicaba e Santa Maria da Serra, integrantes do projeto BIOEN-FAPESP Processo nº 2008/56147-1. Ao Dr. André C. Vitti, pela cessão de uso de área experimental localizada em Piracicaba. Ao Zaqueu F. Montezano, Vitor P. Vargas e Helio A. W. Joris, pelo fornecimento de informações dos experimentos citados acima.

Ao Prof. Dr. Fernando D. Andreote e ao Thiago Gumiere, pelas valiosas sugestões na análise dos dados da composição da comunidade microbiana (PLFA).

Aos colegas de Pós-Graduação: Beatriz N. Boschiero, Danilo A. Ferreira, Evandro L. Schoninger, Hugo A. G. Villalba, João J. M. Milagres, José M. Leite, Lucas P. Miachon, Maria S. C. D. Kühl, Michele X. V. Megda, Murilo I. M. de Moraes, Oriel T. Kölln e Paulo R. C. Lazzarini, pelos momentos de descontração, colaboração e amizade compartilhados.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP que conheci durante o período de 2009 a 2014.

Aos estagiários: Daniel do Amaral, João L. S. Bigatão, Ricardo L. Cezário Gonçalves e Saulo A. Q. de Castro pela colaboração. Em especial a Jussara F. Pereira e ao Luiz H. Massuchetto, pelo auxílio irrestrito nas determinações laboratoriais.

A toda equipe do LIE pelo excelente ambiente de trabalho e laços de amizade construídos. Em especial ao Hugo Henrique Batagello, pela amizade de longa data e disponibilidade integral nas viagens de campo. Meus sinceros agradecimentos.

Aos demais pós-graduandos e estagiários do LIE, pelo ótimo convívio e momentos de descontração compartilhados.

Ao Daniel Bini, Dener M. S. Oliveira, Jamil M. Pereira, Paulo R. L. Alves e Renato Lima, pela grande amizade construída durante minha estadia em Piracicaba.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

MUITO OBRIGADO!

“TEM SEMPRE PRESENTE QUE A PELE SE ENRUGA, QUE O CABELO SE TORNA BRANCO, QUE OS DIAS SE CONVERTEM EM ANOS, MAS O MAIS IMPORTANTE NÃO MUDA: TUA FORÇA INTERIOR”

MADRE TERESA DE CALCUTÁ (1910-1997)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
Referências	20
2 TESTES DE SOLO PARA PREDIÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR	25
Resumo	25
Abstract	25
2.1 Introdução	26
2.2 Material e Métodos	33
2.2.1 Áreas experimentais e amostragem de solo	33
2.2.2 Caracterização físico-química do solo	36
2.2.3 Métodos químicos e biológico para a predição do N mineralizável do solo ...	39
2.2.4 Métodos microbiológicos para predição do N mineralizável do solo	41
2.2.5 Mineralização bruta como índice para predição do N mineralizável do solo ..	42
2.2.6 Extração de N e parâmetros de produtividade da cultura	44
2.2.7 Análises estatísticas	45
2.3.1 Calibração dos métodos químicos e biológico	46
2.3.2 Calibração dos métodos microbiológicos e isotópico	62
2.4 Conclusões	75
Referências	75
3 REAÇÕES DO NITROGÊNIO ORGÂNICO E MINERAL DISSOLVIDOS EM SOLO E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR RELACIONADAS AO CICLO DO CARBONO E NITROGÊNIO	89
Resumo	89
Abstract	89
3.1 Introdução	90
3.2 Material e Métodos	94
3.2.1 Áreas experimentais	94

3.2.2 Amostragem de palha e solo	96
3.2.3. Extratos de palha e solo obtidos com H ₂ O e K ₂ SO ₄	97
3.2.4 Caracterização da palha e do solo	98
3.2.5 Estrutura da comunidade microbiana	100
3.2.6 Reações de ¹⁴ C-compostos do NOD relacionadas ao ciclo do C	101
3.2.7 Mineralização de ¹⁴ C-glicose associada ou não a N mineral exógeno	105
3.2.8 Análises estatísticas	106
3.3 Resultados e Discussão	107
3.3.1 Química dos extratos de H ₂ O e K ₂ SO ₄	107
3.3.2 Estrutura da comunidade microbiana	111
3.3.3 Mineralização e sorção dos compostos do NOD	114
3.3.4 Impacto da fertilização nitrogenada na mineralização da ¹⁴ C-glicose.....	124
3.4 Conclusões	134
Referências	134
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
Referências	145

RESUMO

Predição da necessidade de fertilizante nitrogenado pela cana-de-açúcar e reações do nitrogênio orgânico e mineral dissolvidos em palha e solo de canaviais

A recomendação de doses de nitrogênio (N) para a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com base em testes de solo é essencial para o aumento da sustentabilidade desse agroecossistema. Além disso, pouco se conhece sobre as reações do N orgânico dissolvido (NOD) na zona de transição palha-solo nos canaviais. A influência das formas minerais de N (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) na mineralização de carbono (C) nessa região transitória também é desconhecida. Desse modo, os objetivos do estudo foram: i) correlacionar diversos métodos para a predição do N mineralizável do solo com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N; ii) quantificar os processos de mineralização de C e sorção de compostos do NOD aplicados em palha e solo (ambos amostrados na zona de transição); e iii) determinar a mineralização C e o conteúdo de N mineral em palha e solo de cana-de-açúcar (provenientes da zona de transição) pela adição de ^{14}C -glicose associada ou não à fontes minerais de N. Entre 2006 e 2013 foram instalados 21 experimentos de curva de resposta da cana-de-açúcar ao N no Estado de São Paulo, Brasil, para correlacionar métodos de natureza biológica, química, microbiológica e isotópica (^{15}N), com a produtividade de colmos (PCC) e extração de N (ENC) no tratamento controle, produção relativa da cultura (PRC) e com a dose de N necessária para obtenção de 90% da PRC (DN 90% PRC). As amostragens de solo foram realizadas nas camadas de 0-20 e 20-40 cm. Foram detectadas fracas correlações entre a incubação anaeróbia e a PCC, e o N extraível por KCl a quente por 4 h e o N extraível por tampão fosfato-borato a pH 11,2 com a ENC. Os métodos não se correlacionaram com a PRC e a DN 90% PRC. Nenhum método é recomendado no ajuste de doses de N para aplicação em soqueiras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Para o estudo das reações do NOD e do N mineral, amostras de palha e solo foram coletadas na região de transição entre os dois materiais, em dois sítios experimentais localizados no Estado de São Paulo. A mineralização de C e sorção de mistura de aminoácidos, peptídeos, ureia e proteína (todos marcados em ^{14}C) foi determinada pela aplicação dos compostos em palha e solo. A mineralização de C e conteúdo de N mineral pela adição de ^{14}C -glicose com ou sem as formas de N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) também foi avaliada. Existem diferenças acentuadas entre a palha e solo relacionadas à dinâmica do NOD, perfil da comunidade microbiana e imobilização de N. Em geral, o conteúdo de ^{14}C restante dos compostos do NOD foi maior no solo em relação à palha. Os peptídeos e a ureia apresentaram rápida mineralização de C, enquanto que a sorção da proteína foi maior no solo em comparação com a palha. A associação da ^{14}C -glicose com N-NO_3^- resultou em maior mineralização de ^{14}C na palha de ambos os sítios. Ocorreu intensa imobilização de N-NH_4^+ , sobretudo no resíduo de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; Nitrogênio mineralizável; Fornecimento de N pelo solo; Nitrogênio orgânico dissolvido; Imobilização microbiana

ABSTRACT

Predicting nitrogen fertilizer needs for sugarcane and reactions of dissolved organic and mineral nitrogen in straw and soil from sugarcane fields

Recommendation of nitrogen (N) rates for sugarcane (*Saccharum* spp.) based upon soil testing is essential for increasing the sustainability of this agroecosystem. In addition, little is known about the dynamics of dissolved organic nitrogen (DON) in the straw-soil transition zone in sugarcane fields. The influence of mineral N forms in the carbon (C) mineralization in this transitional region is also unknown. Thus, the objectives of this study were: i) correlate several methods to predict the soil mineralizable N with sugarcane N response parameters; ii) quantifying the C mineralization and sorption processes of DON compounds applied to straw and soil (both sampled in the transition zone); and iii) determine the C mineralization and mineral N content in straw and soil (from the transition zone) by addition of ^{14}C -glucose with or without mineral sources of N. Between 2006 and 2013, 21 sugarcane N response trials were performed in the State of São Paulo, Brazil, to correlate biological, chemical, microbiological and isotopic (^{15}N) methods with stalks yield (SYC) and total N uptake (NUC) in the control treatment, relative stalks yield (RSY) and the N rate required to achieve 90% of the RSY (NR 90% RSY). Soil sampling was performed at 0-20 and 20-40 cm depths. Weak correlations were detected between anaerobic incubation and the SYC, and the hot KCl extractable N and phosphate-borate buffer at pH 11.2 extractable N with NUC. Methods did not correlate with RSY and the NR 90% RSY. No method is recommended for adjusting N fertilizer rates for application on sugarcane ratoons in the state of São Paulo, Brazil. To study the reactions of DON and mineral N, straw and soil samples were collected in the transition region between the two materials, in two experimental sites located in the State of São Paulo. The C mineralization and sorption of ^{14}C -labelled amino acids mix, peptides, urea and protein was performed by addition of the compounds in straw and soil. The C mineralization and mineral N content by the addition of ^{14}C -glucose with or without mineral N forms ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$) was also checked. There are marked differences between straw and soil regarding to the DON dynamics, microbial community profile and N immobilization. In general, the ^{14}C remaining of the applied DON compounds in the soil was higher when compared to the straw. Peptides and urea had a rapid C mineralization, while the protein sorption was higher in the soil than the straw. The use of ^{14}C -glucose with $\text{NO}_3^-\text{-N}$ intensified ^{14}C mineralization in the straw of both sites. There was an intense immobilization of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, mainly in the sugarcane residue.

Keywords: *Saccharum* spp.; Mineralizable Nitrogen; Soil N supply; Dissolved organic nitrogen; Microbial immobilization

LISTA DE SIGLAS

AIF – análise por injeção em fluxo
Anaeróbios – bactérias anaeróbias
ANOVA – análise de variância univariada
ATL – aminoácidos totais livres
C-BMS – carbono da biomassa microbiana do solo
CG – cromatógrafo gasoso
CMRA – capacidade máxima de retenção de água
COD – carbono orgânico dissolvido
COS – carbono orgânico do solo
COL – carbono orgânico lábil do solo oxidado por KMnO_4
COXP – carbono oxidável por permanganato
CP1 – componente principal 1
CP2 – componente principal 2
CTA – capacidade de troca aniônica
CTC – capacidade de troca catiônica
DN 90% PRC – dose de nitrogênio necessária para obtenção de 90% da PRC
DON – dissolved organic nitrogen
EFS – extração da fase sólida
ENC – extração de nitrogênio pela cana-de-açúcar nas parcelas controle
EPM – erro padrão da média
EUC – eficiência de uso do carbono
FAMES – ésteres metílicos de ácidos graxos
FBN – fixação biológica de nitrogênio
FMA – fungos micorrízicos arbusculares
Gram-negativas – bactérias Gram-negativas
Gram-positivas – bactérias Gram-positivas
L – litro
MANOVA – análise de variância multivariada
MBN – mineralização bruta de nitrogênio no solo
 K_d – coeficiente de partição
N-DVD – nitrogênio hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH
N-HKCl – nitrogênio extraível com KCl 2 mol L⁻¹ a quente

N-IAn – mineralização líquida de nitrogênio obtida por incubação anaeróbia

N-ISNT – nitrogênio hidrolisável por meio de difusão com NaOH

N-TFB – nitrogênio extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2

N₀ – nitrogênio potencialmente mineralizável

NIT – nitrogênio inorgânico total

N_{min} – nitrogênio mineral do solo

NOD – nitrogênio orgânico dissolvido

NR 90% RSY – nitrogen rate to achieve 90% RSY

NTD – nitrogênio total dissolvido

NTS – nitrogênio total do solo

NUC – nitrogen uptake in the control treatment

PCC – produtividade de colmos nas parcelas controle

PLFA – ácidos graxos de fosfolipídios

PRC – produção relativa de colmos

qCO₂ – quociente metabólico do solo

qCO_{2i} – quociente metabólico induzido do solo

qMic – quociente microbiano do solo

R² – coeficiente de determinação

RB – respiração basal do solo

RBi – respiração basal induzida do solo

RSY – relative stalks yield

SYC – stalks yield in the control treatment

TFSA – terra fina seca ao ar

t_{1/2} – tempo de meia-vida

THAM – tris(hidroximetil)aminometano

UALase – ureia amidoliase

USDA – United States Department of Agriculture

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), uma Poaceae originária do sudeste asiático, é cultivada atualmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. O Brasil, maior produtor mundial da cultura, têm desenvolvido iniciativas de sucesso na busca por fontes de energia renovável há mais de 75 anos (NASS; PEREIRA; ELLIS, 2007). As reservas finitas e os efeitos adversos no meio-ambiente e na saúde humana pela utilização de fontes não renováveis de energia explicam o interesse mundial cada vez maior por fontes renováveis, como o bioetanol, derivado de culturas energéticas (NASS; PEREIRA; ELLIS, 2007; GOLDEMBERG, 2008; SEABRA et al., 2011). O bioetanol brasileiro, proveniente da cana-de-açúcar, apresenta menor custo de produção quando comparado ao bioetanol de milho, nos EUA, ou ao bioetanol de trigo ou beterraba açucareira na Alemanha (GOLDEMBERG, 2008).

No Estado de São Paulo, maior produtor nacional da cultura (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014), a recomendação da fertilização nitrogenada da cana-de-açúcar é feita com base no conceito da produtividade esperada (SPIRONELLO et al., 1997). Quanto maior o potencial de produção, definido pelo tipo de solo, local, variedade utilizada, condição climática, entre outros fatores, maior é a demanda por N pela cultura (CANTARELLA, 2007). Contudo, ao contrário dos fertilizantes minerais, a matéria orgânica do solo é reconhecidamente o principal reservatório de N para as plantas (DOURADO-NETO et al., 2009). A busca por testes que consigam estimar o fornecimento de N do solo às plantas é objeto de pesquisas desde o início do século XX (BUNDI; MEISINGER, 1994). Para uma calibração bem-sucedida, todavia, é essencial que os métodos de predição se correlacionem com parâmetros de resposta da cultura ao N no campo, tais como a produtividade e extração de N no tratamento controle, além da produção relativa (ROBERTS et al., 2011).

Os métodos desenvolvidos para estimativa do N mineralizável do solo são, em sua maioria, de natureza biológica ou química (BUNDY; MEISINGER, 1994; ROS; TEMMINGHOFF; HOFFLAND, 2011; ST. LUCE et al., 2011). Os métodos historicamente denominados de biológicos envolvem a incubação de amostras de solo em condições controladas de umidade e temperatura, por um período que pode variar, em média, de 1 a 32 semanas (KEENEY, 1982; GRIFIN, 2008; ST. LUCE et al., 2011). As principais metodologias se referem à incubação aeróbia de longa duração

(STANFORD; SMITH, 1972) e anaeróbia de curta duração (KEENEY; BREMNER, 1966). Os métodos químicos, por sua vez, fazem uso de extratores diversos, que removem grandes quantidades de N orgânico do solo. Métodos que envolvem a utilização de extratores fracos, como a solução de KCl 2 mol L⁻¹ aquecida por 4 h e a solução tampão fosfato-borato a pH 11,2, geralmente apresentam resultados satisfatórios na estimativa do N mineralizável (GIANELLO; BREMNER, 1986; 1988). O método químico denominado de *Illinois Soil Nitrogen Test* (KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001), que mede o conteúdo de aminoaçúcares do solo, apresenta resultados heterogêneos quanto à capacidade de identificação de sítios responsivos e não responsivos ao N em milho nos EUA, com casos de sucesso (MULVANEY; KHAN; ELLSWORTH, 2006; WILLIAMS et al., 2007), mas também de falha (BARKER et al., 2006; SPARGO et al., 2009). A recente metodologia do carbono (C) orgânico lábil (CULMAN et al., 2012), que se baseia na mensuração do C de reservatórios facilmente mineralizáveis, também apresenta potencialidade na estimativa do N mineralizável do solo.

Raramente avaliados como preditores, os métodos microbiológicos procuram quantificar o reservatório e a atividade da biomassa microbiana no solo. Como os microrganismos atuam diretamente na ciclagem dos nutrientes, é oportuno avaliar o potencial de testes microbiológicos na estimativa da mineralização do N. As metodologias mais comuns envolvem a quantificação do C da biomassa microbiana (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987) e a evolução de CO₂ do solo referente à respiração basal dos microrganismos (ANDERSON, 1982). Por meio da técnica de diluição do isótopo ¹⁵N, é possível quantificar a mineralização bruta de N no solo, livre de processos de confundimento, como a imobilização e a nitrificação (MURPHY et al., 2003). A referida técnica isotópica identificou eficientemente sítios responsivos e não responsivos ao N pela cana-de-açúcar (OTTO, 2012).

A influência da palha superficial de cana-de-açúcar na fertilização nitrogenada da cultura é relevante e tem sido estudada (FORTES; TRIVELIN; VITTI, 2012; TRIVELIN et al., 2013). Contudo, pouco se conhece sobre o comportamento do N orgânico dissolvido (NOD) na zona de transição palha-solo em canaviais. Diversos autores têm sugerido que compostos de baixo peso molecular do NOD, como aminoácidos e peptídeos, desempenham papel chave na disponibilidade do nutriente às plantas (SCHIMEL; BENNETT, 2004; NANNIPIERI; PAUL, 2009). A rápida mineralização de aminoácidos e peptídeos em solos minerais e orgânicos de zonas

temperadas é reportada por diversos autores (JONES et al., 2004; FARRELL et al., 2011; JONES; KIELLAND, 2012). As proteínas, por outro lado, apresentam taxa de mineralização mais lenta em relação aos monômeros do NOD (JONES; KIELLAND, 2012). A sorção de compostos do NOD na fase sólida de coloides pode representar uma estratégia importante na liberação gradual de compostos nitrogenados para a solução do solo, além de reduzir as perdas dos mesmos por lixiviação. A sorção de NOD de baixo peso molecular em solos de regiões temperadas é relatada na literatura (ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GE et al., 2012). Em regiões tropicais, contudo, as informações são escassas.

Os impactos do N-fertilizante na zona de transição palha-solo dos canaviais, no que diz respeito à mineralização de C e as transformações do N mineral exógeno, também são desconhecidos. O uso de um carboidrato lábil marcado isotopicamente, como a ^{14}C -glicose, associada às formas de N mineral (N-NH_4^+ ou N-NO_3^-), pode explicar a dinâmica de mineralização do C pela entrada do N-fertilizante no sistema. Um estudo prévio indicou que a aplicação de N-NH_4^+ [via $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] acelerou a mineralização do C da glicose ou de resíduo vegetal de milho, ambos marcados em ^{14}C , em solo salino-alcálico do México (CONDE et al., 2005). As transformações do N mineral adicionado na forma de N-NH_4^+ ou N-NO_3^- e combinado com a ^{14}C -glicose, também são pertinentes, especialmente na palha, onde as informações disponíveis são limitadas. No solo, é reconhecida a maior imobilização microbiana de N-NH_4^+ comparativamente à de N-NO_3^- (RECOUS; MARY, 1990; PURI; ASHMAN, 1999).

Diante do exposto acima, é possível formular as seguintes hipóteses:

1. Testes de solo laboratoriais são hábeis na estimativa do N mineralizável e na recomendação de doses de fertilizantes nitrogenados na cana-de-açúcar;
2. Compostos do NOD de baixo peso molecular possuem rápida mineralização de C em solo e palha de canaviais localizados em regiões tropicais;
3. Compostos do NOD de baixo e alto peso molecular são adsorvidos na fase sólida do solo e palha de cana-de-açúcar;
4. A mineralização da glicose é intensificada pela adição das formas minerais de N na palha e solo, ocorrendo maior imobilização de N-NH_4^+ à de N-NO_3^- .

Com base nas hipóteses acima, os objetivos deste estudo foram: i) correlacionar métodos diversos para a estimativa do N mineralizável do solo com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N no campo; ii) determinar a mineralização de C e a sorção de compostos do NOD marcados em ^{14}C e aplicados em palha e solo de cana-

de-açúcar; e iii) quantificar a mineralização C e o conteúdo de N mineral em palha e solo de cana-de-açúcar devido à aplicação de ^{14}C -glicose associada ou não às formas de N mineral.

O capítulo 2 desta tese de doutorado, intitulado “Testes de solo para predição da mineralização de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar” foi desenvolvido integralmente no Brasil. Os experimentos em condições de campo foram instalados em diversas regiões canavieiras do Estado de São Paulo, enquanto que as determinações laboratoriais foram executadas no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP (LIE-CENA/USP). Em relação ao capítulo posterior, intitulado “Reações do nitrogênio orgânico e mineral dissolvidos em palha e solo de cana-de-açúcar relacionadas ao ciclo do carbono e nitrogênio”, as amostragens de solo e palha foram realizadas em dois experimentos também localizados no Estado de São Paulo. Os procedimentos laboratoriais, todavia, foram desenvolvidos na Bangor University, localizada no País de Gales, Reino Unido, durante programa de doutorado sanduíche no exterior (BEPE/FAPESP), sob orientação do Prof. Dr. Davey L. Jones.

Referências

ANDERSON, J.P.E. Soil respiration. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: ASA, SSSA, 1982. pt. 2: Chemical methods. p. 837-871. (Agronomy Monograph, 9).

BARKER, D.W., SAWYER, J.E.; AL-KAISI, M.M.; LUNDVALL, J.P. Assessment of the amino sugar-nitrogen test on Iowa soils: II. Field correlation and calibration. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 1352–1358, 2006.

BUNDY, L.G.; MEISINGER, J.J. Nitrogen availability indices. In: WEAVER, R.W. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2014/2015 - segundo levantamento**. Brasília, 2014. 20 p.

CONDE, E.; CARDENAS, M.; PONCE-MENDOZA, A.; LUNA-GUIDO, M.L.; CRUZ-MONDRAGÓN, C.; DENDOOVEN, L. The impacts of inorganic Nitrogen application on mineralization of ^{14}C -labelled maize and glucose, and on priming effect in saline alkaline soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 681-691, 2005.

CULMAN, S.W.; SNAPP, S.S.; FREEMAN, M.A.; SCHIPANSKI, M.E.; BENISTON, J.; LAL, R.; DRINKWATER, L.E.; FRANZLUEBBERS, A.J.; GLOVER, J.D.; GRANDY, A.S.; LEE, J.; SIX, J.; MAUL, J.E.; MIRKSY, S.B.; SPARGO, J.T.; WANDER, M.M. Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 494-504, 2012.

DOURADO-NETO, D.; POWLSON, D.; ABU BAKAR, R.; BACCHI, O.O.S.; BASANTA, M.V.; THI CONG, P.; KEERTHISINGHE, G.; ISMAILI, M.; RAHMAN, S.M.; REICHARDT, K.; SAFWAT, M.S.A.; SANGAKKARA, R.; TIMM, L.C.; WANG, J.Y.; ZAGAL, E.; KESSEL, C. van. Multiseason recoveries of organic and inorganic nitrogen-15 in tropical cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 139-152, 2010.

FARRELL, M.; HILL, P.W.; WANNIARACHCHI, S.D.; FARRAR, J.; BARDGETT, R.D.; JONES, D.L. Rapid peptide metabolism: a major component of soil nitrogen cycling? **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 25, p. 1-11, 2011.

FORTES, C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Long-term decomposition of sugarcane harvest residues in São Paulo State, Brazil. **Biomass & Bioenergy**, Amsterdam, v. 42, p. 189-198, 2012.

GE, T.; YUAN, H.; ROBERTS, P.; JONES, D.L.; QIN, H.; TONG, C.; HUANG, D. Amino acid and peptide dynamics in horticultural soils under conventional and organic management strategies. **Journal of Soils and Sediments**, Berlin, v. 12, p. 323-333, 2012.

GIANELLO, C.; BREMNER, J.M. Comparison of chemical methods of assessing potentially available organic nitrogen in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 17, p. 215-236, 1986.

_____. A rapid steam distillation method of assessing potentially available organic nitrogen in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 19, p. 1551-1568, 1988.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, p. 1-7, 2008.

GRIFFIN, T.S. Nitrogen availability. In: SCHEPERS, J.S.; RAUN, W.R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural systems**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 2008. p. 613-646.

JONES, D.L.; KIELLAND, K. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 55, p. 60-69, 2012.

JONES, D.L.; SHANNON, D.; MURPHY, D.V.; FARRAR, J. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 749-756, 2004.

KEENEY, D.R. Nitrogen: availability indices. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. 2nd ed. Madison: ASA, SSSA, 1982. pt 2: Chemical and microbiological properties. p. 711-733.

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.

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

MULVANEY, R.L.; KHAN, S.A.; ELLSWORTH, T.R. Need for a soil-based approach in managing nitrogen fertilizers for profitable corn production. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 172-182, 2006.

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

NANNIPIERI, P.; PAUL, E.A. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2357-2369, 2009.

NASS, L.L.; PEREIRA, P.A.A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2228-2237, 2007.

OTTO, R. **Desenvolvimento radicular e produtividade da cana-de-açúcar relacionados à mineralização do N do solo e à adubação nitrogenada**. 2012. 120 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PURI, G.; ASHMAN, M.R. Microbial immobilization of ¹⁵N-labelled ammonium and nitrate in a temperate woodland soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 929-931, 1999.

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

ROBERTS, P.; BOL, R.; JONES, D.L. Free amino sugar reactions in soil in relation to soil carbon and nitrogen cycling. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 3081-3092, 2007.

ROBERTS, T.L.; ROSS, W.J.; NORMAN, R.J.; SLATON, N.A.; WILSON JUNIOR, C.E. Predicting Nitrogen fertilizer needs for rice in Arkansas using alkaline hydrolyzable-nitrogen. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 75, p. 1161-1171, 2011.

ROS, G.H.; TEMMINGHOFF, E.J.M.; HOFFLAND, E. Nitrogen mineralization: a review and meta-analysis of the predictive value of soil tests. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 62, p. 162-173, 2011.

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

SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C.; CHUM, H.L.; FRONI, C.E.; SARTO, C.A. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 5, p. 519-532, 2011.

SPARGO, J.T.; ALLEY, M.M.; THOMASON, W.E.; NAGLE, S.M. Illinois Soil Nitrogen Test for prediction of fertilizer nitrogen needs of corn in Virginia. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 434-442, 2009.

SPIRONELLO, 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**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundação IAC, 1997. p. 237-239. (Boletim técnico, 100)

ST. LUCE, M.; WHALEN, J.K.; ZIADI, N.; ZEBARTH, B. Nitrogen dynamics and indices to predict soil nitrogen supply in humid temperate soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 112, p. 55-102, 2011.

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

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

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

WILLIAMS, J.D.; CROZIER, C.R.; WHITE, J.G.; HEINIGER, R.W.; SRIPADA, R.P.; CROUSE, D.A. Illinois soil nitrogen test predicts southeastern U.S. corn economic optimum nitrogen rates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 735-744, 2007.

2 TESTES DE SOLO PARA PREDIÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

Atualmente, a recomendação da fertilização nitrogenada para a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) no Brasil é realizada com base no conceito da produtividade esperada. A identificação de um teste de solo capaz de prever a mineralização de nitrogênio (N) é essencial para aumentar a eficiência de uso de fertilizantes nitrogenados pela cultura. Os objetivos deste estudo foram o de correlacionar e calibrar diversos testes de solo com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N. Entre 2006 e 2013 foram instalados 21 experimentos de curva de resposta da cana-de-açúcar ao N no Estado de São Paulo, Brasil. As amostragens de solo foram realizadas nas camadas de 0-20 e 20-40 cm. Foram utilizados métodos de natureza biológica, química, microbiológica e isotópica (^{15}N). Os métodos para predição do N mineralizável foram correlacionados com a produtividade de colmos (PCC) e extração de N (ENC) no tratamento controle, produção relativa da cultura (PRC) e com a dose de N necessária para obtenção de 90% da PRC (DN 90% PRC). Nenhum método conseguiu prever a mineralização de N no solo. Foram verificadas fracas correlações entre a incubação anaeróbica e a PCC, e o N extraível por KCl a quente por 4 h e o N extraível por tampão fosfato-borato a pH 11,2 com a ENC. Os índices não se correlacionaram com a PRC e a DN 90% PRC. Desse modo, é possível concluir que nenhum método é recomendado no ajuste de doses de fertilizantes nitrogenados para aplicação em soqueiras de cana-de-açúcar cultivadas no Estado de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; Disponibilidade de nitrogênio; Métodos químicos; Respiração basal; Mineralização bruta

Abstract

Currently, the recommendation of nitrogen (N) fertilizer on sugarcane (*Saccharum* spp.) in Brazil is performed based on the concept of expected yield. The identification of a soil test that can predict the N mineralization is essential for improving N fertilizer-use efficiency by this crop. The objectives of this study were to correlate and calibrate soil N tests with sugarcane N response parameters. Between 2006 and 2013, 21 sugarcane N-response trials were performed in the state of São Paulo, Brazil. Soil sampling was performed at 0-20 and 20-40 cm depths. Biological, chemical, microbiological and isotopic (^{15}N) methods were selected. The methods to predict soil N supply were correlated with stalks yield (SYC) and total N uptake (NUC) in the control treatment, relative stalks yield (RSY) and the N rate required to achieve 90% of the RSY (NR 90% RSY). No method was able to predict the soil N mineralization. Weak correlations were verified between anaerobic incubation and the SYC, and the hot KCl extractable N and phosphate-borate buffer at pH 11.2 extractable N with NUC. Indexes did not correlate with RSY and the NR 90% RSY. Thus, it can be concluded that no method is recommended in adjusting N fertilizer rates for application on sugarcane ratoons cropped in São Paulo State, Brazil.

Keywords: *Saccharum* spp.; Nitrogen availability; Chemical methods; Basal respiration; Gross mineralization

2.1 Introdução

As reservas finitas, os impactos ambientais e os riscos à saúde humana pelo uso do petróleo, um recurso natural não renovável, podem explicar o crescente interesse mundial na busca por fontes renováveis de energia (GOLDEMBERG, 2008; MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008; SEABRA et al., 2011). Nesse cenário destaca-se a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), uma cultura reconhecidamente importante para a segurança energética global, e que é cultivada mundialmente nas regiões tropicais e subtropicais (NASS; PEREIRA; ELLIS, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial da cultura e o país com maior potencial de expansão em área plantada (NASS; PEREIRA; ELLIS, 2007; GOLDEMBERG, 2008). Estima-se que na safra 2014/2015, a área brasileira cultivada com cana-de-açúcar irá superar 9,0 milhões de hectares, com a produção anual situando-se em torno de 660 milhões de toneladas. O Estado de São Paulo deve contribuir com 51% da produção canavieira nacional, com área total da cultura de cerca de 4,7 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). O etanol, biocombustível derivado da cana-de-açúcar, apresenta vantagens aos combustíveis fósseis, como: i) redução média de 80% nas emissões dos gases do efeito estufa; ii) diminuição na dependência do país aos derivados de petróleo; iii) menor custo de produção por litro; iv) empregos para a população rural; e v) menores impactos na saúde humana (LUO; VAN DER VOET; HUPPES, 2009; OMETTO; HAUSCHILD; ROMA, 2009; BÖRJESSON, 2009; GALDOS et al., 2013).

A avaliação da situação da fertilidade do solo e a posterior recomendação de fertilizantes para a suplementação dos macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) na cultura da cana-de-açúcar, no Estado de São Paulo, é realizada com base em diversos testes de solo, que apresentam boa confiabilidade e ampla adoção por parte dos produtores rurais (RAIJ et al., 1994; RAIJ et al., 1997; CANTARELLA; RAIJ; QUAGGIO, 1998; RAIJ et al., 2001). Para o N, contudo, a recomendação da fertilização nitrogenada é realizada por meio da produtividade esperada de colmos, estratificada em faixas de produtividade ($< 60 \text{ Mg ha}^{-1}$, $60 \text{ a } 80 \text{ Mg ha}^{-1}$, $80 \text{ a } 100 \text{ Mg ha}^{-1}$ e $> 100 \text{ Mg ha}^{-1}$), com as doses de N variando

de 60 a 120 kg ha⁻¹ para soqueiras da cultura (SPIRONELLO et al., 1997). O conceito de produtividade esperada, todavia, não leva em consideração o N fornecido pelo solo por meio da mineralização da matéria orgânica (OTTO et al., 2013). Desse modo, em solos com alto potencial de mineralização de N (MARIANO et al., 2013), a fertilização nitrogenada calculada por meio da produtividade esperada pode acarretar em doses excessivas do nutriente no agroecossistema, ocasionando impactos ambientais e econômicos (SOMMER; SCHJOERRING; DENMEAD, 2004; CARMO et al., 2013; MARIANO et al., 2012). Por outro lado, em solos com transição recente do sistema de colheita com queima prévia do canavial para o sistema sem queima, a imobilização de N pode ser significativa (TRIVELIN et al., 2013), ocorrendo assim a aplicação de subdoses do nutriente caso o conceito de produtividade esperada seja o adotado.

Embora a fertilização nitrogenada possa promover incrementos de produtividade de colmos na cana-de-açúcar (VITTI et al., 2007; VIEIRA et al., 2010; FRANCO et al., 2011; THORBURN et al., 2011), a quantificação do N mineralizado a partir das frações orgânicas do solo é de grande importância, visto que a matéria orgânica é o principal reservatório de N para as plantas, como reportado por diversos autores (TAKAHASHI, 1964; NORMAN et al., 1992; LÓPEZ-BELLIDO; LÓPEZ-BELLIDO; LÓPEZ-BELLIDO, 2006; DOURADO-NETO et al., 2010; FRANCO et al., 2011). Consequentemente, o N mineral disponibilizado a partir da mineralização N do solo deve ser considerado para o uso eficiente de fertilizantes nitrogenados (MULVANEY; KHAN, 2001). Nesse sentido, testes para a estimativa da disponibilidade de N no solo tem sido o objetivo de muitos pesquisadores desde meados de 1900 (BUNDY; MEISINGER, 1994), porém os resultados são heterogêneos e inconclusivos até o momento (BUNDY; MEISINGER, 1994; GRIFFIN, 2008, ROS; TEMMINGHOFF; HOFFLAND, 2011). Apesar de desafiador, a busca por um teste de solo capaz de prever a mineralização de N no campo é de extrema importância para a cana-de-açúcar. Como a referida cultura apresenta ciclo longo, de, em média, 12 meses para soqueiras, a dependência das plantas pelo N mineral disponibilizado pelo solo é incontestável e essencial para atender à demanda nutricional da cana-de-açúcar pelo nutriente. A identificação de locais responsivos e não responsivos ao N também pode aumentar a eficiência de uso do nutriente pela cultura, além de reduzir os impactos ambientais dos fertilizantes nitrogenados e maximizar o lucro dos produtores e unidades sucroenergéticas.

No Brasil, especificamente no Estado de São Paulo, houve a tentativa de estabelecimento de um teste de solo com base no conteúdo de matéria orgânica para

recomendação da fertilização nitrogenada para várias culturas, porém os resultados apresentaram-se inconsistentes com a resposta das plantas ao N aplicado, levando os pesquisadores a abandonar o teste de solo posteriormente (CANTARELLA; RAIJ; QUAGGIO, 1998). Para dois Estados do Sul do Brasil (Santa Catarina e Rio Grande do Sul), no entanto, a recomendação da fertilização nitrogenada para diversas culturas comerciais, incluindo-se a cana-de-açúcar, é realizada levando-se em consideração dois fatores: a produtividade esperada e o conteúdo de matéria orgânica do solo (MOS) (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC – CQFS RS/SC, 2004). Contudo, a adoção da MOS como parâmetro complementar para a recomendação da aplicação de N nos Estados brasileiros citados acima não se baseou na efetiva calibração desse atributo químico com parâmetros de resposta das culturas no campo, mas de modo empírico, atribuindo-se uma taxa de mineralização dessa fração orgânica no solo.

A grande maioria dos métodos desenvolvidos para predição do N mineralizável do solo pode ser agrupada em duas categorias: biológicos e químicos (KEENEY, 1982; BUNDY; MEISINGER, 1994; GRIFFIN, 2008, ROS; TEMMINGHOFF; HOFFLAND, 2011; ST. LUCE et al., 2011). Um dos métodos biológicos mais utilizados se refere à incubação aeróbia de longa duração (STANFORD; SMITH, 1972). Neste método, o N potencialmente mineralizável (N_0) é definido como a fração do N do solo considerada suscetível à mineralização, em condições ótimas de temperatura e umidade (WANG; SMITH; CHEN, 2003). Embora este procedimento seja reconhecido como um método referência, sua principal aplicação é como ferramenta de pesquisa, por ser laborioso e de alto consumo de tempo e custo para uso em rotina de laboratórios (CURTIN; CAMPBELL, 2007). Em contrapartida, a mineralização líquida de N por meio de incubação anaeróbia de curta duração (N-IAn), desenvolvida por Waring e Bremner (1964) e modificada por Keeney e Bremner (1966), consiste na determinação do $N-NH_4^+$ disponibilizado após a incubação de amostras de solo em meio anóxico por um período de sete dias, à temperatura de 40°C. Este método possui como vantagens à incubação aeróbia a necessidade de determinação apenas do $N-NH_4^+$ disponibilizado; ausência de problemas na estabilidade da umidade adequada e perda de água durante a incubação; além da maior quantidade de N mineralizada num mesmo período em relação às condições aeróbias (KEENEY, 1982). As correlações dos resultados do N_0 com a incubação anaeróbia geralmente são fortes (SOON; HAQ; ARSHAD, 2007; YAGI et al., 2009; MARIANO et al., 2013). Embora incubações de

solo sejam amplamente utilizadas como métodos de referência para calibração de índices visando à predição do N mineralizável do solo (SHARIFI et al., 2007a, 2008; SOON; HAQ; ARSHAD, 2007; SCHOMBERG et al., 2009; NYIRANEZA et al., 2012; McDONALD et al., 2014), tais métodos apresentam relativa inconsistência quanto à predição de parâmetros de resposta de culturas no campo (STEVENSON; COLE, 1999; KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001; OTTO et al., 2013).

Os métodos químicos, por sua vez, utilizam extratores ácidos, básicos e agentes oxidantes fortes para extrair uma fração do N do solo que pode se relacionar estatisticamente com o N mineralizável determinado por incubações de solo ou parâmetros de resposta das culturas ao N. A grande maioria destes métodos foi desenvolvida até meados de 1981 (STANFORD, 1978; STANFORD; SMITH, 1978; WHITEHEAD, 1981), sendo que artigos publicados, principalmente entre 1982 e 2001, avaliaram testes químicos já existentes na literatura ou realizaram pequenas modificações nos mesmos (ROS et al., 2011). Métodos químicos desenvolvidos nesse período, como o N do solo extraível por solução de KCl a quente por 4 h (N-HKCl) (GIANELLO; BREMNER, 1986) e o N do solo extraível por solução tampão fosfato-borato (N-TFB) (GIANELLO; BREMNER, 1988) foram exaustivamente testados e apresentaram resultados satisfatórios para predição do N mineralizável (GIANELLO; BREMNER, 1986; JALIL et al., 1996; NAYYAR; SINGH; SINGH, 2006; SCHOMBERG et al., 2009), embora casos desfavoráveis também tenham sido reportados (HONG; FOX; PIEKIELEK, 1990; SHARIFI et al., 2007a; NYIRANEZA et al., 2012). A determinação do N-HKCl baseia-se na quantificação de formas solúveis e trocáveis de N-NH_4^+ , frações solúveis do N orgânico e compostos nitrogenados diversos (ST. LUCE et al., 2011). No caso do N-TFB, alguns aminoácidos e aminoaçúcares do solo são quantificados (GIANELLO; BREMNER, 1988). Todavia, as exatas frações do N que ambos os métodos químicos são capazes de extrair ainda são incertas.

Em 2001, com o surgimento do *Illinois Soil Nitrogen Test* (N-ISNT) (KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001), um novo alento para pesquisas relacionadas aos testes de solo para N foi iniciado. O N-ISNT estima o conteúdo de aminoaçúcares e N-NH_4^+ do solo por meio da difusão direta das amostras com solução de NaOH em uma pequena câmara de vidro. Anos mais tarde, Bushong et al. (2008) e Roberts et al. (2009a), visando reduzir o tempo de análise, desenvolveram metodologia alternativa (N-DVD) para a quantificação do N-ISNT, substituindo o uso das câmaras de vidro por destilador de N (método Kjeldahl), aparelho muito comum em laboratórios de análise

de solo. As correlações entre os métodos N-ISNT e N-DVD são extremamente fortes (ROBERTS et al., 2009a). Contudo, existe grande heterogeneidade nos resultados de calibração do N-ISNT e N-DVD, com casos de sucesso (KLAPWYK; KETTERINGS, 2006; MULVANEY; KHAN; ELLSWORTH, 2006; WILLIAMS et al., 2007; ROBERTS et al., 2011, 2013), mas também insucesso (BARKER et al., 2006; LABOSKI et al., 2008; OSTERHAUS; BUNDY, ANDRASKI, 2008; SPARGO et al., 2009) na predição da resposta do arroz (*Oryza sativa* L.) e milho (*Zea mays* L.) ao N nos EUA.

A metodologia do C orgânico lábil (COL) para quantificação do C ativo do solo é relativamente nova, sendo inicialmente introduzida por Weil et al. (2003) e posteriormente modificada por Culman et al. (2012). O COL é um método químico rápido, de baixo custo, fácil adoção por laboratórios de rotina e pode ser modificado para ser utilizado no campo (IDOWU et al., 2008). Neste método, utiliza-se KMnO_4 0,02 mol L⁻¹ como agente oxidante de parte do C orgânico do solo (COS). O COL geralmente apresenta forte correlação com a maioria das determinações da atividade microbiana, incluindo o C da biomassa microbiana do solo (C-BMS), respiração induzida por substratos, C-carboidrato solúvel e COS (CULMAN et al., 2012). Devido à estreita relação com a biomassa microbiana, o COL apresenta grande potencial como método indicador de mudanças no ambiente, como preparo de solo, culturas de cobertura e mudança no uso da terra. Como a metodologia do COL supostamente quantifica a fração viva (e altamente lábil) do COS, a avaliação do teste como preditor do N mineralizável mostra-se interessante e promissora, considerando-se que os microrganismos também regulam a transformação e acúmulo de nutrientes no solo (HORWATH; PAUL, 1994). Possivelmente por se tratar de uma metodologia recente, não foram encontrados estudos na literatura que avaliaram o COL na estimativa do N mineralizado do solo.

A avaliação de métodos microbiológicos como preditores do N fornecido pelo solo às plantas é mais incomum se comparada a testes biológicos e químicos. As metodologias mais tradicionais para quantificação da atividade microbiana são o C-BMS e a respiração basal do solo (RB) (HORWATH; PAUL, 1994; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Diversas metodologias foram propostas para determinação do C-BMS, porém as mais comuns são a técnica da fumigação-incubação (JENKINSON; POWLSON, 1976) e fumigação-extração (VANCE; BROOKES, JENKINSON, 1987), sendo esta última a mais utilizada pela comunidade científica no Brasil (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010) e possivelmente no

mundo. A RB, por sua vez, envolve a quantificação do C-CO₂ emitido por amostras de solo incubadas em condições controladas de umidade e temperatura, e está diretamente relacionada com a mineralização do C orgânico (ANDERSON, 1982). A indução da respiração da biomassa microbiana pela adição de carboidratos lábeis (glicose, por exemplo) às amostras de solo e posterior medição do fluxo de C-CO₂ emitido é conhecida como respiração basal induzida do solo (RBI) (ANDERSON, 1982).

Alguns parâmetros importantes podem ser derivados do C-BMS e RB. A razão da RB e o C-BMS, denominada de quociente metabólico (qCO_2), indica a eficiência dos microrganismos no uso de compostos pertencentes ao reservatório do COS (INSAM; HASELWANDTER, 1989). A razão do C-BMS e o COS, conhecida como quociente microbiano ($qMic$), representa a capacidade do solo em suportar o crescimento microbiano (INSAM; DOMSCH, 1988). Contudo, a utilização dos indicadores microbiológicos supracitados apresenta alguns inconvenientes, tais como o alto custo das determinações, tempo elevado de execução e a recomendação de uso de amostras de solo frescas para a quantificação dos métodos (FRANZLUEBBERS et al., 2000; DE NOBILI; CONTIN; BROOKES, 2006). Os resultados de índices microbiológicos como testes de solo para N são escassos e heterogêneos, com casos de sucesso para a RB (FRANZLUEBBERS et al., 2000; SCHOMBERG et al., 2009) e insucesso para o C-BMS (SHARIFI et al., 2007a, 2007b).

O único modo de se estimar mineralização bruta de N (MBN) no solo, livre de transformações concorrentes, como a imobilização e nitrificação, se faz por meio de técnica isotópica, denominada de diluição do isótopo estável ¹⁵N (BARRACLOUGH et al., 1985; HART et al., 1994; MURPHY et al., 2003). Nessa técnica, o reservatório NH₄⁺ do solo é inicialmente enriquecido com ¹⁵N por meio da aplicação de sal contendo ¹⁵NH₄⁺ (abundância isotópica de ¹⁵N acima de 0,3663%). Durante incubação de 2 a 3 dias, o reservatório NH₄⁺ do solo sofre diluição no isótopo ¹⁵N, por meio da entrada de NH₄⁺ com abundância natural (0,3663%) proveniente da amonificação da matéria orgânica do solo. Desse modo, a MBN é calculada por meio da diferença no enriquecimento e tamanho do reservatório NH₄⁺ do solo em tempos diferentes, com auxílio de modelos matemáticos desenvolvidos inicialmente por Kirkham e Bartholomew (1954) e simplificados posteriormente por Barraclough et al. (1985). As limitações da MBN se referem ao custo elevado dos consumíveis, alto grau de complexidade do protocolo experimental e dificuldades instrumentais. Embora a

metodologia seja destinada principalmente para fins de pesquisa, devido às desvantagens relatadas acima, caso a MBN se apresente eficaz na predição do N mineralizado do solo, a mesma pode vir a ser utilizada como método de referência para calibração de métodos mais simplificados. Até o momento, apenas Otto (2012) reportou a utilização da MBN como método preditor do N mineralizável do solo, e verificou que a metodologia foi eficiente na identificação de sítios responsivos e não responsivos ao N aplicado em cana-de-açúcar.

Um atributo essencial para qualquer método que visa estimar o N mineralizável do solo se baseia na habilidade do mesmo em correlacionar-se com parâmetros de resposta da cultura ao N no campo, tais como a produtividade e extração de N no tratamento controle, além da produção relativa, objetivando-se com isso definir uma curva de calibração para a predição de doses de N com base nos valores do teste de solo (ROBERTS et al., 2011). Adicionalmente, a maioria dos estudos sobre a avaliação de métodos para a disponibilidade de N no solo leva em consideração apenas a camada superficial do solo (0-20 cm), negligenciando camadas mais profundas. Portanto, a avaliação da subsuperfície do solo em estudo dessa natureza é especialmente importante para culturas perenes e semi-perenes, que apresentam sistema radicular profundo, como é o caso da cana-de-açúcar (SMITH; INMAN-BAMBER; THORBURN, 2005; MARIANO et al., 2013).

A busca por um teste de solo que seja eficiente na recomendação da fertilização nitrogenada na cana-de-açúcar é de grande importância para a maior sustentabilidade desse agroecossistema, resultando em ganhos econômicos e ambientais. Não existem relatos na literatura de estudos envolvendo a correlação e calibração de métodos para a estimativa do N mineralizável com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar no campo. Desse modo, os objetivos deste estudo foram: i) correlacionar métodos para estimativa do fornecimento de N às plantas pelo solo com parâmetros de resposta da cultura de cana-de-açúcar ao N de 21 experimentos com curva de resposta ao nutriente; ii) definir a profundidade da amostragem de solo adequada para a avaliação da disponibilidade de N, em caso de correlações e calibrações bem-sucedidas entre métodos e parâmetros da cana-de-açúcar; iii) calibrar doses de N-fertilizante, por meio de testes de solo, para soqueiras de cana-de-açúcar cultivadas no Estado de São Paulo, Brasil.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Áreas experimentais e amostragem de solo

Foram conduzidos 21 experimentos de curva de resposta à fertilização nitrogenada de soqueiras de cana-de-açúcar nas principais regiões canavieiras do Estado de São Paulo, Brasil, durante os anos de 2006 a 2013 (Figura 2.1 e Tabela 2.1). Em seis sítios foi realizada a reaplicação de doses de N-fertilizante após rebrota da cultura e realizada amostragem adicional de solo nas parcelas controle dos experimentos. Desse modo, os tratamentos nas áreas experimentais 6, 8, 9, 10, 12 e 13 foram reaplicados nas rebrotas da cultura e representam os locais 11, 14, 16, 15, 18 e 19 respectivamente. Em todas as áreas experimentais, os resíduos da cultura (folhas, ponteiro e pedaços de colmos) provenientes da colheita anterior foram mantidos na superfície do solo, visando representar condições de colheita mecanizada sem queima. As variedades de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos complexos) utilizadas variaram de acordo com o ambiente de produção de cada local, determinado pela fertilidade do solo e produtividade média histórica da área. Anteriormente à instalação dos experimentos, em diversos locais há histórico de aplicação de resíduos orgânicos provenientes da indústria sucroenergética, como vinhaça (alto teor de K_2O e C orgânico solúvel) e torta de filtro (alto teor de P_2O_5). Da mesma forma, em alguns sítios há registro da aplicação do fertilizante orgânico

Figura 2.1 - Localização das áreas experimentais envolvendo a aplicação de doses de N em soqueiras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil

Tabela 2.1 - Descrição dos sítios experimentais, classificação dos solos e manejo de resíduos orgânicos em 21 experimentos de curva de resposta à fertilização nitrogenada de soqueiras de cana-de-açúcar

Área ⁽¹⁾	Município	Localização	Solo ⁽²⁾	Safra	Variedade	Resíduos orgânicos
1	Jaboticabal	21°20'S 48°19'O	Arenic Kandiusults	2006/2007	SP81-3250	Vinhaça
2	Pirassununga	21°55'S 47°10'O	Typic Haplustox	2006/2007	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
3	Pradópolis	21°15'S 48°18'O	Rhodic Eutruxtox	2006/2007	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
4	Assis	22°30'S 50°24'O	Typic Haplustox	2008/2009	SP83-2847	Sem aplicação de resíduos
5	Jaboticabal	21°19'S 48°10'O	Rhodic Haplustox	2009/2010	SP80-3280	Vinhaça
6	Piracicaba	22°40'S 47°38'O	Rhodic Eutruxtox	2009/2010	IAC91-1099	Sem aplicação de resíduos
7	Piracicaba	22°35'S 47°37'O	Typic Hapludox	2009/2010	SP89-1115	Vinhaça e torta de filtro
8	Jaú	22°13'S 48°36'O	Typic Haplustox	2011/2012	SP81-3250	Sem aplicação
9	Novo Horizonte	21°32'S 49°20'O	Typic Hapludox	2011/2012	CTC15	Composto, vinhaça e Ajifer®
10	Novo Horizonte	21°31'S 49°19'O	Typic Hapludox	2011/2012	SP91-1285	Composto, vinhaça e Ajifer®
11	Piracicaba	22°40'S 47°38'O	Rhodic Eutruxtox	2011/2012	IAC91-1099	Sem aplicação de resíduos
12	Piracicaba	22°41'S 47°38'O	Rhodic Eutruxtox	2011/2012	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
13	Santa Maria da Serra	22°33'S 48°17'O	Typic Ustipsamments	2011/2012	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
14	Jaú	22°13'S 48°36'O	Typic Haplustox	2012/2013	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
15	Novo Horizonte	21°31'S 49°19'O	Typic Hapludox	2012/2013	SP91-1285	Composto, vinhaça e Ajifer®
16	Novo Horizonte	21°32'S 49°20'O	Typic Hapludox	2012/2013	CTC15	Composto, vinhaça e Ajifer®
17	Pereira Barreto	20°43'S 51°07'O	Typic Eutruxtox	2012/2013	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
18	Piracicaba	22°41'S 47°38'O	Rhodic Eutruxtox	2012/2013	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
19	Santa Maria da Serra	22°33'S 48°17'O	Typic Ustipsamments	2012/2013	SP81-3250	Sem aplicação de resíduos
20	Tabapuã	20°58'S 49°03'O	Udic Kandiusalfs	2012/2013	RB955970	Sem aplicação de resíduos
21	Tabapuã	20°57'S 49°03'O	Udic Kandiusalfs	2012/2013	RB955970	Vinhaça

⁽¹⁾ Nos sítios 6, 8, 9, 10, 12 e 13 os tratamentos foram reaplicados posteriormente e representam os locais 11, 14, 16, 15, 18 e 19 respectivamente

⁽²⁾ A classificação dos solos se refere à Soil Taxonomy (SOIL SURVEY STAFF, 2014), no nível de subgrupo

nitrogenado Ajifer®, um coproduto da síntese de aminoácidos. Os solos apresentaram grande heterogeneidade quanto à textura, variando da classe arenosa a muito argilosa, de acordo com o sistema de classificação do USDA (*United States Department of Agriculture*). Informações detalhadas das áreas experimentais, tais como localização, classificação do solo (SOIL SURVEY STAFF, 2014), safra agrícola, variedade de cana-de-açúcar e manejo de resíduos e fertilizantes orgânicos encontram-se na Tabela 2.1.

O delineamento dos experimentos foi o de blocos ao acaso, com quatro ou cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos de doses de N [60, 120 e 180 kg ha⁻¹ em 2 locais (6 e 11); 50, 100 e 150 kg ha⁻¹ em 9 locais (1, 2, 3, 8, 12, 13, 14, 18 e 19); 50, 100, 150 e 200 kg ha⁻¹ em 10 locais (4, 5, 7, 9, 10, 15, 16, 17, 20 e 21)], na forma de nitrato de amônio (32% de N), nitrato de amônio e cálcio (26% de N) ou sulfato de amônio (21% de N). Foi incluído também um tratamento controle, sem aplicação de N. As doses de N adicionadas ao solo foram estabelecidas objetivando-se promover uma resposta crescente de produtividade da cultura ao nutriente até atingir um platô, podendo alcançar quantidades aplicadas que resultassem em redução no rendimento (toxidez). Análises de fertilidade do solo para quantificação do conteúdo de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn, além da saturação por bases e acidez potencial (RAIJ et al., 2001) foram realizadas previamente à instalação dos experimentos para garantia de que todos os nutrientes, exceto o N, encontravam-se em quantidades suficientes para o desenvolvimento adequado da cana-de-açúcar. Com base nas análises de solo, os experimentos receberam doses de calcário, gesso agrícola, K₂O e P₂O₅ de acordo com recomendação de Spironello et al. (1997). Os fertilizantes (NPK) foram aplicados manualmente em aplicação única, sobre a palhada da cana-de-açúcar, distante 20 cm da linha da soqueira, 60 a 90 dias após a colheita do ciclo anterior. As plantas daninhas foram controladas por meio de herbicidas, enquanto que as pragas, compostas principalmente pela broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) e cigarrinha [*Mahanarva fimbriolata* (Stål)] foram controladas biologicamente utilizando-se o himenóptero *Cotesia flavipes* e o fungo *Metarhizium anisopliae* respectivamente. Em todos os sítios experimentais o espaçamento entre linhas foi de 1,5 m, com exceção das áreas 13 e 19, com espaçamento nas entre linhas de 1,0 m.

As amostragens de solo foram realizadas nas parcelas controle dos experimentos, com auxílio de um trado do tipo holandês, nas camadas de 0-20 e 20-40 cm, na entre linha das linhas centrais de cana-de-açúcar das parcelas, na mesma

ocasião da aplicação dos fertilizantes NPK. As amostras compostas das parcelas foram obtidas a partir da homogeneização de 9 a 12 amostras simples. Para a calibração dos métodos microbiológicos para estimativa do N mineralizável, cerca de 200 g de solo (em base úmida) das amostras dos experimentos conduzidos a partir de 2011 (áreas 8-21) foram mantidas refrigeradas até a realização das determinações químicas. Para tanto, imediatamente após a retirada das amostras, os solos foram acondicionados em recipiente térmico com gelo, para transporte, e em seguida, armazenados em refrigerador à temperatura de aproximadamente 4°C, durante três dias até a determinação da RB, RBi e C-BMS. Esse procedimento foi adotado visto que os processos de secagem ao ar, reumedecimento e mesmo o armazenamento de terra fina seca ao ar (TFSA) por longos períodos podem resultar em efeitos prejudiciais às propriedades bioquímicas do solo, principalmente à biomassa microbiana (FRANZLUEBBERS et al. 2000; DE NOBILI; CONTIN; BROOKES, 2006). Para a calibração de métodos químicos para predição da mineralização de N no solo, o restante de terra das amostras foi seco em estufa a 40°C durante 48 h (para maior padronização da temperatura de secagem), destorreado, peneirado (peneira com malha de 2 mm de abertura) e armazenado em recipiente plástico hermético, em temperatura ambiente.

2.2.2 Caracterização físico-química do solo

As propriedades físico-químicas dos 21 solos utilizados no presente estudo estão localizadas na Tabela 2.2. Todas as determinações foram realizadas em duplicata, com exceção da análise granulométrica, efetuada em amostra única. A determinação do pH do solo foi realizada de acordo com Raij et al. (2001), por meio de solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹, na relação 1:2,5 (solo: solução – m/v). A análise granulométrica foi determinada pelo método do densímetro (GEE; BAUDER, 1986).

A quantificação do C orgânico do solo (COS) foi realizada por meio da oxidação com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, por extenso período de aquecimento (NELSON; SOMMERS, 1996). Resumidamente, amostras contendo até 8 mg de COS foram adicionadas em tubos de digestão, adicionando-se em seguida 5 mL de solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,167 mol L⁻¹ e 7,5 mL de solução de H_2SO_4 18 mol L⁻¹. Os tubos foram levados para bloco digestor pré-aquecido a 150°C, e mantidos no aparato por exatamente 30 min. Após esse período, o conteúdo dos tubos foi transferido para frasco de vidro, e adicionou-se 0,2

Tabela 2.2 - Propriedades físico-químicas de solos amostrados nas camadas de 0-20 e 20-40 cm de parcelas controle (sem adição de N) em 21 experimentos de curva de resposta à fertilização nitrogenada de soqueiras de cana-de-açúcar

(continua)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	pH CaCl ₂	Areia	Silte	Argila	COS ⁽²⁾	NTS ⁽³⁾	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N _{min} ⁽⁴⁾
1	0-20	4,9	632	14	354	7,1	0,54	8,0	2,3	10,3
	20-40	4,3	586	18	396	4,9	0,38	4,4	0,8	5,2
2	0-20	5,1	706	25	270	6,7	0,50	6,6	0,3	6,8
	20-40	5,0	709	28	264	4,8	0,37	5,4	0,3	5,7
3	0-20	5,1	141	213	617	16,8	1,46	19,1	1,3	20,4
	20-40	5,1	133	183	684	15,0	1,24	16,4	2,5	18,9
4	0-20	4,8	858	23	120	5,1	0,43	4,8	0,0	4,9
	20-40	4,4	837	25	138	4,0	0,34	8,9	0,3	9,2
5	0-20	4,9	246	137	618	15,1	1,38	9,7	0,4	10,1
	20-40	5,0	233	125	643	12,7	1,21	7,3	0,4	7,6
6	0-20	4,5	419	89	492	15,6	1,03	9,5	1,7	11,2
	20-40	4,2	359	89	552	12,5	0,94	7,5	0,6	8,0
7	0-20	4,5	449	74	477	21,1	1,25	9,2	3,2	12,4
	20-40	4,5	428	73	500	18,2	1,06	7,5	2,1	9,6
8	0-20	4,7	763	20	217	7,3	0,57	3,8	2,1	5,9
	20-40	4,4	732	24	245	5,2	0,44	3,3	1,3	4,5
9	0-20	4,9	815	31	154	6,5	0,47	3,6	1,7	5,2
	20-40	4,8	792	32	176	5,1	0,41	6,0	2,6	8,6
10	0-20	4,5	745	36	220	6,5	0,60	4,6	4,4	9,0
	20-40	4,1	729	34	239	5,1	0,50	3,9	4,0	7,9
11	0-20	4,5	419	89	492	13,4	1,03	9,3	3,3	12,6
	20-40	4,2	359	89	552	9,9	0,94	6,4	2,1	8,4
12	0-20	5,0	303	132	566	14,5	1,31	5,9	2,8	8,7
	20-40	4,8	290	127	584	11,8	1,06	4,5	1,0	5,5
13	0-20	5,2	900	21	78	3,8	0,26	1,8	0,1	1,8
	20-40	5,1	906	19	75	3,8	0,25	1,7	0,0	1,7
14	0-20	4,5	760	21	220	6,7	0,58	2,6	2,2	4,8
	20-40	4,1	713	28	259	4,8	0,43	1,6	1,0	2,6
15	0-20	4,7	743	39	219	6,9	0,56	3,4	3,8	7,2
	20-40	4,2	723	25	252	5,4	0,48	2,4	2,2	4,6

Tabela 2.2 - Propriedades físico-químicas de solos amostrados nas camadas de 0-20 e 20-40 cm de parcelas controle (sem adição de N) em 21 experimentos de curva de resposta à fertilização nitrogenada de soqueiras de cana-de-açúcar

(conclusão)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	pH CaCl ₂	Areia	Silte	Argila	COS ⁽²⁾	NTS ⁽³⁾	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N _{min} ⁽⁴⁾
			g kg ⁻¹			mg kg ⁻¹				
16	0-20	4,9	817	26	157	5,1	0,47	2,2	2,6	4,9
	20-40	5,0	794	18	188	4,2	0,37	1,7	1,7	3,3
17	0-20	5,0	820	29	151	6,0	0,56	3,6	5,0	8,6
	20-40	4,6	781	33	186	4,4	0,42	5,0	2,5	7,6
18	0-20	4,9	289	121	591	13,5	1,26	5,0	6,1	11,1
	20-40	4,9	276	129	596	10,8	1,01	2,7	3,6	6,3
19	0-20	5,2	878	28	94	3,8	0,26	0,6	1,4	2,0
	20-40	5,1	901	21	78	2,9	0,23	1,2	1,1	2,4
20	0-20	4,7	812	28	161	4,3	0,41	3,3	1,7	5,0
	20-40	4,0	760	29	211	3,5	0,34	3,3	1,6	4,9
21	0-20	5,2	805	44	151	4,5	0,38	3,2	2,6	5,8
	20-40	4,4	769	40	191	3,3	0,31	2,3	0,8	3,1

⁽¹⁾ Descrição das áreas experimentais na Tabela 2.1

⁽²⁾ COS: C orgânico do solo; ⁽³⁾ NTS: N total do solo; ⁽⁴⁾ N_{min}: N mineral do solo calculado pela soma do conteúdo de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻

mL de solução indicadora (ácido N-fenilantranílico), titulando-se com solução de Fe(NH₄)(SO₄)2.6H₂O 0,2 mol L⁻¹ até obtenção de coloração verde brilhante, indicando redução total do Cr presente. Foram utilizados brancos reagentes aquecidos e não aquecidos, destinados à padronização da solução de [Fe(NH₄)(SO₄)2 . 6H₂O], que sofre oxidação ao longo do tempo.

A determinação do N total do solo (NTS) foi efetuada pelo método da digestão ácida em bloco digestor com recuperação quantitativa do N-NO₃⁻ (BREMNER, 1996). A avaliação da eficiência do método quanto à redução do NO₃⁻ à NH₄⁺ foi obtida com solução de KNO₃ 0,035 mol L⁻¹. Da mesma forma, a eficiência na digestão do N-orgânico a N-NH₄⁺ foi avaliada pelo uso de solução de tris(hidroximetil)aminometano (THAM) 0,036 mol L⁻¹. Após a digestão, as amostras foram transferidas quantitativamente para balão de destilação, e posterior adição de solução de 10 mL de NaOH 18 mol L⁻¹ via aparato no topo do destilador. A destilação ocorreu por 3,3 min (fluxo de destilação de 6,5 mL min⁻¹), sendo o destilado recebido em 5 mL de

solução de H_3BO_3 2%, e titulado na sequência com solução de H_2SO_4 0,025 mol L^{-1} padronizado.

A extração das formas minerais de N do solo ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$) foram determinadas em amostra de 4 g de solo, com KCl 2 mol L^{-1} , na relação 1:5 (solo e solução – m/v), sob agitação por uma hora em agitador orbital (MA-140, Marconi Equipamentos para Laboratórios LTDA, Piracicaba, Brasil) a 200 rpm e posterior filtração em papel de filtro nº 42 pré-lavado com solução de KCl 2 mol L^{-1} . Nos extratos, o conteúdo de N inorgânico foi determinado por meio de sistemas de análise por injeção em fluxo (AIF). A concentração de N-NH_4^+ foi determinada por condutimetria, pela formação de NH_3 em meio alcalino, permeável em membrana hidrofóbica (politetrafluoroetileno), sendo o fluxo direcionado para uma cela de condutividade conectada a um condutivímetro (REIS et al., 1997). As formas de N-nítrico ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$) foram determinadas simultaneamente por colorimetria, mediante redução do NO_3^- a NO_2^- por coluna de cádmio coperizado, sendo o NO_2^- posteriormente diazotado e acoplado com solução de dicloridrato de N-(1-Naftil)-etilenodiamina (GINÉ et al., 1980). O conteúdo de N mineral do solo (N_{min}) foi obtido pela soma do conteúdo de N-NH_4^+ e N-NO_3^- das amostras.

2.2.3 Métodos químicos e biológico para a predição do N mineralizável do solo

A determinação do COL foi obtida pela oxidação do COS com solução de KMnO_4 , com base na metodologia proposta por Weil et al. (2003) e modificada por Culman et al. (2012). Resumidamente, 2,5 g de solo foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL. Em cada tubo, 18 mL de água desionizada e 2 mL de solução estoque KMnO_4 0,019 mol L^{-1} foram adicionadas e os tubos foram agitados exatamente por 2 min em agitador orbital a 240 rpm. Os tubos foram então removidos do agitador e deixados em repouso por exatos 10 min. Após esse período, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um segundo tubo de centrifugação de 50 mL e misturados com 49,5 mL de água desionizada. Uma alíquota de 3 mL de cada amostra foi inserida em cubeta de acrílico para leitura do COL em espectrofotômetro UV-Vis a 550 nm. Foram utilizados padrões a partir da solução estoque de KMnO_4 para obtenção da curva de calibração.

A determinação do N-IAn foi realizada com base na metodologia de Keeney e Bremner (1966), com modificações. Amostras de 5 g de solo foram adicionadas em

tubos de ensaio (1,6 cm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento) contendo 12,5 mL de água desionizada. Os tubos foram vedados com película de parafina e incubados em câmara tipo BOD (MA-415, Marconi Equipamentos para Laboratórios LTDA, Piracicaba, Brasil) a 40°C por sete dias. Ao fim do período, os tubos foram agitados por 15 s, e o conteúdo transferido quantitativamente para um frasco de vidro com auxílio de 12,5 mL de solução de KCl 4 mol L⁻¹, divididos em três alíquotas. A seguir, os frascos foram agitados por 1 h em agitador orbital e o sobrenadante filtrado em papel de filtro n° 42 pré-lavado. O conteúdo de N-NH₄⁺ dos extratos foi determinado em sistema de AIF (REIS et al., 1997).

A determinação do N-HKCl (GIANELLO; BREMNER, 1986) foi realizada a partir da adição de 4 g de solo em tubos de digestão, juntamente com 20 mL de solução de KCl 2 mol L⁻¹. Os tubos foram vedados com rolhas de silicone e aquecidos em bloco digestor pré-aquecido a 100°C durante 4 h. Ao fim do período, os tubos foram acondicionados horizontalmente em recipiente plástico e agitados durante 1 h em agitador orbital. A seguir, o conteúdo dos tubos foi filtrado em papel de filtro n° 42 pré-lavado, sendo o conteúdo de N-NH₄⁺ dos extratos determinado em sistema de AIF supracitado.

A extração do N-TFB (GIANELLO; BREMNER, 1988) foi efetuada pela destilação direta de 1 g de solo com 40 mL de solução tampão fosfato-borato a pH 11,2 durante 8 min (fluxo de destilação de 6,5 mL min⁻¹), obtendo-se cerca de 60 mL de destilado, que foi recolhido em solução de H₃BO₃ 2%. Após a destilação, foi realizada a titulação do conteúdo destilado com solução de H₂SO₄ 0,005 mol L⁻¹ padronizado.

O N hidrolisado disponibilizado a partir de solução álcali por meio de destilação a vapor direta (N-DVD) (BUSHONG et al., 2008) foi obtido pela destilação de amostras de 1 g de solo com solução de 10 mL de NaOH 10 mol L⁻¹, adicionado via aparato situado no topo do destilador. A destilação ocorreu por 5 min (fluxo de destilação de 6,5 mL min⁻¹), sendo o destilado recebido em 5 mL de solução de H₃BO₃ 2%, e titulado na sequência com solução de H₂SO₄ 0,025 mol L⁻¹ padronizado.

A estimativa do conteúdo de aminoaçúcares e N-NH₄⁺ (N-ISNT) foi obtida por meio da difusão direta dos solos, de acordo com a metodologia proposta por Khan, Mulvaney e Hoeft (2001). Para tanto, 1 g de solo foi tratado com 10 mL de solução de NaOH 2 mol L⁻¹ em um frasco de vidro de 473 mL (Ball® Wide Mouth Pint Mason Jar, Jarden Home Brands, Daleville, IN, EUA) modificado segundo Mulvaney et al. (2001).

A seguir, uma placa de Petri de poliestireno de 60 mm de diâmetro contendo 5 mL de solução de H_3BO_3 4% foi acoplada em suspensão na tampa do frasco, que foi fechado hermeticamente. Os frascos foram acondicionados em chapas aquecedoras pré-aquecidas a 50°C por 5 h. A cada 1,5 h foi realizada a mudança de posição dos frascos na chapa aquecedora. A concentração de N hidrolisado por meio do NaOH e capturado pelo H_3BO_3 foi determinada por meio de titulação potenciométrica (titulador Titrino Plus 848, Metrohm AG, Ionenstrasse, SUI) com solução de H_2SO_4 $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ padronizado.

2.2.4 Métodos microbiológicos para predição do N mineralizável do solo

As amostras de solo (100 g em base úmida) destinadas a quantificação da RB, RB(i) e C-BMS foram peneiradas (peneira com malha de 2 mm de abertura) e corrigidas para 60% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA). A CMRA foi determinada de acordo com ISO (2003), com modificações. Resumidamente, cerca de 30 g de solo fresco foram transferidos para frascos plásticos com fundo selado por membrana de *nylon* (abertura de malha de 0,075 mm), que foram acondicionados durante 3 h em recipiente contendo H_2O para saturação do solo por capilaridade. Após esse período, os frascos plásticos foram posicionados sobre areia úmida por 2 h, para drenagem da H_2O presente nos macroporos do solo. A CMRA foi calculada a partir da umidade de uma subamostra de solo úmido após secagem em estufa a 105°C por 24 h. Na sequência, as amostras foram pré-incubadas em frascos de vidro em câmara climatizada a 28°C durante 10 d, para redução das interferências do peneiramento, reumedecimento e fragmentos de raízes (SPARLING; WHALE; RAMSAY, 1985). Ao fim da pré-incubação, iniciou-se a determinação da RB, de acordo com procedimento descrito por Anderson (1982). Um pequeno béquer contendo 10 mL de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi colocado no interior de um frasco de vidro que possuía 100 g de solo fresco, o qual foi hermeticamente lacrado e incubado por 10 d à 28°C . Após este período, a solução de NaOH contida no béquer foi titulada com solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada na presença de indicador fenolftaleína, sendo o C-CO_2 evoluído calculado pela diferença entre as amostras de solo e branco reagente. A mesma amostra foi utilizada para estimar a RBi, obtida por meio da adição de 0,5 g de glicose

ao solo (solubilizada em água, para maior uniformidade na distribuição) e posterior incubação adicional por 3 d na temperatura supracitada.

O C-BMS foi determinado com base na metodologia de fumigação-extração com clorofórmio (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). Subamostras de 10 g de solo (em base úmida), provenientes da amostra incubada para estimativa da RB e RBi, foram utilizadas para determinação do C-BMS. As subamostras foram acondicionadas em béqueres, e submetidas à fumigação em dessecador por meio da adição de um frasco com 25 mL de clorofórmio isento de álcool, com posterior realização de vácuo por 15 min. A seguir, as amostras foram mantidas no dessecador em ambiente escuro por 24 h. Os frascos contendo as amostras não fumigadas também foram deixados em repouso no escuro por 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram submetidas ao processo de extração do C por meio da adição de 40 mL de K_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, submetidas à agitação por 1 h, e filtradas em papel quantitativo. O teor de C nos extratos das amostras foi determinado por meio da oxidação do C orgânico com solução de $K_2Cr_2O_7$ $0,0667 \text{ mol L}^{-1}$, além de 10 mL de solução de H_2SO_4 18 mol L^{-1} e 5 mL de H_3PO_4 concentrado. O excesso de $K_2Cr_2O_7$ foi titulado com solução padronizada de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, na presença do indicador ferroína. O C-BMS foi calculado pela diferença entre os teores de C orgânico das amostras fumigadas e não fumigadas. Foi utilizado o fator de correção K_{ec} igual a 0,33. O qCO_{2i} (INSAM; HASELWANDTER, 1989; BABUJIA et al., 2010) foi estimado pela razão entre a RB(i) por unidade de C-BMS, enquanto que o $qMic$ foi calculado a partir da razão entre o C-BMS e o COS (INSAM; DOMSCH, 1988). Os resultados de RB, RBi e C-BMS foram expressos em unidade de solo seco, após determinação da umidade das amostras frescas por meio da secagem em estufa à 105°C por 24 h.

2.2.5 Mineralização bruta como índice para predição do N mineralizável do solo

A MBN foi determinada com base na metodologia descrita por Hart et al. (1994), com modificações. A MBN foi quantificada apenas nas amostras de solo pertencentes à camada superficial (0-20 cm), em razão de a técnica apresentar-se laboriosa e de alto custo. Para tanto, adicionaram-se 20 g de solo seco em recipientes de vidro de 230 mL (10 cm de altura e 70 mm de diâmetro interno de boca), ajustando-se a seguir a umidade a 60% da CMRA (ISO, 2003). Na sequência, os recipientes foram cobertos

objetivando-se evitar a perda excessiva de água. As amostras de solo permaneceram pré-incubadas a 25°C por 14 d em câmara tipo BOD (MA-415, Marconi LTDA, Piracicaba, Brasil). A umidade do solo e a temperatura de incubação utilizada foram baseadas no estudo desenvolvido por Moraes (2012), que verificou maiores valores de MBN em solos cultivados com cana-de-açúcar por meio do ajuste da umidade a 60% da CMRA e temperatura de incubação de 25°C. Durante o período de pré-incubação das amostras, a reposição de água foi efetuada a cada 48 h, quando necessário. 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). No tempo de 72 h antes da marcação isotópica em ^{15}N , as tampas plásticas que protegiam as amostras foram retiradas, permitindo-se assim rápida 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 de 60% da CMRA. A aplicação da solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi realizada por meio de pipeta automática, na dose de $3\text{ }\mu\text{g N g}^{-1}$ de solo, com um excesso isotópico de 20% em átomos de ^{15}N . Após a aplicação da solução marcada em ^{15}N , ajustou-se novamente a umidade das amostras de solo para 60% da CMRA.

A extração do N mineral ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$) foi realizada 24 e 96 h após a aplicação do $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizando-se três repetições para cada tempo. A extração foi efetuada utilizando-se 100 mL de solução de KCl 2 mol L^{-1} na relação 1:5 (solo: solução – m/v), sob agitação por 1 h em agitador orbital. Os extratos de KCl foram filtrados usando-se filtro de papel nº 42 pré-lavado com solução de KCl 2 mol L^{-1} e água ultrapura. O conteúdo de N-NH_4^+ foi determinado por condutimetria de acordo com Reis et al. (1997). A concentração do N-NH_4^+ presente no extrato de KCl foi realizada por meio de um sistema de microdifusão (SØRENSEN; JENSEN, 1991). O sistema de microdifusão foi composto por um disco de microfibras de vidro (acidificado com $10\text{ }\mu\text{L}$ de KHSO_4 $2,5\text{ mol L}^{-1}$) envolto por película de politetrafluoretileno. Em recipientes de vidro foi adicionada quantidade de extrato de KCl equivalente a $100\text{ }\mu\text{g N-NH}_4^+$ (concentração de N-NH_4^+ determinada previamente), juntamente com um sistema de microdifusão e $0,2\text{ g}$ de MgO calcinado. Para extratos de solo que apresentaram valores abaixo de $100\text{ }\mu\text{g N-NH}_4^+$, foi realizado o método da adição padrão, adicionando-se 1 mL de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (equivalente a $60\text{ }\mu\text{g}$ de N-NH_4^+), atingindo assim o conteúdo de N mínimo para a análise isotópica. Em seguida,

os recipientes foram submetidos à agitação por 48 h, em ambiente escuro. Durante a etapa de agitação, o N-NH₃ (proveniente do N-NH₄⁺ presente na solução em meio alcalino) é difundido através da película de politetrafluoroetileno do sistema de microdifusão, e reage com a solução ácida adicionada ao disco de microfibras de vidro. Assim, o NH₃ é convertido em (NH₄)₂SO₄, ficando retido no sistema de microdifusão.

Após o período de agitação, os sistemas de microdifusão foram retirados das soluções e mantidos em dessecador para secagem. Os filtros foram colocados em cápsulas de estanho, pesados e, levados para determinação da abundância de ¹⁵NH₄⁺ em analisador elementar de N (PDZ Europa ANCA-GSL, Cheshire, GBR) acoplado a um espectrômetro de massas de razão isotópica (PDZ Europa 20-20, PDZ Europa, Cheshire, GBR). A MBN foi calculada pela eq. (2.1), de acordo com Hart et al. (1994):

$$^*A_t = \frac{^*A_0}{\left(1 + \frac{(\theta_t)}{A_0}\right)^{m/\theta}} \quad (2.1)$$

onde ^{*}A_t é o excesso isotópico do reservatório de NH₄⁺ (abundância de ¹⁵N da amostra subtraída do valor de abundância natural de 0,366% de ¹⁵N) no tempo final t₁ (96 h); ^{*}A₀ representa o excesso isotópico do reservatório de NH₄⁺ no tempo inicial t₀ (24 h); t é intervalo tempo em dias (t₁ – t₀); A₀ indica o tamanho do reservatório NH₄⁺ no solo (mg kg⁻¹) no tempo inicial t₀ (24 h); θ = (^{*}A_t - ^{*}A₀)/t; e m se refere à taxa de mineralização bruta (mg N kg⁻¹ dia⁻¹).

2.2.6 Extração de N e parâmetros de produtividade da cultura

Na fase de maturação da cana-de-açúcar foi realizada amostragem de toda a parte aérea da planta em 2 ou 3 m de linha da cultura, em local aleatório nas parcelas controle. A massa de matéria fresca das amostras foi mensurada por meio de pesagens, com posterior trituração das mesmas em triturador forrageiro. Subamostras de colmos, folhas secas e ponteiros foram obtidas para mensuração da massa de matéria seca, sendo secas em estufa de circulação de ar a 65°C, e posteriormente moídas em moinho tipo Wiley. O conteúdo de N total nos tecidos vegetais foi determinado inicialmente pela digestão das amostras vegetais com H₂SO₄ e H₂O₂, seguido de destilação a vapor e titulação com solução de H₂SO₄ 0,025 mol L⁻¹

padronizado (NELSON; SOMMERS, 1973). A extração de N pela cana-de-açúcar nas parcelas controle (ENC), realizada em 19 sítios, foi calculada pelo produto da massa de matéria seca da parte aérea e o teor de N total nos tecidos vegetais. Na sequência, as linhas centrais das parcelas experimentais com aplicação de doses de N foram colhidas manualmente ou mecanicamente (ambas sem queima prévia da cultura), para posterior estimativa da produtividade de colmos. A produtividade de colmos nas parcelas controle (PCC) foi determinada nas parcelas que não receberam N. A produção relativa de colmos (PRC) foi determinada pela divisão da produtividade de colmos no tratamento controle pela máxima produtividade de colmos no local (média da maior produtividade para uma dose específica de N), multiplicado por 100. A dose de N necessária para obtenção de 90% da PRC (DN 90% PRC) foi determinada utilizando-se o modelo de regressão ajustado para a curva de resposta da cana-de-açúcar ao N aplicado em cada sítio.

2.2.7 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS (versão 9.3, 2010, SAS Institute, Cary, NC, EUA). A resposta da cultura (produtividade de colmos) à aplicação de doses de N foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e regressão polinomial, por meio dos procedimentos GLM e REG do SAS respectivamente. Quando o teste F não foi significativo ($P > 0,10$), considerou-se o sítio como não responsivo à aplicação de N, e atribuiu-se valor igual a 100 para o parâmetro PRC. Se significativo ($P \leq 0,10$), os modelos de regressão ajustados foram o linear e quadrático. O modelo foi selecionado de acordo com a significância ($P \leq 0,05$) e análise do coeficiente de determinação (R^2) obtido. Em modelos lineares, a produtividade máxima de colmos representou a maior dose de N utilizada no experimento. Para modelos quadráticos, a dose de N para obtenção da produtividade máxima de colmos foi calculada por meio da derivada primeira da equação polinomial, e atribuição de $y = 0$ na equação linearizada. Após a obtenção do valor da máxima produtividade de colmos, calculou-se a PRC para sítios responsivos ao N. Os valores das DN 90% PRC foram estimados por meio dos modelos de regressão selecionados para cada experimento. Para os métodos químicos, microbiológicos, biológico e isotópico utilizados na predição do N mineralizável do solo, os valores médios das quatro repetições de cada camada (0-20 e 20-40 cm) foram submetidos à ANOVA e

regressão polinomial com os valores médios dos parâmetros de resposta da cana-de-açúcar (PCC, ENC e PRC). A curva de calibração para os testes de solo foi avaliada por meio de análise de regressão polinomial entre os valores da DN 90% PRC e os valores de cada método para cada camada de solo. Os modelos de regressão linear e quadrático foram testados na calibração dos métodos químicos e biológico, sendo que apenas os sítios responsivos ao N foram utilizados neste procedimento. A mesma estratégia foi efetuada para os métodos microbiológicos e isotópico. Também foram calculadas regressões lineares dos métodos com o NTS e COS.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Calibração dos métodos químicos e biológico

O conteúdo de COL variou de 100 a 580 mg kg⁻¹ na camada superficial do solo, enquanto que na subsuperfície os valores situaram-se entre 58 a 430 mg kg⁻¹ (Tabela 2.3). O COL representou de 0,8 a 4,8% (2,9% em média) do COS, considerando-se todos os sítios experimentais. Os valores de COL obtidos no presente estudo são inferiores aos verificados por Culman et al. (2012), que avaliaram o COL em 53 sítios experimentais nos EUA. Contudo, Culman et al. (2012) também verificaram que o COL representou de 2,0 a 4,0% do COS. O COL se correlacionou fortemente com o COS para a camada 0-20 ($R^2 = 0,90$; $P < 0,001$) e 20-40 cm do solo ($R^2 = 0,80$; $P < 0,001$), como também verificado por outros autores (WEIL et al., 2003; CULMAN et al., 2012; LUCAS; WEIL, 2012). De acordo com Culman et al. (2012), é de se esperar fortes correlações entre o COS e o COL, uma vez que a determinação do COS envolve a oxidação total do C orgânico, enquanto que no caso do COL apenas uma fração desse reservatório é oxidada.

O N-IAn apresentou valores variando de 7,0 a 42,7 mg kg⁻¹ na camada de 0-20 cm, e de 3,9 a 32,9 mg kg⁻¹ na camada subjacente (Tabela 2.3). Mariano et al. (2013) reportaram valores semelhantes de N-IAn para solos cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Todavia, os valores do presente estudo estão abaixo dos verificados por autores que quantificaram o N-IAn utilizando solos de regiões temperadas (BUSHONG et al., 2008; SCHOMBERG et al., 2009; McDONALD et al., 2014). O elevado conteúdo de C total e N total em solos de clima temperado explica a ocorrência de valores elevados de N-IAn nos mesmos, dada a correlação positiva

Tabela 2.3 - Métodos químicos e biológico para estimativa do N mineralizável do solo e parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N em 21 sítios experimentais

(continua)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	COL ⁽²⁾	N-IAn ⁽³⁾	N-HKCl ⁽⁴⁾	N-TFB ⁽⁵⁾	N-DVD ⁽⁶⁾	N-ISNT ⁽⁷⁾	PCC ⁽⁸⁾ Mg ha ⁻¹	ENC ⁽⁹⁾ kg ha ⁻¹ N	PRC ⁽¹⁰⁾ %	DN 90% PRC ⁽¹¹⁾ kg ha ⁻¹ N
1	0-20	202	21,8	17,9	17,0	79	73	114	132	94	135
	20-40	107	6,6	14,7	11,8	61	54				
2	0-20	255	16,1	18,6	14,7	70	68	79	93	91	135
	20-40	142	7,9	14,3	12,5	62	74				
3	0-20	488	42,7	33,1	42,1	222	222	76	100	100	0
	20-40	430	32,9	30,0	35,1	186	195				
4	0-20	146	24,3	16,8	12,1	62	64	69	...	77	180
	20-40	79	17,1	18,9	12,6	55	58				
5	0-20	454	35,3	27,8	13,1	203	200	79	...	100	0
	20-40	318	19,4	23,9	30,0	182	175				
6	0-20	449	32,6	18,7	23,3	163	161	89	94	71	162
	20-40	270	15,0	15,4	21,3	145	138				
7	0-20	580	26,3	24,2	29,3	164	182	91	115	100	0
	20-40	295	13,5	20,7	22,7	139	146				
8	0-20	237	24,8	10,9	13,2	80	83	115	84	84	135
	20-40	135	8,3	8,2	9,8	68	62				
9	0-20	186	25,5	15,5	10,9	68	72	108	175	100	0
	20-40	163	22,6	15,8	12,4	58	67				

Tabela 2.3 - Métodos químicos e biológico para estimativa do N mineralizável do solo e parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N em 21 sítios experimentais

(continuação)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	COL ⁽²⁾	N-IAn ⁽³⁾	N-HKCl ⁽⁴⁾	N-TFB ⁽⁵⁾	N-DVD ⁽⁶⁾	N-ISNT ⁽⁷⁾	PCC ⁽⁸⁾ Mg ha ⁻¹	ENC ⁽⁹⁾ kg ha ⁻¹ N	PRC ⁽¹⁰⁾ %	DN 90% PRC ⁽¹¹⁾ kg ha ⁻¹ N
10	0-20	249	26,1	17,4	16,3	87	93	91	137	100	0
	20-40	143	16,2	15,9	13,1	74	84				
11	0-20	327	28,3	23,9	27,9	141	154	64	135	69	162
	20-40	232	15,2	19,5	24,2	137	141				
12	0-20	577	45,1	22,9	26,5	164	180	59	105	79	33
	20-40	363	28,1	15,9	22,5	141	140				
13	0-20	130	7,9	6,4	5,4	38	40	60	52	100	0
	20-40	135	7,9	5,5	4,4	35	42				
14	0-20	176	22,6	6,8	9,8	77	82	85	56	100	0
	20-40	58	3,9	4,8	7,2	62	63				
15	0-20	202	28,1	5,3	11,8	86	108	109	180	100	0
	20-40	104	13,5	3,3	9,8	69	88				
16	0-20	208	23,8	3,8	7,6	64	63	95	167	82	38
	20-40	145	14,4	2,0	6,5	50	58				
17	0-20	230	35,0	5,7	11,0	74	85	84	176	94	180
	20-40	132	19,6	4,9	10,1	63	67				
18	0-20	513	35,7	14,1	20,6	160	174	90	62	100	0
	20-40	335	20,1	10,3	16,2	133	143				

Tabela 2.3 - Métodos químicos e biológico para estimativa do N mineralizável do solo e parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N em 21 sítios experimentais

(conclusão)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	COL ⁽²⁾	N-IAn ⁽³⁾	N-HKCl ⁽⁴⁾	N-TFB ⁽⁵⁾	N-DVD ⁽⁶⁾	N-ISNT ⁽⁷⁾	PCC ⁽⁸⁾	ENC ⁽⁹⁾	PRC ⁽¹⁰⁾	DN 90% PRC ⁽¹¹⁾
		mg kg ⁻¹						Mg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹ N	%	kg ha ⁻¹ N
19	0-20	100	7,0	1,9	3,8	39	52	35	39	100	0
	20-40	89	6,4	1,7	2,9	33	37				
20	0-20	141	16,0	9,9	8,9	62	70	84	152	89	120
	20-40	74	7,3	8,9	7,7	54	73				
21	0-20	147	18,5	8,3	7,3	57	69	93	130	100	0
	20-40	66	5,6	3,0	7,1	45	68				

⁽¹⁾ Descrição das áreas experimentais na Tabela 2.1

⁽²⁾ COL: C orgânico lábil do solo oxidado por KMnO₄; ⁽³⁾ N-IAn: mineralização líquida de N obtida por incubação anaeróbia; ⁽⁴⁾ N-HKCl: N extraível com KCl 2 mol L⁻¹ a quente; ⁽⁵⁾ N-TFB: N extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2; ⁽⁶⁾ N-DVD: N hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH; ⁽⁷⁾ N-ISNT: N hidrolisável por meio de difusão com NaOH; ⁽⁸⁾ PCC: produtividade de colmos nas parcelas controle; ⁽⁹⁾ ENC: extração de N pela cana-de-açúcar nas parcelas controle; ⁽¹⁰⁾ PRC: produção relativa de colmos; ⁽¹¹⁾ DN 90% PRC: dose de N necessária para obtenção de 90% da PRC

... Dado numérico não disponível

do N-IAn com o COS e NTS verificada em alguns trabalhos (SCHOMBERG et al., 2009; McDONALD et al., 2014) e também no presente estudo (resultados não apresentados). O N-NH₄⁺ mineralizado durante incubação anaeróbia de 7 d tem sido reportado amplamente como um bom preditor biológico da disponibilidade líquida de N no solo (SOON; HAQ; ARSHAD, 2007; BUSHONG et al., 2008; McDONALD et al., 2014).

Os valores do método químico N-HKCl situaram-se entre 1,9 a 33,1 mg kg⁻¹, enquanto que na camada de 20-40 cm os valores de N-NH₄⁺ variaram de 1,7 a 30,0 mg kg⁻¹ (Tabela 2.3). Os estudos de Sharifi et al. (2007a), Nyiraneza et al. (2012) e McDonald et al. (2014) apresentaram resultados superiores de N-HKCl, com valores médios de 13,4, 22,0 e 51,1 mg kg⁻¹ respectivamente. O método N-HKCl inclui a quantificação de formas solúveis e trocáveis de N-NH₄⁺, frações do N orgânico solúveis em água, além de compostos nitrogenados originários da ruptura de células microbianas devido ao aquecimento das amostras de solo a 100°C por 4 h (ST. LUCE et al., 2011). No presente estudo, o conteúdo de N-HKCl foi, em média, 1,8 vez maior em relação ao conteúdo de N-NH₄⁺ a frio, considerando-se as duas camadas de solo (0-20 e 20-40 cm) de todos os sítios experimentais. Nyiraneza et al. (2012) e McDonald et al. (2014) observaram aumento de, respectivamente, 2,7 e 13,9 vezes no conteúdo de N-NH₄⁺ após o período de aquecimento supracitado em relação ao conteúdo de N-NH₄⁺ extraído a frio.

O N-TFB variou de 3,8 a 42,1 mg kg⁻¹ e 2,9 a 35,1 mg kg⁻¹ para a camada de 0-20 e 20-40 cm respectivamente (Tabela 2.3). Gianello e Bremner (1988) e Sharifi et al. (2007a), contudo, verificaram valores de N-TFB de maior magnitude. De acordo com Gianello e Bremner (1988), o N extraído pelo método do N-TFB inclui alguns aminoaçúcares e aminoácidos do solo, como a glucosamina, galactosamina, asparagina e glutamina. O N-DVD apresentou valores de 38 a 222 mg kg⁻¹ na camada superficial, e de 35 a 186 mg kg⁻¹ camada de 20-40 cm (Tabela 2.3), situando-se próximo dos verificados por Otto et al. (2013), que avaliaram solos do Brasil cultivados com cana-de-açúcar. Contudo, os resultados de N-DVD do presente estudos são inferiores aos encontrados por diversos autores que utilizaram solos de zonas temperadas (BUSHONG et al., 2008; ROBERTS et al., 2009a, 2011). O N-DVD é um método alternativo e semelhante ao N-ISNT, apresentando forte correlação com este último (ROBERTS et al., 2009a). Neste estudo, a forte correlação entre ambos os métodos foi confirmada na camada de 0-20 ($R^2 = 0,98$; $P < 0,001$) e 20-40 cm do solo

($R^2 = 0,97$; $P < 0,001$). Os valores de N-ISNT variaram de 40 a 222 mg kg⁻¹ para a camada de 0-20 e de 37 a 195 mg kg⁻¹ para a camada de 20-40 cm (Tabela 2.3), e foram semelhantes aos quantificados por Otto et al. (2013). Todavia, os valores são inferiores aos encontrados por diversos autores que utilizaram solos de zonas temperadas (KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001; BARKER et al., 2006; OSTERHAUS; BUNDY; ANDRASKI, 2008; NYIRANEZA et al., 2012). O valor de pH mais baixo da solução extratora empregada no método N-TFB comparativamente ao N-DVD e N-ISNT resulta em menor quantidade de N extraído para o primeiro índice (SHARIFI et al., 2007a).

A PCC variou de 35 a 115 Mg ha⁻¹ (Tabela 2.3), com valor médio de 84 Mg ha⁻¹. Vieira et al. (2010), avaliando doses de N em soqueira de cana-de-açúcar no Brasil, verificou valor de PCC igual a 89 Mg ha⁻¹. A ENC apresentou ampla variação (Tabela 2.3), com valores entre 39 e 180 kg ha⁻¹ N (média de 114 kg ha⁻¹ N). A variação da razão da ENC com a PCC nos 21 experimentos, de 0,7 a 2,1 kg N Mg⁻¹ colmos, explica o resultado obtido. Os valores de ENC durante um ciclo de soqueira obtidos nesse estudo são, em média, inferiores aos verificados por outros autores (FRANCO et al., 2011; MARIANO et al., 2015). A supressão da fertilização nitrogenada nas parcelas controle dos experimentos deste estudo, em comparação aos estudos citados acima, onde houve fornecimento de N, auxilia na explicação do resultado obtido. Depois do K, o N é segundo nutriente mais extraído pela cana-de-açúcar (LEITE, 2011).

Os resultados dos 21 experimentos de curva de resposta à fertilização nitrogenada de soqueiras de cana-de-açúcar indicaram que apenas 48% dos sítios (10 locais) foram responsivos ao N. As demais áreas (11), representando 52% do total, não apresentaram resposta à fertilização nitrogenada (sítios não responsivos ao N). A cana-de-açúcar cultivada no sistema de colheita sem queima, em ciclo de soqueira, apresenta resposta heterogênea quanto ao N, com casos de responsividade (VITTI et al., 2007; VIEIRA et al., 2010; FRANCO et al., 2011; OTTO et al., 2013), mas também de não responsividade ao nutriente (PRADO; PANCELLI, 2008; VIEIRA-MEGDA et al., 2015). Em relação os sítios não responsivos ao N neste estudo, diversas áreas (5, 7, 9, 10, 15 e 21) apresentavam longo histórico de aplicação de resíduos orgânicos da indústria sucroenergética (vinhaça, por exemplo) previamente à instalação dos experimentos de campo (Tabela 2.1), reduzindo desse modo a resposta da cultura à fertilização nitrogenada pelo aporte de C orgânico lábil ao solo, como indicado por Otto et al. (2013). Os sítios 13 e 19, que apresentam textura arenosa (conteúdo de

areia superior a 850 g kg^{-1} para a camada de 0-40 cm), possivelmente possuem baixa capacidade de retenção de água, levando assim à significativa restrição hídrica para a cultura. Com a limitada absorção de água pelas raízes, a absorção de N mineral é diretamente afetada, visto que a assimilação do nutriente pelas plantas ocorre por meio de fluxo de massa (EPSTEIN; BLOOM, 2005). Nos sítios 3, 14 e 18, possíveis condições climáticas adversas (restrição hídrica) durante o período experimental podem auxiliar na explicação para a ausência de resposta ao N. A DN 90% PRC variou amplamente, com valores de 0 a 180 kg ha^{-1} N. Em apenas três sítios (12, 16 e 20) a produtividade de colmos relacionada a doses de N-fertilizante foi ajustada por um modelo quadrático, que indica toxidez das plantas pela aplicação de quantidades mais elevadas do nutriente no solo.

Os valores dos testes químicos e biológico para predição do N mineralizável (COL, N-IAn, N-HKCl, N-TFB, N-DVD e N-ISNT) para cada uma das camadas de solo (0-20 e 20-40 cm) foram relacionados com os parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N. Somente uma correlação positiva entre o método biológico N-IAn na camada de 0-20 cm e a PCC foi verificada (Figura 2.2c), com ajuste dos valores para um modelo linear de regressão, porém apresentando valor de R^2 de 0,25. As incubações aeróbia e anaeróbia para estimativa da mineralização líquida de N são utilizadas amplamente como métodos de referência para calibração de índices visando à predição do N mineralizável do solo (SHARIFI et al., 2007a; SOON; HAQ; ARSHAD, 2007; SCHOMBERG et al., 2009; NYIRANEZA et al., 2012; McDONALD et al., 2014). Contudo, os referidos métodos de incubação apresentam inconsistência na predição de parâmetros de resposta das culturas no campo (STEVENSON; COLE, 1999; KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001; OTTO et al., 2013). Para os demais métodos, não foram observadas correlações com a PCC (Figura 2.2), em ambas as camadas de solo (0-20 e 20-40 cm). Roberts et al. (2011) encontraram correlações positivas entre a produtividade de arroz nas parcelas controle e os métodos N-DVD e N-ISNT para solos argilo-siltosos do Arkansas, EUA. De acordo com Roberts et al. (2011), embora a PCC possa ser utilizada como um parâmetro de resposta de eficiência de correlação do teste de solo, diversos fatores (data de plantio e colheita, condições climáticas, conteúdo de macro e micronutrientes no solo, etc) podem influenciar a produtividade de colmos que não os em questão (teste de solo e dose de N). Desse modo, os valores da PRC representam uma abordagem mais lógica, pelo

Figura 2.2 - Correlação entre a produtividade de colmos nas parcelas controle (PCC) versus C orgânico lábil do solo oxidado por KMnO_4 (COL) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), mineralização líquida de N obtida por incubação anaeróbica (N-IAn) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), N extraível com KCl 2 mol L^{-1} a quente (N-HKCl) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), N extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2 (N-TFB) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), N hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH (N-DVD) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), N hidrolisável por meio de difusão com NaOH (N-ISNT) na camada 0-20 (K) e 20-40 cm (L). Significativo quando $P \leq 0,05$

fato dos resultados terem sido normalizados antes da correlação com os métodos para predição do N mineralizável (ROBERTS et al., 2011).

As regressões lineares entre a ENC e os métodos de predição do N apresentaram significâncias apenas para alguns casos (Figura 2.3). Os métodos N-IAn (Figura 2.3c), N-HKCI (Figuras 2.3e e 2.3f) e N-TFB (Figuras 2.3g e 2.3h) se correlacionaram positivamente com a ENC, para as duas camadas de solo, exceto para o N-IAn, onde apenas a camada 0-20 cm apresentou ajuste significativo para a regressão linear. Os valores de R^2 foram baixos, situando-se entre 0,23 e 0,31. As reduzidas correlações obtidas são devidas à presença solos com elevada amplitude nos valores de ENC, porém com valores semelhantes de C ou N nos diferentes métodos de predição. Roberts et al. (2011) obtiveram correlações positivas entre a ENC e o N-DVD e N-ISNT para todas as camadas de solo avaliadas, mas com valores reduzidos de R^2 ($< 0,50$). Por outro lado, Nyiraneza et al. (2012) obtiveram correlações positivas entre a ENC e diversos índices químicos (N-HKCI, N-ISNT e N-DVD) apenas quando agruparam os solos com base na classe textural (textura fina e média-grosseira).

Não foram verificadas correlações entre a PRC e os métodos químicos para predição do N mineralizável, em nenhuma das camadas de solo (Figura 2.4). Desse modo, não houve uma distinta separação em sítios responsivos e não responsivos ao N aplicado (nível crítico de N no solo). Alguns sítios apresentaram-se responsivos ao N e possuíam elevados valores de C ou N nos diferentes métodos utilizados. Da mesma forma, muitos dos sítios não responsivos apresentaram valores muito baixos de C ou N nos testes de solo. Como mencionado anteriormente, para a calibração da DN 90% PRC por meio dos métodos COL, N-IAn, N-HKCI, N-TFB, N-DVD e N-ISNT, apenas os sítios responsivos ao N ($n = 10$) foram incluídos nesse procedimento estatístico. A ocorrência de correlações negativas entre os métodos preditores e a DN 90% PRC (resultados ajustados a modelos lineares decrescentes ou quadráticos com ponto crítico mínimo) é necessária para atestar a calibração de doses de N à serem aplicadas. Todavia, não foram observadas correlações dessa natureza entre o referido parâmetro de resposta da cultura e os testes de solo (Figura 2.5), não sendo possível calibrar nenhum dos métodos propostos. Em nenhum caso a dispersão dos valores da DN 90% PRC obedeceu à tendência linear ou quadrática descrita acima.

Figura 2.3 - Correlação entre a extração de N pela cana-de-açúcar nas parcelas controle (ENC) versus C orgânico lábil do solo oxidado por KMnO_4 (COL) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), mineralização líquida de N obtida por incubação anaeróbia (N-IAn) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), N extraível com KCl 2 mol L⁻¹ a quente (N-HKCl) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), N extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2 (N-TFB) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), N hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH (N-DVD) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), N hidrolisável por meio de difusão com NaOH (N-ISNT) na camada 0-20 (K) e 20-40 cm (L). Significativo quando $P \leq 0,05$

Figura 2.4 - Correlação entre a produção relativa de colmos (PRC) *versus* C orgânico lábil do solo oxidado por KMnO_4 (COL) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), mineralização líquida de N obtida por incubação anaeróbica (N-IAn) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), N extraível com KCl 2 mol L⁻¹ a quente (N-HKCl) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), N extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2 (N-TFB) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), N hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH (N-DVD) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), N hidrolisável por meio de difusão com NaOH (N-ISNT) na camada 0-20 (K) e 20-40 cm (L). Significativo quando $P \leq 0,05$

Figura 2.5 - Correlação entre a dose de N necessária para obtenção de 90% da produção relativa de colmos (DN 90% PRC) versus C orgânico lábil do solo oxidado por KMnO_4 (COL) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), mineralização líquida de N obtida por incubação anaeróbica (N-IAn) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), N extraível com KCl 2 mol L^{-1} a quente (N-HKCl) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), N extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2 (N-TFB) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), N hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH (N-DVD) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), N hidrolisável por meio de difusão com NaOH (N-ISNT) na camada 0-20 (K) e 20-40 cm (L). Significativo quando $P \leq 0,05$

Correlações dos métodos preditores com os parâmetros de resposta da cultura, categorizando-se os sítios experimentais em subgrupos baseados no manejo de resíduos e fertilizantes orgânicos, matéria orgânica (representada pelo COS no presente estudo) e drenagem (KLAPWYK; KETTERINGS; 2006; MULVANEY; KHAN; ELLSWORTH, 2006; WILLIAMS et al., 2007) foram tentadas, porém sem melhorias nas correlações entre os métodos e a resposta ao N pela cana-de-açúcar (resultados não apresentados). A categorização em grupos de solos com base na classe textural proposta por Nyiraneza et al. (2012) também foi avaliada. Desse modo, os solos foram classificados como de textura média-grosseira (argila $\leq 350 \text{ g kg}^{-1}$; $n = 13$; sítios 2, 4, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20 e 21) e fina (argila $> 350 \text{ g kg}^{-1}$; $n = 8$; sítios 1, 3, 5, 6, 7, 11, 12 e 18). Com essa categorização, foram verificadas correlações apenas entre a PCC e os índices COL, N-IAn, N-DVD e N-ISNT para o grupo de solos pertencente à classe de textura média-grosseira, com valores do R^2 variando de 0,39 a 0,58 (resultados não apresentados). Todavia, a ausência de correlações de ambos os grupos de solos com os parâmetros PRC e DN 90% PRC se manteve, não apresentando, assim, vantagens reais no uso dessa categorização em relação ao conjunto total de solos.

A calibração de testes de solo para a predição do N mineralizável por meio de parâmetros de resposta de culturas no campo foi intensificada significativamente após a publicação do estudo de Khan, Mulvaney e Hoef (2001) sobre o método N-ISNT. A calibração de métodos de predição do N era baseada, em sua maioria, por meio de incubações aeróbias e anaeróbias de solo (KEENEY; BREMNER, 1966; GIANELLO; BREMNER, 1986; WANG et al., 2001), embora ainda sejam utilizados com frequência (SHARIFI et al., 2007a, 2007b; SCHOMBERG et al., 2009; NYIRANEZA et al., 2012). Diversos autores obtiveram resultados satisfatórios para a predição do N mineralizável do solo por meio dos métodos N-IAn, N-HKCl e N-TFB quando estes foram correlacionados com resultados de incubações de solo (GIANELLO; BREMNER, 1986; GIANELLO; BREMNER, 1988; JALIL et al., 1996; SOON; HQ; ARSHAD, 2007; SCHOMBERG et al., 2009; MARIANO et al., 2013) e parâmetros de resposta de culturas (CANTARELLA; MATTOS JUNIOR; RAIJ, 1994; NAYYAR; SINGH; SINGH, 2006). Hong, Fox e Piekielek (1990), contudo, verificaram correlações fracas entre os métodos N-HKCl e N-TFB com a extração de N por plantas de milho em parcelas controle. Não foram encontrados estudos envolvendo a avaliação do COL [como metodologia proposta por Culman et al. (2012)] como preditor da mineralização de N

no solo. Em relação aos métodos N-DVD e N-ISNT, existe grande heterogeneidade nos resultados de calibração dos mesmos, com casos de sucesso (KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001; KLAPWYK; KETTERINGS, 2006; MULVANEY; KHAN; ELLSWORTH, 2006; WILLIAMS et al., 2007; ROBERTS et al., 2011; ROBERTS et al., 2013) e insucesso (BARKER et al., 2006; LABOSKI et al., 2008; OSTERHAUS; BUNDY; ANDRASKI, 2008; SPARGO et al., 2009) na predição da resposta do arroz e milho ao N nos EUA. Para a cana-de-açúcar, Otto et al. (2013), avaliando cinco sítios com curva de resposta ao N, encontraram resultados satisfatórios para a identificação de sítios e responsivos e não responsivos ao N por meio dos índices N-DVD e N-ISNT.

A ausência de correlação dos testes de solo com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N neste estudo pode ser explicada por alguns fatores. Os métodos químicos e incubações de solo (aeróbias e anaeróbias) para predição do N mineralizável geralmente quantificam frações do N orgânico que podem vir a ser mineralizadas no campo (KEENEY; BREMNER, 1966; STANFORD; SMITH, 1972; KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001), desde que condições adequadas de clima e propriedades do solo ocorram (temperatura do ar e do solo, umidade do solo e precipitações durante o ciclo de cultivo). A grande amplitude de variação das condições climáticas entre os sítios experimentais e anos, o manejo de resíduos orgânicos e a fertilidade do solo limitada podem ter influenciado o potencial de mineralização do N no campo e os parâmetros de resposta da cana-de-açúcar, dificultando assim a predição do N mineralizável pelos testes de solo, como constatado por outros autores (BARKER et al., 2006; MULVANEY; KHAN; ELLSWORTH, 2006; SPARGO et al., 2009). De acordo com Barker et al. (2006), as calibrações de testes de solo para predição do N mineralizável deveriam incluir a resposta da cultura ao N nos mesmo sítios em múltiplos anos, para consideração da variação climática nos diferentes solos. Utilizando essa abordagem no presente estudo, é possível analisar superficialmente cinco sítios (8, 9, 10, 12 e 13) que foram reconduzidos simultaneamente na safra seguinte (14, 16, 15, 18 e 19). Os valores de PRC nesses locais não apresentaram uma tendência lógica nas safras avaliadas, sendo que em dois locais (10 e 13) a cana-de-açúcar se manteve não responsiva ao N; em outros dois (8 e 12) a cultura passou de responsiva para não responsiva, enquanto que na área restante (9) a cana-de-açúcar se tornou responsiva ao nutriente (Tabela 2.3). As variações climáticas, sobretudo, disponibilidade de água no solo, entre os locais em um mesmo ano talvez possam explicar os resultados obtidos. Como

exemplo, Roberts et al. (2011) calibraram com sucesso o N-DVD com parâmetros de resposta do arroz cultivado em solos inundados nos EUA, demonstrando que a disponibilidade hídrica pode desempenhar papel fundamental no fornecimento de N às culturas pelo solo.

A ocorrência de fatores limitantes que não o N nos experimentos de campo deve ser considerada. Em alguns sítios experimentais foi verificada média à elevada disponibilidade de N no solo por meio dos métodos de predição, porém com valores relativamente baixos de PCC e ENC. Embora não tenham sido diagnosticados fatores que pudessem limitar a cultura nos 21 sítios, problemas relacionados à baixa disponibilidade hídrica no solo, restrições químicas e físicas do solo, deficiências nutricionais, competição com plantas invasoras e ataques de pragas e doenças podem ter ocorrido e conseqüentemente limitado o crescimento da cana-de-açúcar. O estresse causado por fatores limitantes pode levar à perda de N pela parte aérea da cultura, que ocorre quando a concentração interna de N-NH_4^+ atinge níveis tóxicos na planta, resultando na emissão de NH_3 pelos estômatos nas folhas (FARQUHAR et al., 1980) e ausência de responsividade ao N aplicado (LEITE, 2011). Caso tenham ocorrido limitações não relacionadas ao N nos sítios, as correlações dos testes de solo com os parâmetros PCC, ENC e PRC podem ter sido sensivelmente prejudicadas.

Outro fator que pode ter influenciado no insucesso das correlações e calibrações dos métodos para predição do N mineralizável do solo diz respeito à ocorrência de fixação biológica de N (FBN) em cana-de-açúcar. Diversos estudos no Brasil relataram a identificação de bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia* capazes de fixar o N_2 atmosférico associadas às raízes e tecidos internos da cana-de-açúcar (URQUIAGA; CRUZ; BODDEY, 1992; BODDEY et al., 2003; URQUIAGA et al., 2012). Entretanto, o efeito de promoção de crescimento das plantas pelas bactérias endofíticas diazotróficas (BASHAN, HOLGUIN; BASHAN, 2004; SOMERS, VANDERLEYDEN; SNIRIVASAN, 2004) pode ser mais atuante que a própria FBN em alguns casos, como reportado por Schultz et al. (2014). De acordo com Urquiaga et al. (2012), as variedades comerciais de cana-de-açúcar disponíveis no Brasil são capazes de obter, ao menos, $40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ por meio da FBN por bactérias diazotróficas. A evidência indireta da FBN em cana-de-açúcar diz respeito à elevada produtividade de colmos em locais onde a cultura é cultivada sucessivamente e as doses de N aplicadas são baixas (BODDEY et al., 2003). Contudo, a eficiência da FBN tem grande dependência da variedade de cana-de-açúcar escolhida e é

favorecida por condições em que haja suprimento adequado de água e molibdênio no solo (BODDEY et al., 2003). Assim, é possível afirmar que em alguns sítios experimentais do presente estudo a FBN e/ou a promoção de crescimento das plantas possa ter ocorrido com maior intensidade em relação a outros locais, levando à obtenção de maiores valores de ENC e até mesmo à ausência de resposta ao N pela cana-de-açúcar pela ação dos microrganismos. Assim, a calibração dos testes de solo pode ter sido afetada, pelo fato dos mesmos não contemplarem a quantificação da FBN ou a promoção de crescimento pelas bactérias diazotróficas.

Todos os testes de solo para predição do N mineralizável se correlacionaram positivamente com o NTS, para as duas camadas de solo (0-20 e 20-40 cm), com valores de R^2 variando de 0,28 a 0,98 (Tabela 2.4). Os métodos COL, N-IAn e N-HKCl apresentaram correlações fracas a moderadas com o NTS. Contudo, o N-DVD e N-ISNT, que empregam extrator álcali forte para quantificação do N orgânico hidrolisado, apresentaram forte correlação com o NTS, como já verificado por outros autores (BARKER et al., 2006; OSTERHAUS; BUNDY; ANDRASKI, 2008; SPARGO et al., 2009). Com base nos resultados obtidos, Osterhaus et al. (2008) afirmaram que o N-ISNT extrai uma fração constante do NTS, reduzindo assim a sensibilidade do método em identificar sítios responsivos e não responsivos ao N. Kwon, Hudson e Mulvaney (2009), contudo, demonstraram que o N-ISNT é hábil em quantificar diferentes frações

Tabela 2.4 – Modelos⁽¹⁾ de regressão linear para a relação entre o N total do solo (NTS) com métodos químicos e biológico para a predição do N mineralizável nas camadas de 0-20 e 20-40 cm do solo ($n = 21$)

Relação	NTS na camada de 0-20 cm				NTS na camada de 20-40 cm			
	Equação	R^2	$P^{(8)}$		Equação	R^2	$P^{(8)}$	
COL ⁽²⁾	$y = 0,0024x + 0,014$	0,90	< 0,0001		$y = 0,0025x + 0,079$	0,63	< 0,0001	
N-IAn ⁽³⁾	$y = 0,0196x + 0,093$	0,65	< 0,0001		$y = 0,0168x + 0,198$	0,30	0,0106	
N-HKCl ⁽⁴⁾	$y = 0,0243x + 0,216$	0,48	0,0005		$y = 0,0151x + 0,252$	0,28	0,0126	
N-TFB ⁽⁵⁾	$y = 0,0342x + 0,115$	0,79	< 0,0001		$y = 0,0305x + 0,109$	0,76	< 0,0001	
N-DVD ⁽⁶⁾	$y = 0,0072x - 0,015$	0,98	< 0,0001		$y = 0,0068x - 0,006$	0,97	< 0,0001	
N-ISNT ⁽⁷⁾	$y = 0,0069x - 0,042$	0,94	< 0,0001		$y = 0,0066x - 0,039$	0,89	< 0,0001	

⁽¹⁾ Equações são $y = \text{inclinação} (x) + \text{intercepto}$, onde x é o valor do método para predição do N mineralizável do solo, enquanto que a inclinação e o intercepto foram estimados por regressão linear

⁽²⁾ COL: C orgânico lábil do solo oxidado por KMnO_4 ; ⁽³⁾ N-IAn: mineralização líquida de N obtida por incubação anaeróbia; ⁽⁴⁾ N-HKCl: N extraível com KCl 2 mol L^{-1} a quente; ⁽⁵⁾ N-TFB: N extraível com tampão fosfato-borato a pH 11,2; ⁽⁶⁾ N-DVD: N hidrolisável por meio de destilação direta com NaOH ;

⁽⁷⁾ N-ISNT: N hidrolisável por meio de difusão com NaOH

⁽⁸⁾ Significativo quando $P \leq 0,05$

do N orgânico do solo, sobretudo aminoaçúcares bacterianos e algumas amidas.

Neste estudo, o método N-DVD extraiu, em média, $14,1 \pm 0,2$ (média $\pm$ erro padrão da média) e $12,0 \pm 0,2\%$ do NTS para as camadas de 0-20 e 20-40 cm respectivamente. O preditor N-ISNT, por sua vez, extraiu $15,2 \pm 0,4$ e $13,3 \pm 0,5\%$ do NTS as camadas de 0-20 e 20-40 cm respectivamente. Similarmente, outros estudos relataram que o N-ISNT extraiu de 12,6 a 16,3 % do NTS para a camada superficial do solo (BARKER et al., 2006; OSTERHAUS; BUNDY; ANDRASKI, 2008; SPARGO et al., 2009). Por outro lado, Roberts et al. (2009b) verificaram que o N-DVD extraiu de 11 a 38% do NTS, sem manutenção dos valores da razão N-DVD/NTS entre camadas do solo. No presente estudo, contudo, pouca variação das razões N-ISNT/NTS e N-DVD/NTS foram verificadas entre as camadas de solo avaliadas.

2.3.2 Calibração dos métodos microbiológicos e isotópico

São escassos os trabalhos disponíveis na literatura envolvendo a utilização de indicadores microbiológicos para a predição do N mineralizável (SHARIFI et al., 2007a; YU et al., 2011), sendo a grande maioria composta exclusivamente por métodos biológicos (incubações de solo) e químicos de laboratório (ST. LUCE et al., 2011). A principal desvantagem na utilização de métodos microbiológicos se dá pela necessidade de uso de amostras frescas de solo (recém-amostradas e posteriormente preservadas em baixas temperaturas) para a determinação da RB, RBi e do C-BMS. As etapas de secagem ao ar, peneiramento e posterior reumedecimento podem acarretar em alterações nas propriedades bioquímicas do solo, afetando diretamente a biomassa microbiana, fração viva do COS (FRANZLUEBBERS et al., 2000; DE NOBILI; CONTIN; BROOKES, 2006). Para a quantificação da MBN, contudo, a utilização de amostras de solo pré-processadas (secas ao ar, peneiradas e reumedecidas) é admitida. Haney et al. (2004) reportaram que amostras de solo secas ao ar (40°C) e posteriormente reumedecidas apresentaram forte correlação com amostras frescas de solo no que diz respeito à mineralização de N durante 24 d de incubação.

Os valores de RB variaram de 8,8 a 56,0 $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para a camada superficial, enquanto na camada de 20-40 cm do solo, os valores situaram-se entre 5,3 a 27,1 $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 2.5). A RB na camada de 0-20 cm foi 1,8 vezes superior, em média, em relação à camada de 20-40 cm. Resultados semelhantes para

Tabela 2.5 - Métodos microbiológicos e isotópico para estimativa do N mineralizável de 14 solos cultivados com cana-de-açúcar

(continua)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	RB ⁽²⁾ mg C-CO ₂ kg ⁻¹ dia ⁻¹	RBI ⁽³⁾	C-BMS ⁽⁴⁾ mg C-BMS kg ⁻¹	qCO _{2i} ⁽⁵⁾ mg C-CO ₂ mg ⁻¹ C-BMS dia ⁻¹	qMic ⁽⁶⁾ %	MBN ⁽⁷⁾ mg N kg ⁻¹ dia ⁻¹
8	0-20	25,8	991	115	9,04	1,6	1,23
	20-40	14,5	690	108	6,62	2,0	...
9	0-20	24,2	564	375	1,57	5,7	2,05
	20-40	13,7	515	375	1,46	7,2	...
10	0-20	30,2	787	390	2,04	6,0	1,78
	20-40	15,5	714	413	1,74	8,0	...
11	0-20	31,5	1240	378	3,33	2,8	1,15
	20-40	15,4	903	445	2,07	4,5	...
12	0-20	56,0	1314	525	2,51	3,6	1,01
	20-40	27,1	1024	515	2,09	4,3	...
13	0-20	13,5	529	108	5,63	2,8	0,66
	20-40	9,7	386	88	5,51	2,3	...
14	0-20	22,6	876	248	3,57	3,7	4,86
	20-40	12,2	705	286	2,57	4,6	...
15	0-20	31,6	647	240	2,71	3,5	0,55
	20-40	11,4	464	158	3,15	3,1	...
16	0-20	19,7	503	158	3,23	3,1	1,67
	20-40	15,3	388	146	2,76	3,0	...

Tabela 2.5 - Métodos microbiológicos e isotópico para estimativa do N mineralizável de 14 solos cultivados com cana-de-açúcar

(conclusão)

Área ⁽¹⁾	Prof. cm	RB ⁽²⁾ mg C-CO ₂ kg ⁻¹ dia ⁻¹	RBi ⁽³⁾	C-BMS ⁽⁴⁾ mg C-BMS kg ⁻¹	qCO _{2i} ⁽⁵⁾ mg C-CO ₂ mg ⁻¹ C-BMS dia ⁻¹	qMic ⁽⁶⁾ %	MBN ⁽⁷⁾ mg N kg ⁻¹ dia ⁻¹
17	0-20	17,7	879	212	4,25	3,5	0,51
	20-40	8,6	678	238	2,94	5,4	...
18	0-20	23,7	1019	473	2,16	3,5	1,34
	20-40	19,0	789	448	1,77	4,2	...
19	0-20	9,2	580	143	4,17	3,7	0,00
	20-40	7,8	553	160	3,55	4,7	...
20	0-20	8,8	769	140	6,62	3,3	0,51
	20-40	5,3	708	120	6,17	3,5	...
21	0-20	12,1	1980	140	14,52	3,1	0,59
	20-40	5,5	614	118	5,73	3,6	...

⁽¹⁾ Descrição das áreas experimentais na Tabela 2.1⁽²⁾ RB: respiração basal do solo; ⁽³⁾ RBi: respiração basal induzida do solo; ⁽⁴⁾ C-BMS: C da biomassa microbiana do solo; ⁽⁵⁾ qCO_{2i}: quociente metabólico induzido do solo; ⁽⁶⁾ qMic: quociente microbiano do solo; ⁽⁷⁾ MBN: mineralização bruta de N no solo

... Dado numérico não disponível

solos cultivados com cana-de-açúcar foram reportados por outros autores (GRAHAM; HAYNES, 2006; SUMAN et al., 2006; ROBERTSON; THORBURN, 2007). A R_{Bi} apresentou a mesma tendência da R_B, com valores 1,3 vezes maiores para a camada superficial em relação à subjacente do solo. A R_{Bi} na camada 0-20 cm variou de 503 a 1980 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹, enquanto que na camada de 20-40 cm os valores situaram-se entre 388 e 1024 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹ (Tabela 2.5). Em média, a R_{Bi} aumentou em 38 e 50 vezes a evolução de C-CO₂ pela adição de glicose ao solo, para as camadas de 0-20 e 20-40 cm respectivamente. A vigorosa resposta dos microrganismos à adição de glicose indica que a comunidade microbiana do solo pode ser ativada rapidamente em caso de disponibilidade de uma fonte de C lábil (BABUJIA et al., 2010). Os autores supracitados também afirmaram que o estudo da razão R_{Bi}/R_B é útil como um bioindicador da qualidade do solo, atuando como um “índice de fome”. Destaque deve ser dado para a camada de 0-20 cm de solo do sítio 21, em que os valores de R_B saltaram de 12,1 para 1980 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹ com a adição de glicose (R_{Bi}), resultando em um aumento de 164 vezes no fluxo de C-CO₂ do solo. Neste sítio experimental, alguns dias antes da amostragem de solo, houve a aplicação de vinhaça, um subproduto da indústria do etanol que contém quantidades apreciáveis de matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos, além dos nutrientes K, Ca, Mg e S (CRISTOFOLETTI et al., 2013). O valor relativamente baixo de R_B no solo 21 indica que o conteúdo de C orgânico solúvel (glicerol, por exemplo) inicialmente presente na vinhaça foi rapidamente utilizado pelos microrganismos do solo, como verificado por Oliveira et al. (2013). Associada à presença dos nutrientes na vinhaça (K, Ca, Mg e S), a adição de glicose para determinação da R_{Bi} atuou como uma nova fonte de C lábil necessária para o crescimento da comunidade microbiana, resultando em maior emissão de C-CO₂ do solo.

O C-BMS representa a fração viva da matéria orgânica do solo, constituída por arqueias, bactérias e eucariotos, excluindo-se raízes e animais menores que 5 x 10³ µm³ (JENKINSON; LADD, 1981). O C-BMS situou-se entre 108 e 525 mg C-BMS kg⁻¹ na camada de 0-20 cm, e de 88 a 515 mg C-BMS kg⁻¹ na camada de 20-40 cm (Tabela 2.5). Estes valores são semelhantes aos verificados por outros autores que também quantificaram o C-BMS por meio da fumigação-extração com clorofórmio (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987) em solos cultivados com cana-de-açúcar em sistema de colheita sem queima no Brasil (GALDOS; CERRI; CERRI, 2009; SILVA et al., 2012), Austrália (ROBERTSON; THORBURN, 2007) e África do Sul (GRAHAM;

HAYNES; MEYER, 2002). Ao contrário da RB e RBi, o C-BMS não apresentou diferenças consideráveis entre as camadas de solo, com valores médios de 260 e 258 mg C-BMS kg⁻¹ para a camada de 0-20 e 20-40 cm respectivamente.

O qCO_{2i} , que representa o quociente metabólico induzido entre a RBi e C-BMS, tem sido utilizado originalmente (como um quociente da razão entre a RB e C-BMS – qCO_2) como um bioindicador na avaliação de solos sob efeitos de preparo, gradientes de poluição, efeitos de temperatura e acidificação (ANDERSON; DOMSCH, 1990; 1991; OHTONEN, 1994; YAN; YAN; CAMPBELL, 2003), embora existam críticas ao seu uso como bioindicador de distúrbios e estresse no sistema (WARDLE; GHANI, 1995). Neste estudo, quantificou-se apenas o qCO_{2i} , pois as mesmas amostras de solo em que determinou-se a RB receberam adição de glicose para posterior determinação da RBi e C-BMS. Para a camada de 0-20 cm, o qCO_{2i} variou de 1,57 a 14,52 mg C-CO₂ mg⁻¹ C-BMS dia⁻¹, enquanto que na camada de 20-40 cm os valores variaram de 1,46 a 6,62 mg C-CO₂ mg⁻¹ C-BMS dia⁻¹ (Tabela 2.5). No entanto, não foram encontrados resultados publicados avaliando o qCO_{2i} em solos cultivados com cana-de-açúcar, impossibilitando a comparação de resultados. No sítio 21, assim como verificado para a RBi, o qCO_{2i} apresentou elevado valor (14,52 C-CO₂ mg⁻¹ C-BMS dia⁻¹), atribuído possivelmente pela aplicação recente de vinhaça ao solo, como discorrido anteriormente. Maiores valores de qCO_{2i} indicam maiores perdas de C no sistema na forma de CO₂ por unidade de C microbiano, enquanto que solos com valores mais baixos de qCO_{2i} indicaram sistemas mais conservativos, com menores perdas de C e mais sustentáveis (INSAM; DOMSCH, 1988).

O $qMic$ variou de 1,6 a 6,0 e de 2,0 a 8,0%, respectivamente, para as camadas de 0-20 e 20-40 cm do solo (Tabela 2.5). Os valores de $qMic$ obtidos neste estudo, especialmente nos sítios 9 e 10, são consideravelmente maiores que os usualmente reportados na literatura para solos cultivados com cana-de-açúcar sem queima, que situam-se entre 0,9 a 3,3% do COS (GRAHAM; HAYNES, MEYER, 2002; SUMAN et al., 2006; GALDOS et al., 2009; PÔRTO et al., 2009). Kaschuk, Alberton e Hungria (2010) afirmaram que a prática da colheita sem queima pode aumentar o conteúdo do C-BMS em relação a solos onde a colheita com queima ainda é efetuada, pelo aporte de 13 a 20 Mg ha⁻¹ ano⁻¹ de material vegetal (base seca). A adoção há vários anos do sistema de colheita sem queima em grande parte dos sítios deste estudo, associada à aplicação em longo prazo de resíduos orgânicos (vinhaça, torta de filtro, compostos, por exemplo), pode ter aumentado o conteúdo de C-BMS (ROBERTSON;

THORBURN, 2007; GALDOS et al., 2009; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010), resultando em consequente aumento do q_{Mic} , visto que este índice provém da razão entre o C-BMS e o COS. Pequenos incrementos nos valores do C-BMS devido à variação sazonal (sítios onde houve reaplicação dos tratamentos e amostragem de solo em safra posterior), como verificado por Robertson e Thorburn (2007), também podem explicar os altos valores de q_{Mic} verificados neste estudo.

Os valores da MBN variaram de 0,00 a 4,86 mg N kg⁻¹ dia⁻¹ para a camada superficial (0-20 cm) dos 21 sítios experimentais (Tabela 2.5). Valores semelhantes foram observados por outros autores que determinaram a MBN em solos cultivados com cana-de-açúcar no Brasil (MORAES, 2012; OTTO, 2012) e em solos de regiões tropicais e subtropicais com diferentes ocupações (PILBEAM; WARREN, 1995; MURPHY; FILLERY; SPARLING, 1998; FLAVEL et al., 2005; VIDELA et al., 2005). Todavia, os resultados deste estudo são, em média, inferiores aos verificados para solos de zonas temperadas cultivados com gramíneas e sob florestas (ZAMAN et al., 2004; STE-MARIE; HAULE, 2006). O valor da MBN encontrado no sítio 14 (4,86 mg N kg⁻¹ dia⁻¹) foi extremamente elevado quando comparado aos demais locais de estudo, e até mesmo em relação à amostragem de solo realizada na safra anterior no mesmo local (sítio 8). Condições climáticas favoráveis no ocorridas previamente à amostragem de solo (umidade do solo e temperatura, por exemplo) e influência da palha de cana-de-açúcar na ciclagem do N podem explicar o estímulo à mineralização bruta nesse sítio experimental. Para fins de calibração da MBN com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar no campo, o sítio 14 foi mantido na análise de regressão polinomial.

Nos sítios que foram utilizados para a calibração dos métodos microbiológicos e isotópico (solos 8 a 21), a PCC variou de 35 a 115 Mg ha⁻¹, com valor médio de 84 Mg ha⁻¹, enquanto que os valores de ENC variaram de 39 e 180 kg ha⁻¹ N (média de 118 kg ha⁻¹ N) (Tabela 2.3). Apenas 43% dos experimentos com curva de resposta da cana-de-açúcar ao N apresentaram responsividade ao nutriente, enquanto que os demais sítios (57% do total) não foram responsivos. A ausência de resposta para alguns casos está relacionada ao uso em longo prazo de resíduos orgânicos provenientes da indústria sucroenergética (sítios 9, 10, 15 e 21), enquanto que nos sítios 13 e 19 a restrição hídrica devida a fatores intrínsecos do solo (alto conteúdo de areia e consequente baixa capacidade de armazenamento de água) possivelmente explique os resultados encontrados. Como mencionado anteriormente, as restrições

hídricas devido à baixa frequência pluviométrica podem ter comprometido a resposta ao N nos locais 14 e 18. Assim como na calibração dos preditores químicos e biológicos, a DN 90% PRC variou de 0 a 180 kg ha⁻¹ N.

Os resultados da RB, RBi, C-BMS, qCO_{2i} , $qMic$ e MBN para predição do N mineralizável do solo nas camadas superficial e subsuperficial foram relacionados com parâmetros de resposta (PCC, ENC, PRC e DN 90% PRC) da cana-de-açúcar ao N. Não foram observadas correlações entre qualquer método de predição da mineralização de N e a PCC (Figura 2.6). Os métodos avaliados não foram eficazes na separação de sítios responsivos e não responsivos ao N, pela impossibilidade de ajuste dos valores obtidos em modelos de regressão lineares ou quadráticos. Muitos sítios experimentais apresentaram baixos valores obtidos nas determinações laboratoriais para a predição do N mineralizável (coordenada horizontal), mas ao mesmo tempo exibiram elevados valores de PCC (coordenada vertical). O mesmo padrão de comportamento foi verificado para a relação entre os métodos de predição e a ENC quantificada nos 14 experimentos (Figura 2.7).

Não foram observadas correlações entre a PRC e os métodos microbiológicos e isotópico para ambas as camadas de solo (0-20 e 20-40 cm) (Figura 2.8). Alguns sítios apresentaram-se altamente responsivos ao N e exibiram valores elevados dos métodos para predição da mineralização de N, enquanto sítios pouco responsivos ao nutriente apresentaram valores reduzidos dos testes de solo, comprometendo assim o ajuste dos valores a modelos de regressão. Da mesma forma, não foram observadas correlações negativas entre a DN 90% PRC e os testes de solo (Figura 2.9), não sendo possível calibrar nenhum dos métodos propostos. Em calibrações bem sucedidas de testes de solo (WILLIAMS et al., 2007; ROBERTS et al., 2011), sítios que exibem baixos valores de um determinado método de predição (locais altamente responsivos ao N) também devem apresentar valor reduzido de um parâmetro de resposta da cultura (PCC, ENC ou PRC). Por outro lado, sítios pouco ou não responsivos ao N devem apresentar elevados valores do parâmetro de resposta da cultura em questão.

Como realizado na tentativa de calibração dos métodos químicos e biológico, correlações dos métodos microbiológicos e isotópico com os parâmetros de resposta da cana-de-açúcar categorizando os sítios experimentais em subgrupos baseados no manejo de resíduos e fertilizantes orgânicos, conteúdo de matéria orgânica e classe textural do solo (KLAPWYK; KETTERINGS; 2006; MULVANEY, KHAN; ELLSWORTH, 2006; NYIRANEZA et al., 2012) também foram verificadas, porém sem

Figura 2.6 - Correlação entre a produtividade de colmos nas parcelas controle (PCC) *versus* respiração basal (RB) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), respiração basal induzida (RB_i) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), C da biomassa microbiana do solo (C-BMS) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), quociente metabólico (qCO_{2i}) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), quociente microbiano (qMic) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), mineralização bruta de N (MBN) na camada 0-20 cm (K). Significativo quando $P \leq 0,05$

Figura 2.7 - Correlação entre a extração de N pela cana-de-açúcar nas parcelas controle (ENC) *versus* respiração basal (RB) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), respiração basal induzida (RB_i) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), C da biomassa microbiana do solo (C-BMS) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), quociente metabólico (qCO₂) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), quociente microbiano (qMic) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), mineralização bruta de N (MBN) na camada 0-20 cm (K). Significativo quando $P \leq 0,05$

Figura 2.8 - Correlação entre a produção relativa de colmos (PRC) *versus* respiração basal (RB) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), respiração basal induzida (RBi) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), C da biomassa microbiana do solo (C-BMS) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), quociente metabólico (qCO₂) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), quociente microbiano (qMic) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), mineralização bruta de N (MBN) na camada 0-20 cm (K). Significativo quando $P \leq 0,05$

Figura 2.9 - Correlação entre a dose de N necessária para obtenção de 90% da produção relativa de colmos (DN 90% PRC) *versus* respiração basal (RB) na camada 0-20 (A) e 20-40 cm (B), respiração basal induzida (Rbi) na camada 0-20 (C) e 20-40 cm (D), C da biomassa microbiana do solo (C-BMS) na camada 0-20 (E) e 20-40 cm (F), quociente metabólico (qCO_2) na camada 0-20 (G) e 20-40 cm (H), quociente microbiano ($qMic$) na camada 0-20 (I) e 20-40 cm (J), mineralização bruta de N (MBN) na camada 0-20 cm (K). Significativo quando $P \leq 0,05$

melhorias nas correlações (resultados não apresentados). A categorização dos solos agrupados de acordo com a safra agrícola da cultura nos experimentos (2011/2012 e 2012/2013) também não resultou em correlações significativas para qualquer método neste estudo (resultados não apresentados). Por outro lado, qualquer categorização em subgrupos resultaria em menor robustez das correlações e calibrações, devido ao reduzido número de observações, originalmente limitado ($n = 14$).

São escassos os trabalhos disponíveis na literatura que relacionaram métodos microbiológicos e isotópicos como preditores do N mineralizável com parâmetros de resposta de culturas no campo (ST. LUCE et al., 2011), dificultando a comparação dos resultados obtidos no presente estudo. Sharifi et al. (2007b), utilizando a extração de N pela batata (*Solanum tuberosum* L.) e a produção relativa da cultura como parâmetros de resposta no campo, verificaram que o C-BMS não se relacionou com os parâmetros de calibração supracitados. Adicionalmente, Sharifi et al. (2007a) também reportaram que o C-BMS não se correlacionou com o N mineralizável obtido por meio de incubação aeróbia de longa duração. Outros autores, contudo, verificaram que a evolução de C-CO₂ durante incubação laboratorial de 3 d apresentou forte correlação com o N mineralizado proveniente de incubações aeróbias e anaeróbias de laboratório (FRANZLUEBBERS et al., 2000; SCHOMBERG et al., 2009). Otto (2012) reportou que a MBN identificou corretamente solos responsivos e não responsivos à fertilização nitrogenada em soqueiras de cana-de-açúcar, porém ressaltou que a técnica isotópica apresenta-se laboriosa e de alto custo, sendo recomendada apenas para fins de pesquisa científica. Não foram encontrados estudos envolvendo a avaliação do $q\text{CO}_{2i}$ (ou $q\text{CO}_2$) e $q\text{Mic}$ como índices preditores do N mineralizável. Como é possível notar, os resultados de métodos microbiológicos e isotópico para estimativa do N mineralizado são inconsistentes e carecem de maiores pesquisas sobre o tema.

O insucesso na calibração dos testes de solo de natureza microbiológica e isotópica com parâmetros de resposta da cana-de-açúcar ao N é explicado por diversos fatores, a saber: i) embora a determinação da RB, RBi e C-BMS baseou-se na utilização de amostras de solo frescas, algumas etapas de pré-tratamento foram necessárias, como peneiramento e reumedecimento, podendo ter causado distúrbios no meio (DE NOBILI; CONTIN; BROOKES, 2006); ii) nas determinações da RB, RBi, C-BMS e MBN, as amostras de solo foram incubadas em condições ideais de temperatura e umidade, não levando-se em conta as frequentes flutuações na

temperatura e ciclos de secagem-molhamento que ocorrem em condições de campo (ST. LUCE et al., 2011); iii) o tamanho do reservatório do C-BMS é relativamente constante durante o ano, ao contrário da disponibilidade de nutrientes e condições do solo, como umidade (PURI; ASHMAN, 1998); iv) a atividade microbiológica sozinha ou combinada com a biomassa microbiana pode não ser um adequado indicador da predição do N mineralizável, pois um substrato é requerido, e este pode ser influenciado pela quantidade e qualidade dos resíduos culturais, textura e umidade do solo (DENG; MOORE; TABATABAI, 2000); e v) a MBN pode não quantificar a mineralização da matéria orgânica e o crescimento da biomassa microbiana, mas sim a ciclagem e reciclagem microbiana em pequenos reservatórios altamente lábeis no solo, que possuem compostos ricos em N (FIERER et al., 2001).

Como reportado para os testes químicos e biológico, a variação nas condições climáticas entre os sítios experimentais e anos, o manejo de resíduos orgânicos, as diferentes variedades de cana-de-açúcar cultivadas, a FBN em cana-de-açúcar, e os fatores limitantes que não o N (restrições hídricas no solo, restrições químicas e físicas do solo, pragas, doenças e plantas invasoras) podem ter dificultado a predição da mineralização de N pelos testes microbiológicos e isotópico. Por outro lado, a variação nos diversos fatores citados acima foi importante para a avaliação da robustez dos métodos preditores. Devido às condições ótimas de umidade e temperatura que as amostras de solo foram expostas para a quantificação dos métodos, é provável que tais índices não sejam promissores na estimativa de mineralização do N no campo se utilizados isoladamente. A utilização de variáveis climáticas associada a testes de solo pode ser uma estratégia promissora, embora tenha gerado resultados pouco alentadores no estudo de Dessureault-Rompré et al. (2010).

A RB e o C-BMS correlacionaram-se positivamente com o COS para a camada superficial de solo, enquanto que para a camada subsuperficial, além da RB e C-BMS, a RBi também se correlacionou com o COS (Tabela 2.6). Considerando-se ambas as camadas de solo, os valores de R^2 para os modelos lineares ajustados situaram-se entre 0,56 a 0,72. Correlações da RB e C-BMS com o COS para solos cultivados com cana-de-açúcar também foram reportados por Suman et al. (2006). A ausência de correlação entre a RBi e o COS na camada de 0-20 cm possivelmente se deve ao manejo específico do solo em cada sítio experimental, que inclui a aplicação de resíduos e fertilizantes orgânicos, preparo de solo e controle mecânico e químico de plantas invasoras, que causam distúrbios na camada mais superficial do solo.

Tabela 2.6 – Modelos⁽¹⁾ de regresso linear para a relação entre o C orgânico do solo (COS) com métodos microbiológicos e isotópico para a predição do N mineralizável nas camadas de 0-20 e 20-40 cm do solo ($n = 14$)

Relação	COS na camada de 0-20 cm			COS na camada de 20-40 cm		
	Equação	R ²	P ⁽⁸⁾	Equação	R ²	P ⁽⁸⁾
RB ⁽²⁾	$y = 0,2338x + 1,889$	0,60	0,0012	$y = 0,4255x + 0,228$	0,72	0,0001
RB ⁽³⁾	$y = 0,0033x + 4,317$	0,13	0,2033	$y = 0,0118x - 1,971$	0,56	0,0020
C-BMS ⁽⁴⁾	$y = 0,0219x + 1,633$	0,70	0,0002	$y = 0,0157x + 1,682$	0,67	0,0003
qCO _{2i} ⁽⁵⁾	$y = -0,4096x + 9,255$	0,15	0,1723	$y = -0,8363x + 8,604$	0,27	0,0569
qMic ⁽⁶⁾	$y = -0,1940x + 8,034$	0,01	0,8427	$y = 0,1142x + 5,236$	0,01	0,8206
MBN ⁽⁷⁾	$y = 0,3199x + 6,934$	0,01	0,7278	...	...	...

⁽¹⁾ Equações são $y = \text{inclinação} (x) + \text{intercepto}$, onde x é o valor do método para predição do N mineralizável do solo, enquanto que a inclinação e o intercepto foram estimados por regressão linear.

⁽²⁾ RB: respiração basal do solo; ⁽³⁾ RBi: respiração basal induzida do solo; ⁽⁴⁾ C-BMS: C da biomassa microbiana do solo; ⁽⁵⁾ qCO_{2i}: quociente metabólico induzido do solo; ⁽⁶⁾ qMic: quociente microbiano do solo; ⁽⁷⁾ MBN: mineralização bruta de N no solo

⁽⁸⁾ Significativo quando $P \leq 0,05$

... Dado numérico não disponível

2.4 Conclusões

1. Foram observadas fracas correlações entre o N-IAn e a PCC, e o N-HKCl e o N-TFB com a ENC. Todavia, nenhum método preditor do N mineralizável do solo se correlacionou com a PRC ou a DN 90% PRC.
2. Devido à falha na calibração dos métodos preditores, não é possível concluir qual a profundidade adequada para a amostragem de solo destinada à avaliação da disponibilidade de N para a cana-de-açúcar.
3. Nenhum método é recomendado na identificação de sítios responsivos e não responsivos ao N ou no ajuste de doses de fertilizantes nitrogenados para aplicação em soqueiras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil.

Referências

ANDERSON, J.P.E. Soil respiration. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: ASA, SSSA, 1982. pt. 2: Chemical methods. p. 837-871. (Agronomy Monograph, 9).

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Application of ecophysiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 251-255, 1990.

BABUJIA, L.C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BROOKES, P.C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian Oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 2174–2181, 2010.

BARKER, D.W.; SAWYER, J.E.; AL-KAISI, M.M.; LUNDVALL, J.P. Assessment of the amino sugar-nitrogen test on Iowa soils: II. Field correlation and calibration. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 1352–1358, 2006.

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

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 521-577, 2004.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 139-149, 2003.

BÖRJESSON, P. Good or bad bioethanol from a greenhouse gas perspective – What determines this? **Applied Energy**, Amsterdam, v. 86, p. 589-594, 2009.

BREMNER, J.M. Nitrogen total. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1996. pt. 3: Chemical methods: p. 1085-1121. (SSSA Book Series, 5).

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

BUSHONG, J.T.; ROBERTS, T.L.; ROSS, W.J.; NORMAN, R.J.; SLATON, N.A.; WILSON JUNIOR, C.E. Evaluation of distillation and diffusion techniques for estimating hydrolyzable amino sugar-nitrogen as a means of predicting N mineralization. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 72, p. 992–999, 2008.

CANTARELLA, H.; MATTOS JUNIOR, D.; RAIJ, B. van. Lime effect on soil N availability indexes as measured by plant uptake. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, p. 989-1006, 1994.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van; QUAGGIO, J.A. Soil and plant analyses for lime and fertilizer recommendations in Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 29, p. 1691-1706, 1998.

CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L.C.; SOUSA NETO, E.; PITOMBO, L.; DUARTE-NETO, P.J.; VARGAS, V.P.; ANDRADE, C.A.; GAVA, G.J.C.; ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; NETO, A.E.; MARTINELLI, L.A. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer

application and crop trash accumulation. **Global Change Biology Bioenergy**, Oxford, v. 5, p. 267-280, 2013.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P. CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, Amsterdam, v. 33, p. 2752-2761, 2013.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS – Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2014/2015 - segundo levantamento**. Brasília, 2014. 20 p.

CULMAN, S.W.; SNAPP, S.S.; FREEMAN, M.A.; SCHIPANSKI, M.E.; BENISTON, J.; LAL, R.; DRINKWATER, L.E.; FRANZLUEBBERS, A.J.; GLOVER, J.D.; GRANDY, A.S.; LEE, J.; SIX, J.; MAUL, J.E.; MIRKSY, S.B.; SPARGO, J.T.; WANDER, M.M. Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 494-504, 2012.

CURTIN, D.; CAMPBELL, C.A. Mineralizable nitrogen. In: CARTER, M.R.; GREGORICH, E.G. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 46.

DE NOBILI, M.; CONTIN, M.; BROOKES, P.C. Microbial biomass dynamics in recently air-dried and rewetted soils compared to others stored air-dry for up to 103 years. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2871-2881, 2006.

DENG, S.P.; MOORE, J.M.; TABATABAI, M.A. Characterization of active nitrogen pools in soils under different cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, p. 302-309, 2000.

DESSUREAULT-ROMPRÉ, J.; ZEBARTH, B.J.; BURTON, D.L.; SHARIFI, M.; COOPER, J.; GRANT, C.A.; DRURY, C.F. Relationships among mineralizable soil nitrogen, soil properties, and climatic indices. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 1218-12127, 2010.

DOURADO-NETO, D.; POWLSON, D.; ABU BAKAR, R.; BACCHI, O.O.S.; BASANTA, M.V.; THI CONG, P.; KEERTHISINGHE, G.; ISMAILI, M.; RAHMAN, S.M.; REICHARDT, K.; SAFWAT, M.S.A.; SANGAKKARA, R.; TIMM, L.C.; WANG, J.Y.; ZAGAL, E.; KESSEL, C. van. Multiseason recoveries of organic and inorganic nitrogen-15 in tropical cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 139-152, 2010.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of higher plants: principles and perspectives**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2005. 380 p.

FARQUHAR, G.D.; FIRTH, P.M.; WETSELAAR, R.; WEIR, B. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: determination of the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 710-714, 1980.

FIERER, N.; SCHIMEL, J.P.; CATES, R.; ZOU, J. The influence of balsam poplar tannin fractions on carbon and nitrogen dynamics in Alaskan taiga floodplain soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1827-1839, 2001.

FLAVEL, T.C.; MURPHY, D.V.; LALOR, B.M.; FILLERY, I.R.P. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1397-1400, 2005.

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. 28, p. 29-41, 2011.

FRANZLUEBBERS, A.J.; HANEY, R.L.; HONEYCUTT, C.W.; SCHOMBERG, H.H.; HONS, F.M. Flush of carbon dioxide following rewetting of dried soil relates to active organic pools. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 613-623, 2000.

GALDOS, M.V.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 153, p. 347-352, 2009.

GALDOS, M.V.; CAVALETT, O.; SEABRA, J.E.A.; NOGUEIRA, L.A.H.; BONOMI, A. Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 104, p. 576-582, 2013.

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.

GIANELLO, C.; BREMNER, J.M. Comparison of chemical methods of assessing potentially available organic nitrogen in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 17, p. 215-236, 1986.

_____. A rapid steam distillation method of assessing potentially available organic nitrogen in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 19, p. 1551-1568, 1988.

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.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, p. 1-7, 2008.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microbial community in the row and inter-row of

sugarcane under burning and trash retention. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p.21-31, 2006.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J.; MEYER, J.H. Soil organic matter content and quality: effects of fertilizer applications, burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 93-102, 2002.

GRIFFIN, T.S. Nitrogen availability. In: SCHEPERS, J.S.; RAUN, W.R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural systems**. Madison: ASA; CSSA, SSSA, 2008. p. 613-646.

HART, S.C.; STRAK, J.M.; DAVIDSON, E.A.; FIRESTONE, M.K. Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: SSSA, 1994. p. 985-1018.

HANEY, R.L.; FRANZLUEBBERS, A.J.; PORTER, E.B.; HONS, F.M.; ZUBERER, D.A. Soil carbon and nitrogen mineralization: influence of drying temperature. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 68, p. 489-492, 2004.

HONG, S.D.; FOX, R.H.; PIEKIELEK, W.P. Field evaluation of several chemical indexes of soil nitrogen availability. **Plant and Soil**, The Hague, v. 123, p. 83-88, 1990.

HORWATH, W.R.; PAUL, E.A. Microbial biomass. In: WEAVER, R.W. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1994. pt. 2: Microbiological and biochemical properties, p. 753-773.

IDOWU, O.J.; ES, H.M.; ABAWI, G.S.; WOLFE, D.W.; BALL, J.I.; GUGINO, B.K.; MOEBIUS, B.N.; SCHINDELBECK, R.R.; BILGILI, A.V. Farmer-oriented assessment of soil quality using field, laboratory, and VNIR spectroscopy methods. **Plant and Soil**, The Hague, v. 307, p. 243-253, 2008.

INSAM, H.; DOMSCH, K.H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. **Microbial Ecology**, New York, v. 15, p. 177-188, 1988.

INSAM, H.; HASELWANDTER, K. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. **Oecologia**, Berlin, v. 79, p. 174-178, 1989.

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

JALIL, A.; CAMPBELL, C.A.; SCHOENAU, J.; HENRY, J.L.; JAME, Y.W.; LAFOND, G.P. Assessment of two chemical extraction methods as indices of available nitrogen. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 60, p. 1954-1960, 1996.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soils: measurement and Turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: Marcel Decker, 1981. p. 415-471.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 2009-2013, 1976.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indicators for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1-13, 2010.

KEENEY, D.R. Nitrogen: availability indices. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. 2nd ed. Madison: ASA, SSSA, 1982. pt. 2: Chemical and microbiological properties, p. 711-733.

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.

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

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

KLAPWYK, J.H.; KETTERINGS, Q.M. Soil tests for predicting corn response to nitrogen fertilizer in New York. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 675-681, 2006.

KWON, H.; HUDSON, R.J.M.; MULVANEY, R.L. Characterization of the organic nitrogen fraction determined by the Illinois Soil Nitrogen Test. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 1033-1043, 2009.

LABOSKI, C.A.M.; SAWYER, J.E.; WALTERS, D.T.; BUNDY, L.G.; HOEFT, R.G.; RANDALL, G.W.; ANDRASKI, T.W. Evaluation of the Illinois Soil Nitrogen Test in the North Central Region of the United States. **Agronomy Journal**, Madison, v. 100, p. 1070-1076, 2008.

LEITE, J.M. **Acúmulo de fitomassa e de macronutrientes da cana-de-açúcar relacionadas ao uso de fontes de nitrogênio**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LÓPEZ-BELLIDO, L.; LÓPEZ-BELLIDO, R.J.; LÓPEZ-BELLIDO, F.J. Fertilizer Nitrogen efficiency in durum wheat under rainfed Mediterranean conditions. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 55-62, 2006.

LUCAS, S.T.; WEIL, R.R. Can a labile carbon test be used to predict crop response to improve soil organic matter management? **Agronomy Journal**, Madison, v. 104, p. 1160-1170, 2012.

LUO, L.; VAN DER VOET, E.; HUPPES, G. Life cycles assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 13, p. 1613-1619, 2009.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and prediction for 2020. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 32, p. 582-595, 2008.

MARIANO, E.; LEITE, J.M.; MEGDA, M.X.V.; TORRES-DORANTE, L.; TRIVELIN, P.C.O. Influence of nitrogen form supply on soil mineral nitrogen dynamics, nitrogen uptake and productivity of sugarcane. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, p. 641-650, 2015.

MARIANO, E.; TRIVELIN, P.C.O.; VIEIRA, M.X.; LEITE, J.M.; OTTO, R.; FRANCO, H.C.J. Ammonia losses estimated by an open collector from urea applied to sugarcane straw. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 411-441, 2012.

_____. 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.

McDONALD, N.T.; WATSON, C.J.; LALOR, S.T.J.; LAUGHLIN, R.J.; WALL, D.P. Evaluation of soil tests for predicting nitrogen mineralization in temperate grassland soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 78, p. 1051-1064, 2014.

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.

MULVANEY, R.L.; KHAN, S.A. Diffusion methods to determine different forms of nitrogen in soil hydrolysates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 1284–1292, 2001.

MULVANEY, R.L.; KHAN, S.A.; ELLSWORTH, T.R. Need for a soil-based approach in managing nitrogen fertilizers for profitable corn production. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 172-182, 2006.

MURPHY, D.V.; FILLERY, I.R.P.; SPARLING, G.P. Seasonal fluctuations in gross N mineralization, ammonium consumption, and microbial biomass in a Western

Australian soil under different land uses. **Australian Journal of Agriculture Research**, Melbourne, v. 49, p. 523-535, 1998.

MURPHY, D.V.; RECOUS, S.; STOCKDALE, E.A.; FILLERY, I.R.; JENSEN, L.S.; HATCH, D.J.; 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.

NASS, L.L.; PEREIRA, P.A.A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2228-2237, 2007.

NAYYAR, A.; SINGH, B.; SINGH, Y. Nitrogen-supplying capacity of soils for rice and wheat and nitrogen availability indices in soils of northwest India. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 37, p. 961-976, 2006.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Determination of total nitrogen in plant material. **Agronomy Journal**, Madison, v. 65, p. 109-112, 1973.

_____. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1996. pt. 3: Chemical methods, p. 961-1010. (SSSA Book Series, 5).

NORMAN, R.J.; GUINDO, D.; WELLS, B.R.; WILSON JUNIOR, C.E. Seasonal accumulation and partitioning of nitrogen-15 in rice. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 1521-1527, 1992.

NYIRANEZA, J.; ZIADI, N.; ZEBARTH, B.J.; SHARIFI, M.; BURTON, D.L.; DRURY, C.F.; BITTMAN, S.; GRANT, C.A. Prediction of soil nitrogen supply in corn production using soil chemical and biological indices. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 925-935, 2012.

OHTONEN, R. Accumulation of organic matter along a pollution gradient - application of Odum's theory on ecosystem energetics. **Microbial Ecology**, New York, v. 27, p. 43-55, 1994.

OLIVEIRA, B.G.; CARVALHO, J.L.N.; CERRI, C.E.P.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, Amsterdam, v. 200/201, p. 77-84, 2013.

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

OSTERHAUS, J.T.; BUNDY, L.G.; ANDRASKI, T.W. Evaluation of the Illinois Soil Nitrogen Test for predicting corn nitrogen needs. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 72, p. 143-150, 2008.

OTTO, R. **Desenvolvimento radicular e produtividade da cana-de-açúcar relacionados à mineralização do N do solo e à adubação nitrogenada**. 2012.

120 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

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.

PÔRTO, M.L.; ALVES, J.C.; DINIZ, A.A.; SOUZA, A.P.; SANTOS, D. Indicadores biológicos de qualidade do solo em diferentes sistemas de uso no brejo paraibano. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1011-1017, 2009.

PRADO, R.M.; PANCELLI, M.A. Resposta de soqueiras de cana-de-açúcar à aplicação de nitrogênio em sistema de colheita sem queima. **Bragantia**, Campinas, v. 67, p. 951-959, 2008.

PURI, G.; ASHMAN, M.R. Relationship between soil microbial biomass and gross N mineralization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 251-256, 1998.

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

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundação IAC, 1997. 285 p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; PROCHNOW, L.I.; VITTI, G.C.; PEREIRA, H.S. Soil testing and plant analysis in Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, p. 799-816, 1994.

REIS, B.F.; VIEIRA, J.A.; KRUG, F.J.; GINÉ, M.F. Development of a flow injections system 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.

ROBERTS, T.L.; NORMAN, R.J.; FULFORD, A.M.; SLATON, N.A. Field validation of N-STaR for rice produced on silt loam soils in Arkansas. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 77, p. 539-545, 2013.

ROBERTS, T.L.; NORMAN, R.J.; SLATON, N.A.; WILSON JUNIOR, C.E. Changes in alkaline hydrolyzable nitrogen distribution with soil depth: fertilizer correlation and calibration implications. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 2151-2157, 2009b.

ROBERTS, T.L.; NORMAN, R.J.; SLATON, N.A.; WILSON JUNIOR, C.E.; ROSS, W.J. Direct steam distillation as an alternative to the Illinois Soil Nitrogen Test. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 1268-1275, 2009a.

ROBERTS, T.L.; ROSS, W.J.; NORMAN, R.J.; SLATON, N.A.; WILSON JUNIOR, C.E. Predicting Nitrogen fertilizer needs for rice in Arkansas using alkaline hydrolyzable-nitrogen. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 75, p. 1161-1171, 2011.

ROBERTSON, F.A.; THORBURN, P.J. Management of sugarcane harvest residues: consequences for soil carbon and nitrogen. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 45, p. 13-23, 2007.

ROS, G.H.; TEMMINGHOFF, E.J.M.; HOFFLAND, E. Nitrogen mineralization: a review and meta-analysis of the predictive value of soil tests. **European Journal of Soil Science**, Oxford, UK, v. 62, p. 162-173, 2011.

SCHOMBERG, H.H.; WIETHOLTER, S.; GRIFFIN, T.S.; REEVES, D.W.; CABRERA, M.L.; FISHER, D.S.; ENDALE, D.M.; NOVAK, J.M.; BALKCOM, K.S.; KITCHEN, N.R.; LOCKE, M.A.; POTTER, K.N.; SCHWARTZ, R.C.; TRUMAN, C.C.; TYLER, D.D. Assessing indices for predicting potential nitrogen mineralization in soils under different management systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 1575-1586, 2009.

SCHULTZ, N.; SILVA, J.A.; SOUSA, J.S.; MONTEIRO, R.C.; OLIVEIRA, R.P.; CHAVES, V.A.; PEREIRA, W.; SILVA, M.F.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; REIS, V.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, p. 407-414, 2014.

SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C.; CHUM, H.L.; FRONI, C.E.; SARTO, C.A. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 5, p. 519-532, 2011.

SHARIFI, M.; ZEBARTH, B.J.; BURTON, D.L.; GRANT, C.A.; COOPER, J.M. Evaluation of some indices of potentially mineralizable nitrogen in soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 1233-1239, 2007a.

SHARIFI, M.; ZEBARTH, B.J.; BURTON, D.L.; GRANT, C.A.; BITTMAN, S.; DRURY, C.F.; McCONKEY, B.G.; ZIADI, N. Response of potentially mineralizable soil nitrogen and indices of nitrogen availability to tillage system. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 72, p. 1124-1131, 2008a.

SHARIFI, M.; ZEBARTH, B.J.; BURTON, D.L.; GRANT, C.A.; PORTER, G.A.; COOPER, J.M.; LECLERE, Y.; MOREAU, G.; ARSENAULT, W.J. Evaluation of laboratory-based measures of soil mineral nitrogen and potentially mineralizable nitrogen as predictors of field-based indices of soil nitrogen supply in potato production. **Plant and Soil**, The Hague, v. 301, p. 203-214, 2007b.

SILVA, D.K.A.; FREITAS, N.O.F.; SOUZA, R.G.; SILVA, F.S.B.; ARAUJO, A.S.F.; MAIA, L.C. Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests

and conventional sugarcane plantations in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 189-190, p. 257-261, 2012.

SMITH, D.M.; INMAN-BAMBER, N.G.; THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 169-183, 2005.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. 12th ed. Washington: USDA; Natural Resources Conservation Service. 2014.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. **Critical Review in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2004.

SOMMER, S.G.; SCHJOERRING, J.K.; DENMEAD, O.T. Ammonia emission from mineral fertilizers and fertilized crops. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 82, p. 557-622, 2004.

SOON, Y.K.; HAQ, A.; ARSHAD, M.A. Sensitivity of nitrogen mineralization indicators to crop and soil management. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 38, p. 2029-2043, 2007.

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

SPARGO, J.T.; ALLEY, M.M.; THOMASON, W.E.; NAGLE, S.M. Illinois Soil Nitrogen Test for prediction of fertilizer nitrogen needs of corn in Virginia. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, p. 434-442, 2009.

SPARLING, G.P.; WHALE, K.N.; RAMSAY, A.J. Quantifying the contribution from the soil microbial biomass to the extractable P of fresh and air dried soils. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 23, p. 613–621, 1985.

SPIRONELLO, 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**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundação IAC, 1997. p. 237-239. (Boletim técnico, 100)

ST. LUCE, M.; WHALEN, J.K.; ZIADI, N.; ZEBARTH, B. Nitrogen dynamics and indices to predict soil nitrogen supply in humid temperate soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 112, p. 55-102, 2011.

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

STANFORD, G. Evaluation of ammonium release by alkaline permanganate extraction as an index of soil nitrogen availability. **Soil Science**, Baltimore, v. 126, p. 244–253, 1978.

STANFORD, G.; SMITH, S.J. Oxidative release of potentially mineralizable soil nitrogen by acid permanganate extraction. **Soil Science**, Baltimore, v. 126, p. 210–218, 1978.

STE-MARIE, C.; HOULE, D. Forest floor gross and net nitrogen mineralization in three forest types in Quebec, Canada. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2135-2143, 2006.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. **Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1999. 427 p.

SUMAN, A.; LAL, M.; SINGH, A.K.; GAUR, A. Microbial biomass turnover in India subtropical soils under different sugarcane intercropping systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 698-704, 2006.

TAKAHASHI, D.T. N¹⁵-nitrogen field studies with sugarcane. **Hawaiian Planters' Record**, Honolulu, v. 57, p. 198-222, 1964.

THORBURN, P.J.; BIGGS, J.S.; WEBSTER, A.J.; BIGGS, I.M. An improved way to determine nitrogen fertilizer requirements of sugarcane crops to meet global environmental challenges. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 339, p. 51-67, 2011.

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

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F.; BATISTA, R.B. SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J.M.; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field Nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 356, p. 5-21, 2011.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VIDELA, C.; PAZOS, A.; TRIVELIN, P.C.O.; ECHEVERRÍA, H.E.; STUDDERT, G.A. Mineralización bruta de nitrógeno bajo labranza convencional, siembra directa y pastura. **Ciencia del Suelo**, Buenos Aires, v. 23, p. 133-144, 2005.

VIEIRA, M.X.; TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E. Ammonium chloride as Nitrogen source in sugarcane harvested without burning. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1165-1174, 2010.

VIEIRA-MEGDA, M.X.V.; MARIANO, E.; LEITE, J.M.; FRANCO, H.C.J.; VITTI, A.C.; MEGDA, M.M.; KHAN, S.A.; MULVANEY, R.L.; TRIVELIN, P.C.O. Contribution of fertilizer nitrogen to the total nitrogen extracted by sugarcane under Brazilian field conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Amsterdam, v. 101, p. 241-257, 2015.

VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O.; GAVA, G.J.C.; PENATTI, C.P.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; FRANCO, H.C.J. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 249-256, 2007.

WANG, W.J.; SMITH, C.J.; CHEN, D. Towards a standardized procedure for determining the potentially mineralizable nitrogen of soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 362-274, 2003.

WANG, W.J.; CHALK, P.M.; CHEN, D.; SMITH, C.J. Nitrogen mineralization, imobilisation and loss, and their role in determining differences in net nitrogen production during waterlogged and aerobic incubation of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1305-1315, 2001.

WARDLE, D.A.; GHANI, A. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1601-1610, 1995.

WARING, S.A.; BREMNER, J.M. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. **Nature**, London, v. 201, p. 951-952, 1964.

WEIL, R.R.; ISLAM, K.R.; STINE, M.A.; GRUVER, J.B.; SAMSON-LIEBIG, S.E. Estimating active carbon for soil quality assessment: a simplified method for laboratory and field use. **American Journal of Alternative Agriculture**, Greenbelt, v. 18, p. 3-17, 2003.

WHITEHEAD, D.C. An improved chemical extraction method for predicting the supply of available nitrogen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 32, p. 359-365, 1981.

WILLIAMS, J.D.; CROZIER, C.R.; WHITE, J.G.; HEINIGER, R.W.; SRIPADA, R.P.; CROUSE, D.A. Illinois soil nitrogen test predicts southeastern U.S. corn economic optimum nitrogen rates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 735-744, 2007.

YAGI, R.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; BARBOSA, J.C. Mineralização potencial e líquida de nitrogênio em solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 385-394, 2009.

YAN, T.; YAN, L.; CAMPBELL, C.D. Microbial biomass and metabolic quotient of soils under different land use in Three Gorges Reservoir area. **Geoderma**, Amsterdam, v.115, p.129-138, 2003.

YU, W.; BROOKES, P.C.; MA, Q.; ZHOU, H.; XU, Y.; SHEN, S. Extraction of soil nitrogen by chloroform fumigation: a index for the evaluation of soil nitrogen supply. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p.2423-2426, 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 REAÇÕES DO NITROGÊNIO ORGÂNICO E MINERAL DISSOLVIDOS EM SOLO E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR RELACIONADAS AO CICLO DO CARBONO E NITROGÊNIO

Resumo

Pouco se sabe sobre a dinâmica do nitrogênio (N) orgânico dissolvido (NOD) na zona de transição palha-solo de áreas sob cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). A influência das formas minerais de N na mineralização de carbono (C) nessa interface também é incerta. Assim, os objetivos deste estudo foram o de determinar a mineralização e sorção de compostos do NOD e a mineralização de glicose combinada com N mineral em palha e solo de cana-de-açúcar. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial. A palha e solo foram coletados em dois sítios experimentais localizados no Estado de São Paulo, Brasil, e o comportamento de mistura de aminoácidos, peptídeos, ureia e proteína nas referidas amostras foi avaliado por meio de técnica radioisotópica. A mineralização de C e conteúdo de N mineral pela adição de ^{14}C -glicose com ou sem as formas de N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) também foi avaliada. Existem diferenças marcantes entre a palha de cana-de-açúcar e solo no que diz respeito à dinâmica do NOD, perfil da comunidade microbiana e imobilização de N. A palha pode disponibilizar NOD para o solo. Em geral, o conteúdo de ^{14}C remanescente dos compostos do NOD foi maior no solo em relação à palha, sendo que os peptídeos e a ureia apresentaram rápida mineralização de C. A proteína apresentou alto potencial de sorção (K_d) no solo. A associação da ^{14}C -glicose com N-NO_3^- intensificou a mineralização de ^{14}C na palha de ambos os sítios. Ocorreu intensa imobilização de N-NH_4^+ , sobretudo no resíduo de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; Mineralização; Glicose; Nitrogênio mineral; Análise de PLFA

Abstract

Little is known about the dynamics of dissolved organic nitrogen (DON) in the straw-soil transition zone in sugarcane (*Saccharum* spp.) fields. The influence of mineral N forms in the carbon (C) mineralization in this interface is also uncertain. Thus, the objectives of this study were to determine the mineralization and sorption of DON compounds and the mineralization of glucose combined with mineral N in straw and soils from sugarcane fields. The experiments had a randomized completely design in factorial arrangement. Straw and soil were sampled in two experimental sites located in the State of São Paulo, Brazil, and the behavior of amino acids mix, peptides, urea and protein in the referred samples was assessed by radioisotope technique. The C mineralization and mineral N dynamics by the addition of ^{14}C -glucose with or without mineral N forms ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$) was also checked. There are remarkable differences between sugarcane straw and soil regarding to the DON dynamics, microbial community profile and N immobilization. The straw can release DON to the soil. In general, the ^{14}C remaining of the DON compounds in the soil was higher when compared to the straw, with the peptides and urea showing a rapid C mineralization. The protein showed high sorption potential (K_d) in the soil. The use of ^{14}C -glucose with

NO_3^- -N intensified ^{14}C mineralization in the straw of both sites. There was an intense immobilization of NH_4^+ -N, mainly in the crop residue.

Keywords: *Saccharum* spp.; Mineralization; Glucose; Mineral nitrogen; PLFA analysis

3.1 Introdução

Mundialmente, em etapa anterior à colheita da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), o canavial é queimado objetivando-se facilitar o corte manual e o posterior carregamento e transporte dos colmos até as unidades sucroenergéticas. Por razões ambientais, econômicas e sociais, a colheita manual com queima prévia tem sido gradativamente substituída pela colheita mecanizada sem despalha a fogo em várias regiões do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo (GALDOS et al., 2013). Com a nova modalidade de colheita, ocorre a retenção da palha da cultura (folhas e ponteiros) na superfície do solo, que pode representar entrada anual de 10 a 20 Mg ha^{-1} de massa seca do resíduo vegetal nos canaviais (LEAL et al., 2013). Os principais benefícios da manutenção da palha superficial no campo se referem ao aumento na atividade microbiológica do solo, aumento da umidade solo, estabilidade na temperatura do solo, aumento no estoque de C, proteção contra erosão e entrada de nutrientes no sistema solo-planta (DOURADO-NETO et al., 1999; SPAROVEK; SCHNUG, 2001; CERRI et al., 2011; FRANCO et al., 2013; AZEVEDO; STÜRMER; LAMBAIS, 2014). Como desvantagens, pode-se citar o aumento na incidência de pragas e perdas consideráveis de N por volatilização de NH_3 pela aplicação superficial de ureia (MARIANO et al., 2012; DINARDO-MIRANDA; FRACASSO, 2013).

Há cerca de uma década, as unidades sucroenergéticas brasileiras vem utilizando o bagaço proveniente das moendas como combustível nas caldeiras, que é consumido em sistemas de vapor e posteriormente transformado em energia elétrica (HOFSETZ; SILVA, 2012; GUERRA et al., 2014). A energia produzida pela queima do bagaço é suficiente para a autonomia da unidade industrial, sendo o excedente vendido para empresas de distribuição de energia por meio de leilões (HOFSETZ; SILVA, 2012). Mais recentemente, além do bagaço, a palha de cana-de-açúcar anteriormente deixada na superfície do solo também tem sido utilizada na cogeração de energia e calor (LEAL et al., 2013). A realidade cada vez mais próxima de implantação em escala industrial do bioetanol de segunda geração, obtido pela hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, onde se inclui a palha de cana-de-

açúcar, tem gerado discussões recorrentes à respeito da retirada ou não desse resíduo cultural dos canaviais (LEAL et al., 2013; CANTARELLA et al., 2013; SORDI; MANECHINI, 2013). O ponto central das argumentações se baseia nas vantagens e desvantagens que a palha promove no sistema solo-planta, relatados anteriormente neste texto, além de aspectos relacionados ao modo de recolhimento e logísticas de transporte da palha até a indústria (SORDI; MANECHINI, 2013).

A influência da palha no fornecimento de nitrogênio (N) para a cultura é um assunto que desperta muita atenção da comunidade científica (FORTES et al., 2011; FORTES; TRIVELIN; VITTI, 2012; FORTES et al., 2013; TRIVELIN et al. 2013) dada sua relevância no manejo da fertilização nitrogenada da cana-de-açúcar. Embora seja consenso geral que a mineralização líquida dos resíduos vegetais da cultura é baixa devido à alta relação C/N da palha (FORTES; TRIVELIN; VITTI, 2012), estudos caracterizando as frações do N orgânico presentes na palha de cana-de-açúcar não foram encontrados na literatura. Uma das frações que vem ganhando destaque em estudos se refere ao N orgânico dissolvido (NOD), especialmente em solos minerais e orgânicos de regiões temperadas do mundo (FARRELL et al., 2011; HILL; FARRELL; JONES, 2012; JONES; KIELLAND, 2012; GLANVILLE et al., 2012). Nos últimos anos, diversos autores, em substituição ao modelo clássico do ciclo do N no solo, onde o N disponível às plantas era definido como a fração mineral do nutriente (NH_4^+ e NO_3^-), tem proposto um novo modelo, onde, além das formas minerais conhecidas, compostos orgânicos de baixo peso molecular do NOD também poderiam ser absorvidos diretamente pelo sistema radicular dos vegetais (SCHIMEL; BENNETT, 2004; JONES et al., 2005a; NANNIPIERI; PAUL, 2009). Enquanto que no modelo clássico do ciclo o N no solo os processos de mineralização e imobilização governavam a disponibilidade do nutriente às plantas, no novo paradigma conceitual a despolimerização de compostos orgânicos nitrogenados tem papel fundamental na ciclagem do N (SCHIMEL; BENNETT, 2004). A despolimerização ocorre por meio de enzimas extracelulares capazes de fragmentar os polímeros em monômeros (aminoácidos, peptídeos, ureia, etc), que são amplamente biodisponíveis às plantas e microrganismos (SCHIMEL; BENNETT, 2004; JONES et al., 2005a).

Os compostos do NOD de baixo peso molecular também apresentam grande importância na disponibilidade das formas minerais de N, por meio da mineralização líquida dos referidos compostos pela biomassa microbiana. A rápida ciclagem de aminoácidos e peptídeos em solos de clima temperado é reportada exaustivamente

por diversos autores (JONES; KIELLAND, 2002; JONES et al., 2004; JONES et al., 2009; FARRELL et al., 2011; WILKINSON et al., 2014), que fizeram uso de técnica radioisotópica (^{14}C) para quantificação da mineralização de C. A rápida mineralização de peptídeos pequenos é explicada pela absorção intacta das moléculas pelos microrganismos, incluindo-se também micorrizas, especialmente em condições de limitação de N no sistema (FARRELL et al., 2011; HILL; FARRELL; JONES, 2012). A mineralização de proteínas (L-caseína e albumina de soro bovino) foi estudada recentemente por Jones e Kielland (2012), que reportaram baixas taxas de mineralização dos compostos no solo devido à necessária clivagem da molécula por enzimas extracelulares antes da absorção como monômeros, como relatado anteriormente. Embora o comportamento da ureia no solo como fertilizante nitrogenado seja amplamente estudado e conhecido (BREMNER, 1995), a avaliação das reações da molécula como componente do NOD e presente naturalmente em pequenas quantidades ainda é incerta, com poucos estudos desenvolvidos até o momento (NIELSEN; SØRENSEN, 1998; GLANVILLE et al., 2012). A capacidade de sorção de aminoácidos e peptídeos também tem sido avaliada (ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GE et al., 2012), revelando que compostos do NOD podem ser prontamente adsorvidos na fase sólida de coloides. Com isso, as perdas por lixiviação de NOD podem ser minimizadas, além de fração adsorvida atuar como reserva dos compostos em solução. Todavia, a sorção de ureia e proteínas quantificada por meio do marcador ^{14}C , até onde se sabe, não foi investigada previamente.

Além do estudo das reações dos compostos do NOD em palha e solo de cana-de-açúcar, a avaliação do impacto da fertilização nitrogenada na mineralização desse resíduo vegetal é de essencial importância. A mudança no sistema de colheita da cana-de-açúcar trouxe diversos desafios ao setor sucroenergético brasileiro no que diz respeito ao manejo da operação de fertilização. Antes incorporados ao solo, os fertilizantes NPK agora são aplicados sobre a palha da cultura nos ciclos de soqueira, uma vez que a incorporação dos insumos é uma tarefa praticamente impossível devido à espessa camada de resíduo cultural formada. O fertilizante mineral nitrogenado que fica depositado na palha auxilia na mineralização desse material orgânico por meio do efeito *priming*, que implica em mudanças significativas de curto prazo que afetam a ciclagem do N, ocasionadas por intervenções no solo, tais como a entrada de fertilizante mineral, exsudação de substâncias orgânicas na rizosfera e processos de secagem e reumedecimento (KUZYAKOV; FREIDEL; STAHR, 2000).

Embora seja reconhecida a intensa imobilização de fertilizantes nitrogenados pela biomassa microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar (VIEIRA-MEGDA et al., 2015), informações sobre os processos de mineralização-imobilização do N que ocorrem na palha que recobre o solo ainda são limitadas. Assim, a utilização de um carboidrato lábil traçador, como a ^{14}C -glicose, associada a fontes minerais de N, pode ser uma ferramenta útil no estudo da mineralização de C influenciada pela entrada de N no sistema. Como exemplo oportuno, Conde et al. (2005), avaliando a aplicação de resíduo de palha de milho ou glicose (ambos marcados em ^{14}C) associado ou não à adição de uma fonte de N-NH_4^+ [na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] em solo salino-alcálico no México, verificaram maior mineralização de ^{14}C (mensurado na forma de $^{14}\text{CO}_2$) e maior efeito *priming* quando o N mineral foi adicionado aos substratos carbonáceos. Tuomela et al. (2002) detectaram baixa mineralização da ^{14}C -glicose aplicada isoladamente em materiais orgânicos compostados com relações C/N variadas. Além da relação C/N, propriedades como composição bioquímica, nutrientes disponíveis, celulose, hemicelulose e compostos fenólicos também podem controlar a taxa de mineralização do N presente na palha e no solo (MANZONI et al., 2008; FORTES; TRIVELIN; VITTI, 2012; JONES; KIELLAND, 2012; SINSABAUGH et al., 2013).

Os microrganismos do solo têm preferência pela imobilização do N amoniacal ao nítrico, uma vez que este último necessita ser reduzido à N-NH_4^+ no interior das células microbianas (PURI; ASHMAN, 1999). Esse processo bioquímico de conversão do NO_3^- à NH_4^+ é chamado de redução assimilatória do nitrato e é realizado pelas enzimas extracelulares redutase do nitrato e redutase do nitrito, e envolvem gasto energético dos microrganismos para que a reação ocorra. Como informação adicional, as plantas também necessitam reduzir o NO_3^- à NH_4^+ após absorção do ânion supracitado, em processo semelhante ao que ocorre na microbiota. A preferência dos microrganismos do solo pela absorção de N-NH_4^+ à N-NO_3^- foi reportada exaustivamente por diversos autores (WICKRAMASINGHE; RODGERS; JENKINSON, 1985; JACKSON; SCHIMEL; FIRESTONE, 1989; RECOUS; MARY, 1990). Puri e Ashman (1999) sugeriram ainda que a biomassa microbiana atue como um reservatório de N lábil que estará prontamente disponível às plantas apenas quando ocorrer conversão do N-NH_4^+ à N-NO_3^- , uma vez que a imobilização do N-NH_4^+ pelos microrganismos é intensa e altamente competitiva para as plantas. Com base nas afirmações acima, a aplicação de sais contendo os íons NH_4^+ ou NO_3^- em

amostras de palha e solo de cana-de-açúcar pode apresentar diferenças quanto à imobilização das frações do N mineral pelos microrganismos.

Com base nos novos modelos do ciclo do N que estão sendo sugeridos pela comunidade científica mundial, a estimativa do tamanho do reservatório do NOD e as reações que ocorrem nos compostos pertencentes a essa fração na palha e solo são de grande importância para o aumento da sustentabilidade do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. Além disso, são escassas as informações a respeito das reações de mineralização de C e os processos de transformação de N mineral adicionado em palha de cana-de-açúcar. Os resultados gerados por este estudo, relacionados à ciclagem do C e N, poderão ser úteis como parâmetro adicional nas discussões sobre o manejo da palha de cana-de-açúcar nos canaviais. Pelo exposto, os objetivos deste estudo, realizado em dois sítios experimentais com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, foram: i) caracterizar o reservatório do NOD na palha e solo; ii) quantificar os processos de mineralização de C e sorção de compostos do NOD (marcados em ^{14}C) em amostras de palha e solo; e iii) avaliar a mineralização de C e as transformações do N a partir da ^{14}C -glicose associada às formas de N mineral na palha e solo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Áreas experimentais

As amostras de palha e solo foram coletadas em dois experimentos de curva de resposta de soqueiras de cana-de-açúcar ao N instalados no Estado de São Paulo, Brasil. Em ambos os sítios experimentais, a cana-de-açúcar tem sido cultivada sucessivamente por muitas décadas. O preparo convencional do solo (aração, gradeação e posterior sulcação), aplicação de corretivos (calcário dolomítico e gesso agrícola) e subsequente plantio da cultura são realizados, em média, a cada seis anos. Ocasionalmente, antes do replantio da cana-de-açúcar, plantas leguminosas fixadoras de N_2 atmosférico, como a crotalária (*Crotalaria spectabilis* ou *C. juncea*), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merrill] são cultivadas nas áreas. A variedade de cana-de-açúcar plantada em cada sítio foi escolhida com base no ambiente de produção de cada local, determinado pela fertilidade do solo e produtividade média histórica da área. O sistema de colheita sem queima, que se baseia na deposição da palha de cana-de-açúcar (proveniente de folhas e ponteiros

da planta) na superfície do solo, foi adotado a cerca de 10 anos em ambos os sítios. O método de colheita utilizado anteriormente era o manual com queima prévia do canavial. Após a instalação dos experimentos, as parcelas controle (quatro repetições por sítio) receberam fertilizações regulares de P e K anualmente (34 kg ha^{-1} de P_2O_5 e 67 kg ha^{-1} de K_2O para o sítio 1; 35 kg ha^{-1} de P_2O_5 e 100 kg ha^{-1} de K_2O para o sítio 2). Os fertilizantes foram aplicados manualmente, em dose única, em faixa distante 20 cm da linha de cana-de-açúcar.

O sítio 1 era localizado no município de Novo Horizonte ($21^\circ 32'S$; $49^\circ 20'O$), e o solo apresenta textura franco-arenosa (825 g kg^{-1} areia; 23 g kg^{-1} silte e 152 g kg^{-1} argila; camada de 0,0-2,5 cm) de acordo com o sistema de classificação textural do USDA (*United States Department of Agriculture*), e é classificado como Typic Hapludox (SOIL SURVEY STAFF, 2014). O solo possui boa drenagem, com baixo conteúdo de C orgânico e caráter ácido no perfil. A temperatura média anual do ar é de $23,2^\circ\text{C}$, enquanto que a precipitação é de $1.134 \text{ mm ano}^{-1}$. A área experimental apresenta um longo histórico de aplicações anuais de coprodutos provenientes da indústria sucroenergética, como vinhaça (resíduo do mosto fermentado e destilado, possuindo alto conteúdo de K_2O e C orgânico solúvel) e torta de filtro (proveniente da filtração do caldo de cana-de-açúcar no filtro rotativo, exibindo conteúdo significativo de P_2O_5). A aplicação de composto organomineral (mistura de esterco de galinha, torta de filtro, rocha fosfática finamente moída e KCl) foi realizada anualmente, na dose de 100 kg ha^{-1} de N (com base no conteúdo de N total do composto), durante cerca de uma década. O fertilizante nitrogenado orgânico Ajifer® L-60 L, um coproduto da síntese do aminoácido L-lisina, também foi aplicado na área experimental anteriormente à instalação do experimento, iniciada em outubro de 2010. A variedade (híbrido interespecífico complexo) de cana-de-açúcar utilizada foi a CTC-15. A colheita da cultura na safra agrícola 2012/2013 foi realizada mecanicamente sem queima, em agosto de 2013.

O sítio 2 era localizado no município de Piracicaba ($22^\circ 41'S$; $47^\circ 38'O$), e o solo possui textura argilosa (297 g kg^{-1} areia; 87 g kg^{-1} silte and 617 g kg^{-1} argila; camada de 0,0-2,5 cm) de acordo com o sistema de classificação textural do USDA e é classificado como Rhodic Eutradox (SOIL SURVEY STAFF, 2014). O solo possui boa drenagem natural, com moderado conteúdo de C orgânico e caráter moderadamente ácido. A temperatura média anual do ar é de $21,6^\circ\text{C}$, enquanto que a precipitação é de $1.230 \text{ mm ano}^{-1}$. Este sítio experimental não possui histórico de aplicação de

coprodutos da indústria sucroenergética ou esterco de origem animal. A suplementação dos macronutrientes primários do solo (NPK) era realizada por meio de fertilizantes minerais, aplicados anualmente antes da instalação do experimento, que ocorreu em 2010. A variedade de cana-de-açúcar (híbrido interespecífico complexo) utilizada foi a CTC-14. A colheita da cultura na safra agrícola 2012/2013 ocorreu em setembro de 2013 e foi realizada manualmente, sem queima prévia do canavial.

3.2.2 Amostragem de palha e solo

As amostragens de palha e solo foram realizadas no início de novembro de 2013 nas parcelas controle (sem aplicação de N) de ambos os experimentos, após a colheita da safra agrícola 2012/2013. A amostragem nas parcelas controle dos sítios experimentais foi realizada no lado oposto onde usualmente ocorre a aplicação dos fertilizantes minerais (K_2O e P_2O_5), com o objetivo de evitar efeitos diretos dessa prática agrícola na dinâmica do NOD. Nove amostras simples de palha ou solo foram aleatoriamente coletadas em cada parcela experimental, sendo posteriormente combinadas e misturadas para obtenção de amostras compostas ($n = 4$). As amostras de palha foram amostradas manualmente, em área projetada por um anel volumétrico de aço inoxidável de 5,5 cm de diâmetro interno, sendo descartada a camada superficial do resíduo vegetal e coletando-se a palha situada na camada de 0,0-2,5 cm a partir da zona de transição palha-solo. A palha situada na região de contato com o solo (0,0-2,5 cm) apresenta maior tempo de residência no campo em relação à palha localizada mais superficialmente, considerando-se que não há revolvimento desse resíduo vegetal nos sítios estudados. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0,0-2,5 cm por meio do anel volumétrico supracitado, sendo posteriormente peneiradas por meio de peneira com abertura de malha de 8 mm para remoção de raízes, meso e macrofauna. As amostras de palha foram picadas em pedaços pequenos ($0,75 \text{ cm}^2$) com auxílio de tesoura. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos selados, porém permeáveis a gases, à temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, antes do ajuste da umidade. A umidade inicial das amostras de palha e solo era de 602 ± 20 (média $\pm$ erro padrão da média) e $138 \pm 5 \text{ g kg}^{-1}$ para o sítio 1 respectivamente, e 243 ± 66 e $175 \pm 4 \text{ g kg}^{-1}$ para o sítio 2 respectivamente.

3.2.3. Extratos de palha e solo obtidos com H₂O e K₂SO₄

Após a amostragem nos sítios experimentais, quantificou-se a capacidade máxima de retenção de água (CMRA) das amostras de palha e solo. A CMRA foi determinada de acordo com a metodologia proposta por ISO (2003), com modificações. Para amostras de palha, o material vegetal foi acondicionado em frascos plásticos com fundo selado por membrana de *nylon* (abertura de malha de 0,075 mm) e permaneceu submerso em lâmina de H₂O por 24 h para saturação completa, seguido da drenagem da H₂O livre no material pelo contato com areia úmida em recipiente fechado por adicionais 24 h. A umidade de uma subamostra de palha de cada parcela, após secagem em estufa a 80°C por 24 h, representou a CMRA do material vegetal. A CMRA do solo foi obtida pela saturação das amostras em recipiente com H₂O por 3 h, sendo posteriormente colocadas sobre areia úmida durante 2 h. A CMRA foi quantificada com base na umidade de uma subamostra de solo seca em estufa a 105°C por 24 h. A umidade das amostras de palha e solo foi ajustada para 60% da CMRA. As amostras foram armazenadas em sala escura à temperatura de 20 ± 1°C antes das análises, sendo que a umidade das amostras era verificada a cada dois dias e corrigida quando necessário utilizando-se H₂O destilada.

Para o procedimento de extração, 6 cm³ de palha ou solo foram agitados com 30 mL de H₂O destilada ou de solução de K₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ durante 15 min em um agitador horizontal (Unimax 2010, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, ALE) a 200 rpm à 20°C. Para evitar perdas de C orgânico dissolvido (COD) e NOD devido à transformação microbiana durante a extração, este procedimento foi realizado à temperatura de 4°C para ambos os extratos (H₂O e K₂SO₄), em concordância com o protocolo de resfriamento de Rousk e Jones (2010). Os extratos de solo foram centrifugados a 8.000 rpm durante 10 min para decantação da fase sólida. A suspensão foi filtrada utilizando-se filtros para seringa Whatman® GD/X (membrana de politetrafluoroetileno; tamanho do poro de 0,2 µm) (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, GBR) para remoção de material particulado, que inclui células microbianas. Os extratos foram armazenados em frascos de polipropileno, à temperatura de 4°C.

3.2.4 Caracterização da palha e do solo

Exceto o C total, N total e umidade, todas as determinações foram avaliadas na base de volume (resultados expressos em cm^3 ou dm^3), em razão da elevada diferença na densidade aparente entre as amostras de palha e solo. A unidade de volume utilizada para soluções e frascos foi o litro (L). O pH e a condutividade elétrica foram determinados com eletrodos de vidro, utilizando-se o mesmo extrato (relação 1:2,5 v/v – palha ou solo: H_2O destilada). A capacidade de troca catiônica (CTC) foi determinada diretamente pelo método de extração utilizando-se solução salina não tamponada (SUMNER; MILLER, 1996). Resumidamente, os sítios trocáveis da palha e do solo foram saturados com NH_4^+ por meio de solução de NH_4Cl não tamponada, seguido da redução da força iônica do meio e posterior deslocamento do NH_4^+ adsorvido com solução de KNO_3 . A umidade da palha e do solo foi determinada pela secagem das amostras em estufa durante 24 h a 80 e 105°C respectivamente. O conteúdo de C total e N total foram determinados via combustão seca utilizando-se um analisador CHN2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI, EUA). As medições da respiração basal em um estado quase estacionário foram avaliadas utilizando-se 35 cm^3 de palha ou solo contido em frasco de centrífuga de 50 mL e conectado a um respirômetro automático multicanal com detecção do CO_2 evoluído por luz infravermelha (modelo SR1-IRGA, PP-Systems, Hitchin, GBR). Para a quantificação do C ativo do solo, também denominado de C oxidável por permanganato (COXP), amostras de palha e solo foram sujeitas à oxidação com solução de KMnO_4 (CULMAN et al., 2012) e posterior quantificação em um espectrofotômetro UV/Vis leitor de microplacas de 96 posições (Biotek PowerWave® HT, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). As propriedades básicas da palha e do solo dos sítios experimentais encontram-se na Tabela 3.1.

O conteúdo de N-NH_4^+ e N-NO_3^- nos extratos de palha e solo foi determinado colorimetricamente no leitor de microplacas supracitado. O conteúdo de N-NH_4^+ foi determinado pelo método do salicilato-nitroprussiato (MULVANEY, 1996), enquanto que o N-NO_3^- foi determinado pelo método do vanadato (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). O N inorgânico total (NIT) foi calculado pela soma do conteúdo de N-NH_4^+ e N-NO_3^- nas amostras. Um analisador de C orgânico total e N total em amostras líquidas (modelo multi N/C 2100S® TOC-TN Analyzer, Analytik Jena AG, Jena, ALE) foi utilizado na determinação do conteúdo de COD e N total dissolvido (NTD) nos extratos

Tabela 3.1 – Propriedades selecionadas de palha e solo (ambos amostrados na camada de 0,0-2,5 cm da zona de transição palha-solo) de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$)

Variável	pH 1:2,5 H ₂ O	CE ⁽¹⁾ $\mu\text{S cm}^{-1}$	CTC ⁽²⁾ $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$	Umidade ⁽³⁾ _____ g kg^{-1} _____	C total g kg^{-1}	N total	C/N	Respiração basal $\mu\text{mol C-CO}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$	COXP ⁽⁴⁾ mg dm^{-3}
Sítio 1									
Palha	7,3 $\pm$ 0,2	213 $\pm$ 18	39,3 $\pm$ 2,7 a*	1202 $\pm$ 61 a	271,8 $\pm$ 12,3 a	6,28 $\pm$ 0,17 a	43,3 $\pm$ 1,7 a	126,0 $\pm$ 12,6 a	1192 $\pm$ 62 a
Solo	6,6 $\pm$ 0,5	240 $\pm$ 26	27,6 $\pm$ 2,3 b	138 $\pm$ 2 b	6,7 $\pm$ 0,4 b	0,89 $\pm$ 0,03 b	7,5 $\pm$ 0,4 b	13,1 $\pm$ 0,5 b	540 $\pm$ 37 b
<i>P</i>	0,229	0,429	0,017	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Sítio 2									
Palha	7,0 $\pm$ 0,1 a	102 $\pm$ 1	23,8 $\pm$ 2,5 b	1551 $\pm$ 47 a	421,8 $\pm$ 4,7 a	7,86 $\pm$ 0,57 a	54,5 $\pm$ 3,7 a	158,7 $\pm$ 5,2 a	1256 $\pm$ 54 a
Solo	5,7 $\pm$ 0,1 b	120 $\pm$ 10	62,4 $\pm$ 1,5 a	254 $\pm$ 3 b	13,8 $\pm$ 0,3 b	1,66 $\pm$ 0,03 b	8,3 $\pm$ 0,1 b	11,6 $\pm$ 0,2 b	546 $\pm$ 14 b
<i>P</i>	< 0,001	0,102	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

⁽¹⁾ CE: condutividade elétrica; ⁽²⁾ CTC: capacidade de troca catiônica; ⁽³⁾ Umidade: 60% da CMRA; ⁽⁴⁾ COXP: C oxidável por permanganato

* Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferenças entre palha e solo para cada sítio pelo teste t ($P \leq 0,05$)

de palha e solo, como descrito por Jones et al. (2004). O conteúdo de NOD foi obtido pela diferença entre o NTD e NIT. O conteúdo de aminoácidos totais livres (ATL) foi determinado em um fluorímetro leitor de microplacas (Cary Eclipse, Varian Australia) com ftalaldeído- β -mercaptoetanol proposto por Jones, Owen e Farrar (2002). O conteúdo de compostos fenólicos dissolvidos foi determinado pelo método de Swain e Hillis (1959), usando-se o reagente Folin-Ciocalteu (F9252; Sigma-Aldrich Inc.) e posterior leitura em espectrofotômetro de microplaca.

3.2.5 Estrutura da comunidade microbiana

A estrutura da comunidade microbiana foi determinada por meio da análise de perfis cromatográficos de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA), de acordo com o procedimento MIDI-FA, descrito em Buyer e Sasser (2012). Após amostragem no campo, as amostras de palha e solo (15 g) foram armazenadas em congelador à temperatura de -20°C até o início das determinações. Resumidamente, as amostras (2 g) foram liofilizadas, adicionando-se em seguida o extrator de Bligh-Dyer (4 mL) contendo padrão interno. Os tubos foram então agitados num banho de limpeza ultrassônico durante 10 min à temperatura ambiente, antes da agitação rotacional durante 2 h. Após centrifugação por 10 min, a fase líquida foi transferida para tubos de ensaio esterilizados com tampa de rosca (100 mm altura e 13 mm de diâmetro interno), adicionando-se a seguir 1 mL de clorofórmio e de H_2O . A fase superior foi removida por aspiração e descartada, enquanto que a fase inferior, que continha os lipídios extraídos, foi evaporada a 30°C . As classes de lipídios foram separadas por extração de fase sólida (EFS) utilizando-se microplaca de EFS contendo 50 mg de sílica por posição (total de 96 posições) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Os fosfolipídios foram precipitados com 0,5 mL de solução composta de clorofórmio, metanol e H_2O (relação 5:5:1 – v/v/v) (FINDLAY, 2004) dentro de frascos de vidro, com posterior evaporação da solução (70°C , 30 min). Para formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), necessários para posterior análise, o reagente de transesterificação (0,2 mL) foi adicionado a cada frasco, que foi selado e incubado a 37°C por 15 min. Foi adicionado na sequência solução de ácido acético $0,075\text{ mol L}^{-1}$ e clorofórmio, ambos no volume de 4 mL. O clorofórmio foi evaporado, sendo as amostras dissolvidas em hexano. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (CG) equipado com amostrador automático e detector de ionização de chama (modelo

Agilent 6890, Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA) para quantificação dos FAMES. Os FAMES foram separados em uma coluna Agilent Ultra 2 (25 m de comprimento, 0,2 mm de diâmetro interno e 0,33 µm de espessura do filme), e posteriormente identificados utilizando-se o padrão de calibração MIDI PLFAD1 e bibliotecas de perfis de ácidos graxos.

Os ácidos graxos foram somados dentro dos seguintes grupos biomarcadores: i) eucariotos: ácidos graxos poli insaturados (ZELLES, 1999); ii) fungos micorrízicos arbusculares: 16:1ω5 c (FROSTEGÅRD; TUNLID; BÅÅTH, 2011); iii) bactérias Gram-positivas: ácidos graxos saturados ramificados iso e anteiso (ZELLES, 1999); iv) bactérias Gram-negativas: ácidos graxos mono insaturados e 17:0 e 19:0 ciclopropil (ZELLES, 1999); v) actinobactérias: ácidos graxos 10-metil (ZELLES, 1999); vi) fungos: 18:2ω6 c (FROSTEGÅRD; BÅÅTH, 1996); vii) bactérias anaeróbias: 14:1ω7cDMA, 15:0DMA, 16:1ω7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA e 19:0cyclo9,10DMA (FROSTEGÅRD; TUNLID; BÅÅTH, 1991; ZELLES, 1997, 1999) Estes biomarcadores não são inteiramente específicos para seus grupos taxonômicos e devem ser interpretados com cautela (ZELLES, 1997).

3.2.6 Reações de ¹⁴C-compostos do NOD relacionadas ao ciclo do C

Para o estudo da mineralização de C de compostos do NOD, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x4, com quatro repetições. Os tratamentos do primeiro fator foram a palha e o solo dos sítios experimentais, enquanto que o fator secundário foi compreendido pelos compostos exógenos da fração do NOD (mistura de aminoácidos, peptídeos, ureia e proteína) marcados em ¹⁴C. Amostras de palha e solo (4 cm³) foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL, adicionando-se em seguida, por meio de pipeta automática, 0,1 mL de solução contendo NOD. As soluções utilizadas foram: mistura de aminoácidos (17 de aminoácidos), peptídeos (50% de L-Ala-Ala e 50% L-Ala-Ala-Ala), ureia e proteína (isolada de folhas de tabaco), todas com concentração final de 0,1 mmol L⁻¹. Os compostos do NOD eram marcados em ¹⁴C (radioatividade de 9.990 MBq mmol⁻¹ L), e cada amostra apresentava radioatividade de 41,7 kBq dm⁻³. A dose adicionada dos compostos foi determinada com base no conteúdo médio dos compostos do NOD no solo (JONES et al., 2005a). A mistura de aminoácidos continha, em proporções equimolares, os seguintes L-aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina,

arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tionina, tirosina e valina. As perdas de H₂O das amostras foram desprezíveis durante o período de incubação, não sendo necessária a correção de umidade.

Para capturar o ¹⁴CO₂ evoluído das amostras, um frasco de polipropileno contendo 1 mL de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ foi inserido sobre as amostras de palha e solo, e fechou-se hermeticamente o tubo de centrífuga de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em um incubador e mantidas a 20°C. A temperatura ajustada no incubador reflete a temperatura na interface palha-solo encontrada em canaviais da região sudeste do Brasil. Para quantificar o ¹⁴CO₂ respirado, as armadilhas foram trocadas 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h após a marcação com ¹⁴C. Após a remoção, o conteúdo de ¹⁴CO₂ capturado na solução de NaOH foi determinado por cintilação líquida utilizando-se um coquetel de cintilação (Scintisafe 3®, Fisher Scientific UK Ltd., Leicestershire, GBR) e um contador de cintilação líquida (Wallac 1404, Wallac EG&G, Milton Keynes, GBR). Ao fim do período de incubação, para quantificação do ¹⁴C trocável adsorvido na superfície de coloides, as amostras de palha e o solo foram agitadas com 25 mL de solução de K₂SO₄ resfriada a 4°C por 15 min (200 rpm) (ROUSK; JONES, 2010) e centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi então recuperado para contagem da cintilação como descrito anteriormente.

Estudos prévios indicaram que a mineralização do C de compostos orgânicos apresenta um padrão bifásico no solo (CHOTTE et al., 1998; ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GLANVILLE et al., 2012). Este padrão bifásico pode ser estimado ajustando os dados a uma equação exponencial decrescente dupla de primeira ordem, como descrito na eq. (3.1) a seguir:

$$f = (a_1 \times \exp^{-k_1 t}) + (a_2 \times \exp^{-k_2 t}) \quad (3.1)$$

onde f é o conteúdo do composto marcado em ¹⁴C remanescente na amostra; a_1 descreve o conteúdo de ¹⁴C alocado no primeiro reservatório mineralizável; e k_1 é a taxa constante para a_1 . A proporção de C particionado para o a_2 , segundo reservatório mineralizável e mais lento, é descrito pela taxa constante k_2 . A meia-vida do primeiro

reservatório de mineralização a_1 ($t_{1/2}$) foi então calculada por meio da eq. (3.2), como segue:

$$t_{1/2} = \left(\frac{\ln(2)}{k_1} \right) \quad (3.2)$$

O cálculo da meia-vida para a segunda fase a_2 é objeto de incerteza visto que a conectividade entre os reservatórios a_1 e a_2 ainda é desconhecida (SAGGAR et al., 1999; BODDY et al., 2007).

Qualquer ^{14}C não recuperado tanto nas armadilhas de NaOH quanto no extrato de K_2SO_4 foi assumido como degradação de cada composto do NOD aplicado. A eficiência dessa conversão, denominada de eficiência de uso do C (EUC), foi determinada por meio da eq. (3.3) abaixo:

$$\text{EUC} = \left[\frac{\text{BM}}{(\text{BM} + \text{CO}_2 + \text{K}_2\text{SO}_4)} \right] \quad (3.3)$$

onde *EUC* representa a conversão de compostos orgânicos carbonáceos em produtos microbianos; *BM* descreve o conteúdo de ^{14}C assumido como alocado na biomassa microbiana; CO_2 é o conteúdo de ^{14}C evoluído das amostras na forma de $^{14}\text{CO}_2$; e K_2SO_4 é o conteúdo de ^{14}C recuperado nos extratos de K_2SO_4 .

No estudo da esterilização dos substratos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2, com quatro repetições. O fator primário se manteve (palha e solo), enquanto que o fator secundário compreendeu os seguintes modos de esterilização: esterilização por calor e sem esterilização (controle). O tratamento de esterilização foi utilizado para averiguar se a degradação de compostos orgânicos carbonáceos é ou não controlada por um processo biológico. O método é essencialmente idêntico ao descrito acima para o estudo da mineralização de C de compostos marcados em ^{14}C , com a exceção de que é utilizada glicose (^{14}C -D-glicose-1) como fonte de C orgânico. A referida esterilização por calor, efetuada imediatamente antes da aplicação da solução de ^{14}C -glicose, foi realizada mediante acondicionamento de subamostras de palha e solo em frascos lacrados de polipropileno em estufa à 80°C por 90 min. Em seguida, incubações de 1,6 cm³ dos

substratos (palha e solo) em tubos de centrífuga de 50 mL foram realizadas com a aplicação de 0,1 mL de solução de ^{14}C -glicose (10 mmol L^{-1} ; radioatividade de $41,7 \text{ kBq dm}^{-3}$ por amostra), com posterior quantificação do $^{14}\text{CO}_2$ evoluído após período de 1 h.

A sorção de compostos orgânicos nitrogenados à fase sólida de palha e solo foi determinada inicialmente pelo emprego do pré-tratamento com esterilização por calor para prevenção da mineralização microbiana dos compostos adicionados às amostras durante o estudo (KUZYAKOV; JONES, 2006). O delineamento experimental e os tratamentos aqui adotados foram os mesmos utilizados no estudo da mineralização de C dos compostos do NOD. Diferentes concentrações, variando de 0 a 1 mmol L^{-1} , de soluções dos compostos marcados em ^{14}C anteriormente utilizados (mistura de aminoácidos; peptídeos; ureia e proteína isolada de folhas de tabaco) foram preparadas utilizando-se H_2O destilada como solvente. A radioatividade da solução estoque de cada um dos compostos era de $9.990 \text{ MBq mmol}^{-1} \text{ L}$. Resumidamente, 4 mL de cada das soluções marcadas em ^{14}C foram adicionadas em tubos de centrífuga de 50 mL contendo $0,64 \text{ cm}^3$ de palha ou solo previamente esterilizado. Após a marcação com ^{14}C , a radioatividade das amostras era de $41,7 \text{ kBq dm}^{-3}$. A seguir, as amostras contendo as soluções de sorção foram agitadas durante 30 min a 200 rpm. Imediatamente após a agitação, as suspensões de palha e solo foram centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi recuperado para determinação do ^{14}C como descrito anteriormente. Uma isoterma de sorção linear de Freundlich foi ajustada aos dados experimentais utilizando-se a eq. (3.4), que segue abaixo:

$$S = K_d \times CES \quad (3.4)$$

onde S é o conteúdo de composto sorvido na fase sólida da palha ou solo (mmol dm^{-3}); K_d é o coeficiente de partição; e CES representa a concentração de equilíbrio da solução ao fim do experimento (mmol L^{-1}). Os coeficientes de partição (K_d) foram calculados com base na eq. (3.5), descrita a seguir:

$$K_d = \left(\frac{S}{CES} \right) \quad (3.5)$$

3.2.7 Mineralização de ^{14}C -glicose associada ou não a N mineral exógeno

Para o estudo de mineralização da ^{14}C -glicose influenciada pelas formas minerais de N, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2×3 . O primeiro fator foi compreendido pela palha e solo dos sítios experimentais, enquanto que o segundo fator envolveu a adição de ^{14}C -glicose associada ou não às formas minerais de N (^{14}C -glicose, ^{14}C -glicose + amônio, ^{14}C -glicose + nitrato). Para o estudo da variação temporal de N mineral nos substratos, foi incluído um tratamento controle no fator secundário. Inicialmente, amostras de palha e solo (4 cm^3) previamente incubadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e com umidade equivalente a 60% da CMRA foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL. Na sequência, adicionaram-se às amostras os seguintes tratamentos: 0,1 mL de solução de ^{14}C -glicose 50 mmol L^{-1} (glicose); 0,05 mL de solução de ^{14}C -glicose 100 mmol L^{-1} + 0,05 mL de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a $125 \text{ mg dm}^{-3} \text{ N-NH}_4^+$) (glicose + amônio) e 0,05 mL de solução de ^{14}C -glicose 100 mmol L^{-1} + 0,05 mL de solução de KNO_3 $0,54 \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a $125 \text{ mg dm}^{-3} \text{ N-NO}_3^-$) (glicose + nitrato). Um tratamento controle (sem adição de ^{14}C -glicose ou N mineral) também foi incluído. A quantidade de N mineral utilizada, equivalente a 120 kg ha^{-1} de N, reflete a dose usual de N aplicada anualmente em soqueiras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. A quantidade de glicose adicionada representa, em média, 25% do C ativo disponível (quantificado como COXP) nas amostras de palha e solo de cana-de-açúcar. A atividade específica da ^{14}C -glicose (D-glicose-1) era de $9.990 \text{ MBq mmol}^{-1} \text{ L}$, enquanto que a atividade em cada amostra era de $41,7 \text{ kBq dm}^{-3}$.

A captura de qualquer $^{14}\text{CO}_2$ evoluído das amostras foi realizada pela inserção de um frasco de polipropileno contendo 1 mL de solução de NaOH sobre as amostras de palha e solo. Em seguida os frascos de centrífuga foram fechados hermeticamente e incubados a 20°C . Para quantificação do $^{14}\text{CO}_2$ respirado, as armadilhas de NaOH foram trocadas após 1, 3, 6, 10, 24, 48, 72, 120 e 168 h da aplicação dos tratamentos, sendo o $^{14}\text{CO}_2$ capturado determinado por contagem de cintilação líquida, de acordo com protocolo supracitado. Para quantificação da ^{14}C -glicose trocável adsorvida na superfície de coloides, ao final da incubação (168 h) as amostras de palha e o solo foram agitadas com 25 mL de solução de K_2SO_4 resfriada a 4°C por 15 min (200 rpm) (ROUSK; JONES, 2010) e centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi então recuperado para contagem da cintilação de ^{14}C . Para determinação da dinâmica

de mineralização da ^{14}C -glicose na palha e solo de cana-de-açúcar associada ou não à adição de N mineral, os resultados do ^{14}C remanescente nas amostras ao longo do tempo de incubação foram ajustados ao modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem descrito pela eq. (3.1). O $t_{1/2}$ do primeiro reservatório de mineralização da ^{14}C -glicose foi calculado por meio da eq. (3.2), enquanto que a EUC pela biomassa microbiana foi mensurada pela eq. (3.3).

A estimativa no tempo zero (0 h) das amostras de palha e solo para o conteúdo de N-NH_4^+ e N-NO_3^- após a adição dos tratamentos foi obtida pela soma do conteúdo de N mineral extraído com K_2SO_4 antes da instalação do experimento, com o conteúdo de N mineral exógeno adicionado via $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KNO_3 . O conteúdo de N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) no tempo zero foi estimado, ao invés de ser quantificado, devido às transformações microbianas que podem ocorrer com o N mineral na palha e no solo, como imobilização e nitrificação, por exemplo, resultando em valores de recuperação abaixo de 100%. Ao fim do período experimental (168 h), o extrato de K_2SO_4 utilizado originalmente para se determinar a ^{14}C -glicose solúvel e trocável remanescente nas amostras foi também utilizado para quantificação do conteúdo de N-NH_4^+ e N-NO_3^- (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001; MULVANEY, 1996) em todos os tratamentos, incluindo-se o controle.

3.2.8 Análises estatísticas

Os resultados de todas as determinações foram analisados separadamente para os sítios 1 e 2, com exceção da análise estatística multivariada (MANOVA) da estrutura da comunidade microbiana. Todas as determinações foram reportadas na forma dos valores médios, seguido do erro padrão da média (EPM). Para análise da caracterização físico-química e concentrações de C e N dos extratos entre a palha e o solo de cada sítio, foi utilizado o teste t ($P \leq 0,05$) utilizando-se o procedimento TTEST do SAS (versão 9.3, 2010, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Para os resultados da mineralização e sorção de ^{14}C -compostos do NOD, esterilização por calor e mineralização da ^{14}C -glicose (associada ou não ao N mineral), a análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do SAS por meio do teste F, seguido do teste LSD de Fisher, com significância definida de $P \leq 0,05$.

Os PLFAs identificados na cromatografia gasosa foram combinados dentro dos grupos biomarcadores (eucariotos, fungos micorrízicos arbusculares, bactérias Gram-

positivas, bactérias Gram-negativas, actinobactéria, fungos e anaeróbios). Os resultados da composição da comunidade microbiana foram transformados utilizando-se a transformação de Hellinger (BUYER et al., 2010), dada pela raiz quadrada do resultado proporcional de cada tipo de PLFA ou grupo microbiano. Os resultados da proporção dos grupos microbianos na palha e solo foram então submetidos ao teste t ($P \leq 0,05$). A MANOVA da proporção dos PLFA biomarcadores identificados foi obtida por meio da análise dos componentes principais do SAS (procedimento PRINCOMP), com base na matriz de covariância estabelecida.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Química dos extratos de H_2O e K_2SO_4

Em relação às frações minerais do N dissolvido, foi verificado maior valor de $N-NH_4^+$ nos extratos de H_2O e K_2SO_4 na palha em relação ao solo no sítio 1 (Tabela 3.2). Contudo, os valores encontrados de $N-NH_4^+$ na palha e solo nos dois sítios foram extremamente baixos (menores que $1 \text{ mg dm}^{-3} N-NH_4^+$), indicando alta taxa de consumo da fração amoniacal, possivelmente ocasionada pela imobilização do NH_4^+ na palha, além da nitrificação no solo. A relação C/N contrastante da palha com o solo (Tabela 3.1) auxilia na explicação dessa hipótese, visto que a relação C/N é um potencial indicador dos processos de imobilização e mineralização líquida de N (BRADY; WEIL, 2007). O conteúdo de $N-NO_3^-$ no solo foi superior ao obtido na palha, em ambos os sítios experimentais e extratos utilizados (H_2O e K_2SO_4). Os elevados valores de $N-NO_3^-$ verificados no solo podem ser explicados pelo manuseio das amostras no laboratório (peneiramento), que resultaram em aumento na aeração e consequente estímulo à nitrificação. Raison, Connel e Khanna (1987) também verificaram aumento nas taxas de mineralização líquida e nitrificação no solo devido ao distúrbio (peneiramento e incubação) em amostras de solo. Os baixos valores de $N-NH_4^+$ nos dois solos podem indicar ainda alto consumo da referida fração amoniacal como substrato para a nitrificação. O mesmo padrão de resultados do $N-NO_3^-$ foi verificado para o NIT. O NIT representou, em média, 4,8 e 75,7% do NTD (NIT + NOD) para as amostras de palha e solo extraídas com H_2O respectivamente. Para as amostras extraídas com K_2SO_4 , o NIT representou 4,8 e 79,8% do NTD na palha e solo de ambos os sítios. Os valores da proporção de NIT em relação ao NTD para os

Tabela 3.2 – Concentrações de C e N de extratos de H₂O e K₂SO₄ obtidos de palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os valores representam a média ± erro padrão da média ($n = 4$)

Variável	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	NIT ⁽¹⁾ mg dm ⁻³ N	NOD ⁽²⁾	ATL ⁽³⁾	Fenólicos mg dm ⁻³	COD ⁽⁴⁾ mg dm ⁻³ C	COD/NOD
Extrato de H₂O								
Sítio 1								
Palha	0,34 ± 0,04	0,03 ± 0,03 b	0,37 ± 0,06 b	7,8 ± 1,0 a	2,53 ± 0,43	8,02 ± 0,90 a	131,6 ± 13,6 a	17,1 ± 1,2 a
Solo	0,18 ± 0,03 b	20,09 ± 3,12 a	20,27 ± 3,10 a	4,2 ± 0,3 b	< 0,01	0,40 ± 0,05 b	31,1 ± 4,3 b	7,6 ± 1,2 b
<i>P</i>	0,021	< 0,001	< 0,001	0,014	...	< 0,001	0,001	0,002
Sítio 2								
Palha	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,10 b	0,31 ± 0,13 b	5,8 ± 0,9	1,76 ± 0,36 a	12,23 ± 0,87 a	135,0 ± 23,9 a	23,4 ± 1,8 a
Solo	0,20 ± 0,04	8,11 ± 2,22 a	8,32 ± 2,26 a	3,8 ± 0,9	0,21 ± 0,20 b	1,85 ± 0,21 b	25,9 ± 2,4 b	7,7 ± 1,4 b
<i>P</i>	0,208	0,012	0,012	0,165	0,009	< 0,001	0,004	< 0,001
Extrato de K₂SO₄								
Sítio 1								
Palha	0,33 ± 0,11 a	0,04 ± 0,02 b	0,33 ± 0,11 b	6,0 ± 0,9	3,76 ± 0,13	8,15 ± 0,61 a	121,3 ± 4,3 a	21,4 ± 2,6 a
Solo	0,01 ± 0,01 b	31,10 ± 5,55 a	31,11 ± 5,55 a	4,2 ± 1,2	< 0,01	0,82 ± 0,26 b	32,7 ± 2,1 b	9,2 ± 1,9 b
<i>P</i>	0,023	0,001	0,001	0,297	...	< 0,001	0,001	0,010
Sítio 2								
Palha	0,11 ± 0,02	0,30 ± 0,30 c	0,41 ± 0,30 c	6,7 ± 1,0	3,40 ± 0,39	9,75 ± 0,59 a	139,7 ± 7,8	22,2 ± 3,2
Solo	0,65 ± 0,30	19,00 ± 1,22 b	19,65 ± 1,01 b	7,8 ± 0,7	3,84 ± 0,29	2,37 ± 0,59 b	148,2 ± 8,8	19,2 ± 0,7
<i>P</i>	0,124	< 0,001	< 0,001	0,366	0,401	< 0,001	0,495	0,389

⁽¹⁾ NIT: N inorgânico total; ⁽²⁾ NOD: N orgânico dissolvido; ⁽³⁾ ATL: aminoácidos totais livres; ⁽⁴⁾ COD: C orgânico dissolvido

* Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferenças entre palha e solo para cada extrato e sítio pelo teste t ($P \leq 0,05$).

... Dado numérico não disponível

solos deste estudo são maiores que os reportados por Roberts, Bol e Jones (2007) e Jones e Kielland (2012), porém semelhantes aos verificados por Ge et al. (2012).

Na comparação dos extratores utilizados na quantificação das formas minerais do N dissolvido, maiores valores de N-NO_3^- foram observados no solo do sítio 2 pelo uso do K_2SO_4 comparativamente à H_2O (aumento de 2,3 vezes) ($P < 0,01$), indicando que o N-NO_3^- estava adsorvido fracamente na superfície de colóides carregados positivamente ou mesmo retido na camada difusa (HINGSTON et al., 1974; HSU, 1989). A utilização de H_2O como extrator não foi suficiente para extrair o N-NO_3^- trocável, sendo necessário o deslocamento do ânion supracitado por meio do SO_4^{2-} , que possui afinidade moderada com superfícies carregadas positivamente (HSU, 1989).

Em relação às frações orgânicas e suas razões, foram verificados maiores valores de COD, NOD, relação COD/NOD e compostos fenólicos no extrato de H_2O na palha comparativamente ao solo do sítio 1 (Tabela 3.2). As diferenças encontradas no extrato de H_2O se mantiveram para o extrato de K_2SO_4 , com exceção para o conteúdo de NOD, que passou a não diferir entre a palha e o solo. Não foi possível comparar os valores de ATL no sítio 1 em ambos os extratos utilizados, devido aos valores extremamente reduzidos desse atributo (abaixo do limite de detecção do fluorímetro) para as amostras de solo. No sítio 2, maiores valores de COD, relação COD/NOD, ATL e compostos fenólicos foram observados na palha comparativamente ao solo para o extrato de H_2O . No extrato de K_2SO_4 , contudo, apenas conteúdo de compostos fenólicos foi superior na palha em relação ao solo. Os valores de COD, NOD, relação COD/NOD e compostos fenólicos nas amostras de palha e solo quantificados nos extratos de H_2O e K_2SO_4 deste estudo são próximos dos reportados na literatura, enquanto que o conteúdo de ATL é mais elevado (ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GE et al., 2012; JONES; KIELLAND, 2012; VERSINI et al., 2014). A relação COD/NOD se manteve próxima da relação C/N no solo do sítio 1, para ambos os extratores utilizados. Com a adoção do K_2SO_4 , a relação COD/NOD no solo do sítio 2 foi aumentada 2,5 vezes em relação à H_2O , devido à massiva dessorção de COD pelo extrator salino. A relação COD/NOD da palha foi inferior à sua relação C/N em ambos os sítios, indicando liberação acentuada de compostos nitrogenados a partir do resíduo cultural. A fração orgânica (NOD) constituiu a maior parte do NTD nas amostras de palha, enquanto que a fração mineral (NID) foi a mais representativa para as amostras de solo, independentemente do extrator utilizado. Os ATL representaram,

em média, 31,3 e 5,5% do NOD na palha e solo no extrato de H₂O respectivamente. Para o extrato de K₂SO₄, os ATL constituíram 55,9 e 49,2% do NOD na palha e solo respectivamente. Em relação ao COD, os ATL na palha e solo representaram, respectivamente, 1,6 e 0,8% desse atributo quando a H₂O foi o extrator empregado, enquanto que constituíram 2,7 e 2,6% do COD, respectivamente, para as amostras de palha e solo extraídas com K₂SO₄.

A comparação entre os extratores indicou maior conteúdo de ATL na palha de ambos os sítios pela utilização do K₂SO₄ comparativamente à H₂O ($P < 0,01$). Não foram verificadas alterações nos valores dos atributos do solo de textura franco-arenosa (sítio 1) pelo uso dos diferentes extratores. Para o solo de textura argilosa (sítio 2), maiores valores de COD, NOD, relação COD/NOD e ATL foram encontrados quando o extrator utilizado foi o K₂SO₄ em substituição à H₂O ($P < 0,01$), com destaque para o aumento de 5,7 vezes no conteúdo de COD quando extraído com K₂SO₄. Jones et al. (2012) também verificaram maiores valores de NOD quando foi utilizado KCl 2 mol L⁻¹ como solução extratora, em comparação com a H₂O. Os resultados obtidos na comparação entre os extratores H₂O e K₂SO₄ indicaram claramente que os compostos orgânicos das frações do COD e NOD podem ser adsorvidos na superfície de coloides minerais ou orgânicos. O fenômeno da adsorção de compostos orgânicos do NOD de baixo e alto peso molecular é relatado na literatura (ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GE et al., 2012). Todavia, é sugerido que a maior parte dos compostos do NOD na solução seja de alto peso molecular e de caráter recalcitrante, não disponível aos microrganismos e plantas (JONES et al., 2005a). Ainda assim, é possível inferir que a fração do COD ou NOD adsorvida na fase sólida dos coloides possa atuar como compartimento de reserva das referidas frações orgânicas, liberando gradualmente os compostos orgânicos para a solução do solo em caso de absorção pela biomassa microbiana ou plantas (CHAPIN; MOILANEN; KIELLAND, 1993; JONES et al., 2005a; HILL et al., 2011). Como os aminoácidos e peptídeos podem apresentar cargas positivas, negativas ou neutras (GE et al., 2012), a capacidade de troca catiônica (CTC) e aniônica (CTA) nos solos parece ter grande importância na adsorção de compostos do NOD de baixo peso molecular. Desse modo, é provável que em solos cultivados com cana-de-açúcar no sistema de colheita sem queima, a palha superficial atue como uma significativa fonte de COD e NOD, enquanto que o solo opere como um dreno, por meio da adsorção, embora variável, dos compostos orgânicos na fase sólida.

3.3.2 Estrutura da comunidade microbiana

A estrutura da comunidade microbiana quantificada por meio da análise de PLFA indicou diferenças consistentes entre palha e solo nos dois sítios em relação à composição dos grupos microbianos identificados por meio dos biomarcadores (Tabela 3.3). Maior proporção de eucariotos, bactérias Gram-positivas e fungos foram detectados na palha em relação ao solo para ambos os sítios. Foi verificada também maior proporção de fungos micorrízicos arbusculares na palha no sítio 2. Por outro lado, maior porcentagem de bactérias Gram-negativas e actinobactérias foram observadas no solo comparativamente à palha. A proporção de bactérias anaeróbias, por sua vez, não diferiu em nenhum sítio experimental. As diferenças marcantes das propriedades químicas e biológicas entre a palha e solo (Tabelas 3.1 e 3.2) podem explicar as diferenças nas proporções dos grupos microbianos entre os dois meios. Contudo, não foram encontrados estudos envolvendo a análise de PLFA em palha e solos de cana-de-açúcar, impossibilitando a comparação de resultados.

Em ambos os sítios, a relação fungos/bactérias foi mais elevada na palha em relação ao solo ($P < 0,001$; resultados não apresentados). Este resultado é congruente com o estudo de Frostegård e Bååth (1996), que sugeriram a ocorrência de maiores valores da relação fungos/bactérias em solos de florestas comparativamente a solos agrícolas, pelo maior conteúdo de matéria orgânica do primeiro solo. Todavia, o PLFA biomarcador usualmente utilizado para a identificação de fungos (18:2 ω 6 c) não é exclusivo para os organismos desse reino, mas também comum a outros organismos eucarióticos, como as plantas (ZELLES, 1999; FROSTEGÅRD; TUNLID; BÅÅTH, 2011). Embora Kaiser et al. (2010) tenham demonstrado que a interferência de fontes vegetais (raízes de plantas) nos biomarcadores PLFA para fungos foi mínima, os resultados da proporção de fungos na estrutura da comunidade microbiana dos tratamentos devem ser interpretados com cautela, especialmente nas amostras de palha, ricas em células vegetais.

A análise dos componentes principais da proporção dos biomarcadores de PLFA identificados para as amostras de palha e solo (Figura 3.1) indicou que 68% da variação dos resultados pode ser explicada por meio do componente principal 1 (CP1), que descreveu a relação fungos/actinobactérias (relação entre os biomarcadores 18:2 ω 6 c e 10-metil). Assim, é possível verificar que as amostras de palha, situadas à direita no eixo do CP1, diferiram grandemente das amostras de solo, localizadas na

Tabela 3.3 – Estrutura da comunidade microbiana mensurada por meio dos ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA) de palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$)

Variável	Eucariotos	FMA ⁽¹⁾	Gram-positivas ⁽²⁾	Gram-negativas ⁽³⁾	Actinobactérias	Fungos	Anaeróbios ⁽⁴⁾
%							
Sítio 1							
Palha	2,14 ± 0,21 a*	5,83 ± 0,22	28,6 ± 0,9 b	43,7 ± 1,1 a	9,66 ± 0,16 b	8,82 ± 1,11 a	1,31 ± 0,09
Solo	0,87 ± 0,13 b	4,88 ± 0,37	34,2 ± 0,5 a	39,1 ± 0,8 b	18,04 ± 0,79 a	2,31 ± 0,19 b	0,58 ± 0,21
P	0,002	0,070	0,002	0,014	< 0,001	< 0,001	0,078
Sítio 2							
Palha	3,05 ± 0,41 a	5,70 ± 0,19 a	26,3 ± 0,6 b	42,9 ± 1,2 a	9,20 ± 0,20 b	11,73 ± 0,73 a	1,07 ± 0,18
Solo	0,59 ± 0,11 b	4,28 ± 0,12 b	37,3 ± 0,1 a	35,5 ± 0,2 b	20,17 ± 0,58 a	1,08 ± 0,09 b	1,13 ± 0,17
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,785

⁽¹⁾ FMA: fungos micorrízicos arbusculares; ⁽²⁾ Gram-positivas: bactérias Gram-positivas; ⁽³⁾ Gram-negativas: bactérias Gram-negativas; ⁽⁴⁾ Anaeróbios: bactérias anaeróbias

* Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferenças entre palha e solo para cada sítio pelo teste t ($P \leq 0,05$)

Figura 3.1 – Análise dos componentes principais (ACP) da composição da comunidade microbiana, com base na proporção dos tipos de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA), em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os números entre parênteses no título dos eixos representa a porcentagem de variação explicada por cada um dos componentes

extremidade oposta, formando-se assim dois grupos distintos. Como verificado anteriormente na análise univariada (Tabela 3.3), maior proporção de fungos foi detectada na palha em relação ao solo de ambos os sítios, enquanto que uma maior ocorrência de actinobactérias foi observada no solo quando comparada à palha de cana-de-açúcar.

O componente principal 2 (CP2), que explicou 13% da variação dos resultados, descreveu a relação entre bactérias anaeróbias e fungos (relação entre os biomarcadores DMA e ácidos graxos de cadeia linear) nas amostras. Nesse caso, há relativa sobreposição de comportamento para as amostras de palha e de solo, exceto para uma das amostras de solo do sítio experimental 1 (localizada na extremidade inferior do eixo do CP2), que não apresentou ocorrência de bactérias anaeróbias, dispersando-se com intensidade das amostras restantes. No entanto, foi possível identificar dois grupos distintos, formados pelas amostras de solo do sítio 1 (excetuando-se a amostra dispersa descrita acima) e do sítio 2. O grupo do solo argiloso (sítio 2) apresentou maior ocorrência de bactérias anaeróbias e menor proporção de fungos comparativamente ao outro grupo (solo do sítio 1). A menor umidade gravimétrica (em g kg⁻¹) do solo franco-arenoso (sítio 1) comparativamente ao solo argiloso (sítio 2) (Tabela 3.1) pode explicar a menor proporção de bactérias anaeróbias nas amostras de solo do primeiro sítio experimental.

3.3.3 Mineralização e sorção dos compostos do NOD

Como esperado, a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente dos compostos da fração do NOD marcados em ^{14}C (mistura de aminoácidos, peptídeos, ureia e proteína) e aplicados em amostras de palha ou solo apresentou um padrão bifásico, marcado por uma fase inicial rápida seguida de uma fase secundária mais lenta (Figura 3.2), como é descrito por diversos autores (ROBERTS; BOL; JONES, 2007; HILL; FARRAR; JONES, 2008; OBURGER; JONES, 2009; GE et al., 2012; GLANVILLE et al., 2012). Os resultados de mineralização de ^{14}C de todos os compostos foram ajustados adequadamente à equação exponencial decrescente dupla de primeira ordem (R^2

Figura 3.2 – Conteúdo remanescente de mistura de 17 aminoácidos (A), peptídeos (L-Ala-Ala e L-Ala-Ala-Ala) (B), ureia (C) e proteína (isolada de folhas de tabaco) (D), todos marcados em ^{14}C e aplicados em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os pontos representam os valores médios e as barras verticais o erro padrão da média ($n = 4$). As linhas representam o ajuste dos dados a um modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre palha e solo para o sítio 1, enquanto que letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre palha e solo para o sítio 2, ambas pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

médio para a mistura de aminoácidos em todos os tratamentos = $0,988 \pm 0,001$; R^2 médio para os peptídeos em todos os tratamentos = $0,993 \pm 0,001$; R^2 médio para a ureia em todos os tratamentos = $0,988 \pm 0,002$; R^2 médio para a proteína em todos os tratamentos = $0,992 \pm 0,001$). A mudança abrupta entre os reservatórios das fases rápida e lenta de mineralização no modelo ajustado para os dados ^{14}C remanescente dos peptídeos (Figura 3.2B) e ureia (Figura 3.2C) se deve à alta taxa de mineralização do ^{14}C (k_1) na fase rápida de ambos os compostos. No entanto, o valor de R^2 para a equação de ajuste foram superiores a 0,980, com significância para todos os coeficientes ($P < 0,001$), considerando-se todos os tratamentos envolvidos. O ajuste dos dados para um modelo exponencial decrescente simples de primeira ordem resultou em valores inferiores de R^2 , optando-se assim pela manutenção do modelo originalmente proposto.

O conteúdo remanescente de ^{14}C da mistura de aminoácidos (Figura 3.2A) diferiu apenas no sítio 2 ($P < 0,001$), com maior valor para o solo ($72,4 \pm 1,0\%$) em relação à palha de cana-de-açúcar ($63,4 \pm 0,8\%$). Em relação à mineralização dos peptídeos (Figura 3.2B), foram verificadas diferenças marcantes entre a palha e solo para ambos os sítios experimentais ($P < 0,001$). Maiores valores de ^{14}C remanescente foram detectadas no solo ($41,3 \pm 4,9$ e $44,4 \pm 0,6\%$ para o sítio 1 e 2 respectivamente) em relação à palha ($18,3 \pm 0,3$ e $15,9 \pm 0,7\%$ para o sítio 1 e 2 respectivamente). No caso da ureia (Figura 3.2C), maiores valores de ^{14}C remanescente foram verificados no solo ($17,0 \pm 5,0\%$) em relação à palha ($7,3 \pm 0,3\%$) no sítio 1 ($P < 0,05$), enquanto que para a proteína (Figura 3.2D), em ambos os sítios experimentais o solo ($74,5 \pm 1,4$ e $89,9 \pm 0,7\%$ para o sítio 1 e 2 respectivamente) apresentou maior valor de ^{14}C remanescente comparativamente à palha ($61,6 \pm 0,2$ e $57,9 \pm 0,9\%$ para o sítio 1 e 2 respectivamente) ($P < 0,001$). De modo geral, o conteúdo remanescente de ^{14}C dos diferentes compostos apresentou a seguinte tendência para a palha: mistura de aminoácidos $\approx$ proteína $\gg$ peptídeos $>$ ureia. Para os solos, a tendência foi a seguinte: proteína $>$ mistura de aminoácidos $>$ peptídeos $\gg$ ureia. Pequenas quantidades de ^{14}C foram recuperadas por meio da extração com K_2SO_4 no final do período experimental. Para todos os compostos, a recuperação do ^{14}C adicionado inicialmente representou $< 2,9\%$, sugerindo que apenas uma pequena fração dos compostos adicionados permaneceu em solução ou adsorvido em fase sólida após 168 h. Desse modo, o restante de ^{14}C não quantificado na respiração e na extração com K_2SO_4 é

assumido como retiro nas células microbianas (HOBBIE; HOBBIE, 2012; SINSABAUGH et al., 2013).

Após a absorção de aminoácidos pela célula microbiana, a posterior liberação de $^{14}\text{CO}_2$ na fase rápida de mineralização é controlada por vias metabólicas dentro da célula (HOBBIE; HOBBIE, 2012). A porcentagem de conversão do substrato à CO_2 é dependente do comprimento da via metabólica nas células microbianas (HOBBIE; CRAWFORD, 1969). Embora a via metabólica de um mesmo aminoácido é a mesma para a maioria dos microrganismos e comunidades microbianas (JONES et al., 2009; HOBBIE; HOBBIE, 2013), as diferenças na estrutura dos grupos microbianos verificadas na palha e solo no sítio experimental 2 (Figura 3.1 e Tabela 3.3) explicam o menor valor de ^{14}C remanescente da mistura de aminoácidos no resíduo vegetal de cana-de-açúcar em relação ao solo (Figura 3.2A). Cada um dos 17 aminoácidos da solução utilizada possivelmente apresentou uma via metabólica específica no interior da célula microbiana. Embora a comunidade microbiana seja amplamente inativa em muitos ambientes, os microrganismos podem responder rapidamente em caso de adição de substrato exógeno ao meio, por manterem o maquinário bioquímico ativado (HOBBIE; HOBBIE, 2013). Este fenômeno é chamado de estilo de vida latente, de acordo com Morita (1997). De fato, a resposta da microbiota aos compostos orgânicos adicionados parece ter sido mais rápida na palha de cana-de-açúcar do que no solo. As suposições descritas acima ficam ainda mais evidentes quando são verificados os resultados de ^{14}C remanescente a partir da aplicação conjunta dos peptídeos L-Ala-Ala e L-Ala-Ala-Ala, onde as diferenças entre palha e solo são extremamente elevadas e consistentes (Figura 3.2B). Hill, Farrell e Jones (2012) reportaram a aquisição direta dos peptídeos L-Ala-Ala e L-Ala-Ala-Ala pelos microrganismos em um solo do País de Gales. Outros autores também verificaram rápida mineralização de aminoácidos e peptídeos, na forma de $^{14}\text{CO}_2$, em solos de zona temperada (FARRELL et al. 2011; WILKINSON et al., 2014).

A intensa liberação de $^{14}\text{CO}_2$ durante a fase rápida de mineralização da ureia na palha e no solo está associada principalmente à reação de hidrólise da molécula por meio das enzimas urease e ureia amidoliase (UALase) (SALOMON et al., 2010). A urease presente no solo é proveniente da síntese realizada por microrganismos, além de ser encontrada também em resíduos vegetais (FRANKENBERGER; ALI, 1982), sendo que a atividade da enzima é reportada como sendo maior nas plantas (e seus resíduos vegetais) do que no solo (BARRETO; WERSTERMAN, 1989). A UALase, por

sua vez, é outra enzima capaz de decompor a ureia, porém de ocorrência no interior das células microbianas, com gasto energético na forma de ATP (ANTIA et al., 1991; HAUSINGER, 2004). A maior atividade da urease e maior absorção da ureia pela microbiota (via enzima UALase) na palha em relação ao solo no sítio 1 podem explicar o menor valor de ^{14}C remanescente no resíduo de cana-de-açúcar (Figura 3.2C).

A mineralização mais intensa da proteína na palha em relação ao solo de ambos os sítios (Figura 3.2D) pode ser explicada pela maior ocorrência de microrganismos capazes de sintetizar enzimas extracelulares requeridas para a clivagem da molécula orgânica. Ao contrário de compostos orgânicos de baixo peso molecular, como aminoácidos e peptídeos pequenos, que não requerem a catálise por enzimas extracelulares antes de sua absorção (BODDY et al., 2007; GE et al., 2012; HILL; FARRELL; JONES, 2012), a clivagem de proteínas exige grande diversidade de enzimas extracelulares. Essa afirmação é sustentada pelo maior valor de $t_{1/2}$ nos tratamentos com proteína em relação aos demais compostos do NOD (mistura de aminoácidos, peptídeos e ureia). O elevado conteúdo de compostos fenólicos na palha de cana-de-açúcar (Tabela 3.2) parece não ter afetado a mineralização da proteína. Segundo Jones e Kielland (2012), têm sido sugerido que os compostos fenólicos podem representar um significativo bloqueio à degradação de proteínas por não apenas se ligarem ao substrato, mas também por se ligarem à proteases, causando impedimento estérico e desnaturação. No entanto, o elevado conteúdo de compostos fenólicos na palha de cana-de-açúcar (Tabela 3.2), superior até mesmo que o reservatório do NOD, parece não ter afetado a mineralização da proteína, que apresentou mineralização mais acelerada no resíduo vegetal em relação ao solo da camada de 0,0-2,5 cm (que apresentava conteúdo reduzido de polifenóis). É provável que as substâncias fenólicas presentes na palha de cana-de-açúcar não possuam a capacidade de se ligarem a proteínas ou enzimas, como a protease.

A maior parte da mistura de aminoácidos (variando de 0,61 a 0,71) e proteína (variando de 0,55 a 0,83) foi degradada em produtos microbianos após entrada no interior da célula (Figura 3.3A). Para a mistura de aminoácidos, o solo apresentou maior valor de EUC em relação à palha no sítio 2 ($P < 0,01$), enquanto que para a proteína o solo de ambos os sítios exibiram os maiores valores de EUC ($P < 0,001$). Por outro lado, a maioria dos peptídeos e ureia adicionados às amostras foram mineralizados na forma de CO_2 , apresentando assim baixos valores de EUC. Para os peptídeos, os solos de ambos os sítios experimentais exibiram valores de EUC

Figura 3.3 – Eficiência de uso do C (A) e tempo de meia-vida do reservatório de rápida mineralização (B) determinados por meio de um modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem para mistura de 17 aminoácidos (AAs), peptídeos (L-Ala-Ala e L-Ala-Ala-Ala), ureia e proteína (isolada de folhas de tabaco) marcados em ¹⁴C e aplicados em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. As barras verticais indicam o erro padrão da média ($n = 4$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre palha e solo para o sítio 1, enquanto que letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre palha e solo para o sítio 2, ambas pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

superiores aos de palha ($P < 0,001$). No caso da ureia, foram detectados os menores valores de EUC (variando de 0,05 a 0,13) entre os quatro compostos do NOD utilizados. Foi observado maior valor de EUC para o solo em relação à palha no sítio 1 pela aplicação do composto amídico ($P < 0,05$). De acordo com Sinsabaugh et al. (2013), serapilheiras que apresentam elevada relação C/N, como é o caso da palha de cana-de-açúcar, tendem a apresentar menores valores de EUC de acordo com o aumento na relação C/N. Em geral, a EUC dos compostos aplicados na palha e solo apresentou a seguinte tendência: proteína $\approx$ aminoácidos $\gg$ peptídeos $>$ ureia. A diferença nos valores de EUC entre os compostos aplicados reforça a hipótese de que os substratos seguiram diferentes vias metabólicas uma vez dentro das células

microbianas, principalmente no caso dos peptídeos, que parecem não ter sido deaminados à aminoácidos antes da absorção microbiana, como sugerido por Ge et al. (2012). O baixo valor de EUC para os tratamentos com adição de ureia sugere que grande parte do composto sofreu hidrólise por meio da urease ou mesmo da UALase.

O $t_{1/2}$ da fase rápida de mineralização do ^{14}C , quantificada por meio do modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem, para cada composto do NOD, encontra-se na Figura 3.3B. O $t_{1/2}$ médio para a mistura de aminoácidos, peptídeos, ureia e proteína foi estimado em $1,3 \pm 0,1$; $0,6 \pm 0,2$; $0,8 \pm 0,2$ e $5,6 \pm 1,1$ h respectivamente. Os valores de $t_{1/2}$ para os peptídeos, ureia e proteína na palha de cana-de-açúcar foram superiores aos de solo, em ambos os sítios avaliados. Não foram observadas diferenças entre tratamentos para o $t_{1/2}$ da mistura de aminoácidos. A degradação dos compostos foi extremamente rápida, sobretudo para os peptídeos, indicando que o conteúdo dos compostos na solução do solo pode ser baixo em algumas situações, devido à rápida remoção microbiana ou absorção pelas plantas (FARRELL et al., 2011; HILL et al., 2011; WILKINSON et al., 2014). Como exemplo têm-se o solo do sítio 1, onde não foram detectados valores de ATL em ambos os extratos (H_2O e K_2SO_4) (Tabela 3.2). Hobbie e Hobbie (2013) sugerem que o $t_{1/2}$ da fase rápida de mineralização determine apenas o tempo necessário para que metade do total respirado do substrato seja respirado, e não a taxa de respiração ou mesmo a taxa de ciclagem do substrato no solo. Na fase lenta de mineralização, por sua vez, não é possível determinar se a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ nesse período deriva do substrato originalmente aplicado ou é proveniente de um novo composto formado no interior da célula microbiana (HOBBIE; HOBBIE, 2013).

A evolução de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da ^{14}C -glicose foi reduzida significativamente pelo tratamento de esterilização por calor, destinado a modular o tamanho e atividade da biomassa microbiana (Figura 3.4). Em todas as situações o tratamento térmico reduziu enormemente o processo biológico de mineralização e inibiu quase que inteiramente a atividade microbiana ($< 0,06$ % da ^{14}C -glicose aplicada foi convertida em $^{14}\text{CO}_2$ nos tratamentos com calor). Adicionalmente, a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da ^{14}C -glicose no tratamento controle (sem esterilização) na palha e solo do sítio 1 foi de $6,47 \pm 0,35$ e $2,11 \pm 0,46$ % do total aplicado respectivamente, enquanto que a palha e solo do sítio 2 apresentaram emissão de $6,65 \pm 0,17$ e $2,38 \pm 0,10$ % do total aplicado. Até onde se sabe, não existem relatos de outros estudos que avaliaram o tratamento térmico como meio de esterilização de amostras de solo ou serapilheira utilizando-se

Figura 3.4 – Efeito do tratamento térmico (80°C; 90 min) relacionado à mineralização de solução de ^{14}C -glicose 10 mmol L⁻¹ (quantificada por meio da evolução de $^{14}\text{CO}_2$ após período de incubação de 1 h) aplicada em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. As barras verticais indicam o erro padrão da média ($n=4$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos de esterilização na palha ou solo de cada sítio

a ^{14}C -glicose como traçador. Como método alternativo, é reportada a esterilização de solo por meio de autoclavagem (1 h; 121°C), com resultados semelhantes aos verificados pelo uso do calor neste estudo (ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GE et al., 2012). Após a confirmação da eficiência da esterilização por calor, foi possível avaliara sorção dos compostos na fase sólida dos coloides.

A sorção dos compostos do NOD na fase sólida não mostrou dependência em relação à concentração utilizada, e seguiu um padrão similar independentemente do meio (palha ou solo), diferindo apenas na intensidade de sorção de cada um dos compostos marcados em ^{14}C (Figura 3.5 e Tabela 3.4). Os compostos não apresentaram tendência de saturação da sorção na faixa de concentração adotada (0 a 1 mmol L⁻¹), o que era esperado, visto que as concentrações utilizadas foram relativamente baixas. Foi adotada a isoterma linear de sorção ao invés da isoterma exponencial de sorção de Freundlich, objetivando-se obter um valor preciso de K_d , uma vez que o coeficiente de Freundlich (K_f), obtido por meio da equação exponencial é exponencial-dependente, podendo superestimar os valores de K_d em muitos casos (SOARES, 2004). Os resultados de sorção de todos os compostos marcados em ^{14}C foram ajustados adequadamente à isoterma linear de Freundlich, com valores de R^2 acima de 0,945 (Tabela 3.4).

Não foram observadas diferenças no valor de K_d dos compostos na palha do sítio 1 ($P > 0,05$) (Figura 3.5A), enquanto que para o solo do mesmo local, maiores valores

Tabela 3.4 – Coeficiente de partição (K_d) estimado a partir de uma isoterma linear de Freundlich para ^{14}C -compostos da fração do N orgânico dissolvido sorvidos na fase sólida de palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n = 4$)

Composto	Palha (sítio 1)		Solo (sítio 1)		Palha (sítio 2)		Solo (sítio 2)	
	$K_d^{(1)}$ (L dm^{-3})	$R^{2(2)}$	K_d (L dm^{-3})	R^2	K_d (L dm^{-3})	R^2	K_d (L dm^{-3})	R^2
Mistura de aminoácidos	$0,33 \pm 0,01$	0,974	$0,59 \pm 0,02 \text{ b}^*$	0,995	$0,24 \pm 0,02 \text{ b}$	0,945	$1,10 \pm 0,03 \text{ b}$	0,996
Peptídeos	$0,08 \pm 0,01$	0,980	$0,20 \pm 0,01 \text{ b}$	0,988	$0,07 \pm 0,01 \text{ b}$	0,974	$0,46 \pm 0,05 \text{ c}$	0,979
Ureia	$0,10 \pm 0,01$	0,962	$0,23 \pm 0,02 \text{ b}$	0,956	$0,10 \pm 0,01 \text{ b}$	0,976	$0,50 \pm 0,07 \text{ c}$	0,947
Proteína	$0,78 \pm 0,07$	0,960	$3,67 \pm 0,86 \text{ a}$	0,991	$0,91 \pm 0,03 \text{ a}$	0,964	$9,99 \pm 0,53 \text{ a}$	0,994

⁽¹⁾ K_d : coeficiente de partição dos ^{14}C -compostos; ⁽²⁾ R^2 : coeficiente de determinação para a regressão linear

* Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

Figura 3.5 – Sorção de mistura de 17 aminoácidos (mistura de AAs), peptídeos (L-Ala-Ala e L-Ala-Ala-Ala), ureia e proteína (isolada de folhas de tabaco) (todos marcados em ^{14}C) na fase sólida de palha (A: sítio 1; C: sítio 2) e solo (B: sítio 1; D: sítio 2) de duas áreas experimentais cultivadas com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. As barras verticais e horizontais indicam o erro padrão da média ($n = 4$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$) entre os ^{14}C -compostos na palha ou solo de cada sítio

do referido coeficiente foram detectados para proteína em relação aos demais compostos ($P < 0,001$) (Figura 3.5B). A mesma tendência do solo arenoso (sítio 1) foi verificada para a palha do sítio 2 ($P < 0,001$) (Figura 3.5C), enquanto que para o solo argiloso (sítio 2), a afinidade de sorção teve o seguinte padrão: proteína > mistura de aminoácidos > peptídeos $\approx$ ureia (Figura 3.5D). Em ambos os sítios, maiores valores de K_d pela aplicação de proteína foram observados no solo em relação à palha ($P < 0,001$). No sítio 2, o uso da mistura de aminoácidos também resultou em maior valor de K_d no solo comparativamente à palha ($P < 0,01$). Como relatado por Jones e Kielland (2012), os resultados deste estudo claramente indicaram a alta capacidade de sorção da proteína na fase sólida principalmente dos solos, com maior valor para o solo argiloso. Todavia, a análise de correlação dos valores de K_d dos compostos com os valores de CTC das amostras de palha e solo não apresentou significância (P

> 0,05). Os resultados obtidos neste estudo são congruentes com estudos prévios, que reportaram que aminoácidos, peptídeos e proteínas podem ser adsorvidos na superfície de coloides (BARON; REVAULT; QUIQUAMPOIX, 1997; AMELUNG et al., 2002; ROBERTS; BOL; JONES, 2007; GE et al., 2012). A capacidade de sorção dos compostos do NOD neste estudo ainda são suportados pelos resultados do uso do extrator K_2SO_4 , que foi hábil na dessorção de ATL, NOD e COD das amostras de solo, principalmente do sítio 2, de textura argilosa (Tabela 3.2). Jones e Willet (2006) também verificaram dessorção imediata de compostos das frações do COD e NOD quando utilizaram solução de KCl 2 mol L⁻¹ ao invés de H₂O.

No Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, a mudança do sistema de colheita com queima prévia do canavial para o sistema mecanizado sem queima trouxe diversas modificações quanto ao manejo da cana-de-açúcar, especialmente pela retenção dos resíduos vegetais da cultura na superfície do solo. Os resultados deste estudo sugerem que a palha de cana-de-açúcar situada na zona de transição com solo exerce grande influência na disponibilidade de compostos orgânicos do COD e NOD para a camada mineral de solo (0,0-2,5 cm). Analisando-se os dois solos, que são contrastantes quanto à textura, percebe-se a grande capacidade de adsorção de compostos do COD, NOD e ATL na fase sólida do solo argiloso (sítio 2), que favorece a dessorção gradual dos compostos na solução. No solo de textura franco-arenosa (sítio 1), por sua vez, a maior parte dos compostos do COD e NOD permanece em solução. São evidentes, também, as diferenças entre a palha e solo quanto à dinâmica de mineralização (Figura 3.2) e a sorção (Figura 3.5) de compostos orgânicos do DON. Embora a degradação dos compostos marcados em ¹⁴C foi, em geral, mais rápida na palha de cana-de-açúcar comparativamente ao solo (vide resultados de $t_{1/2}$ e conteúdo remanescente de ¹⁴C), é esperado ocorrer baixa mineralização líquida de N nesse resíduo vegetal durante alguns anos no campo, devido à sua elevada relação C/N, como observado por Fortes et al. (2012). A umidade variável da palha no campo, predominantemente baixa ao longo do ano, também pode influenciar diretamente na cinética das reações de mineralização do C e N desse resíduo vegetal.

O principal benefício da palha de cana-de-açúcar, com base nos resultados deste estudo, se dá pela disponibilização de compostos orgânicos de baixo e alto peso molecular do NOD (aminoácidos, peptídeos e proteínas) para a camada superficial do solo, onde a mineralização líquida de N pode ocorrer, com base nas relações C/N e COD/NOD verificadas para ambos os solos (Tabela 3.1). Em situações onde a

aplicação de fertilizantes nitrogenados é reduzida (subdoses) ou até mesmo suspensa, é possível que a planta de cana-de-açúcar absorva monômeros do N orgânico presente na palha ou no solo em caso de baixa disponibilidade de N mineral no sistema (SCHIMEL; BENNETT, 2004; JONES et al., 2005a). As micorrizas podem absorver o N orgânico situado na serapilheira mais eficientemente que as raízes das plantas, além de auxiliar na decomposição de polímeros orgânicos pela produção de enzimas extracelulares (SCHIMEL; BENNETT, 2004; JONES; KIELLAND, 2012). Fortes et al. (2012) também reportaram a ocorrência de microrganismos e raízes na palha superficial de cana-de-açúcar. A maior proporção de fungos micorrízicos arbusculares na palha em relação ao solo do sítio 2, por meio da análise de PLFA (Tabela 3.3), pode sustentar a hipótese levantada Jones e Kielland (2012). É provável, ainda, que a aplicação superficial de fertilizantes NPK também possa estimular o desenvolvimento de micorrizas e raízes na palha de cana-de-açúcar, favorecendo consequentemente a absorção de N proveniente do resíduo cultural. Por fim, estudos avaliando os fluxos de COD e NOD em condições de campo relacionados à remoção parcial ou total da palha superficial de cana-de-açúcar são requeridos.

3.3.4 Impacto da fertilização nitrogenada na mineralização da ^{14}C -glicose

Como era esperada, a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da adição de ^{14}C -glicose nas amostras de palha e solo apresentou um padrão bifásico, marcado por uma fase inicial rápida, seguido de uma fase secundária mais lenta (Figura 3.6), típica da mineralização da glicose e de outros compostos orgânicos de baixo peso molecular (SAGGAR et al., 1999; JONES et al., 2005b; BIRGANDER et al., 2013; WILKINSON et al., 2014). A produção de $^{14}\text{CO}_2$ na fase primária é atribuída ao uso imediato do substrato em um processo catabólico (respiração, por exemplo), enquanto que o substrato restante absorvido é imobilizado na biomassa microbiana, para formação de nova biomassa ou polímero de armazenamento (HILL; FARRAR; JONES, 2008). A fase secundária, por sua vez, descreve a ciclagem (mineralização) da comunidade microbiana ou dos polímeros de armazenamento formados com auxílio do substrato marcado em ^{14}C , levando à consequente produção de $^{14}\text{CO}_2$ (HILL; FARRAR; JONES, 2008).

Os resultados de mineralização da ^{14}C -glicose de todos os tratamentos foram ajustados adequadamente ao modelo exponencial decrescente duplo de primeira

ordem (R^2 médio do tratamento glicose = $0,997 \pm 0,001$; R^2 do tratamento glicose + amônio = $0,997 \pm 0,001$; R^2 do tratamento glicose + nitrato = $0,996 \pm 0,001$). Para a palha de cana-de-açúcar do sítio 1 (Figura 3.6A) e 2 (Figura 3.6C), o conteúdo remanescente de ^{14}C apresentou o padrão a seguir: glicose > glicose + amônio > glicose + nitrato ($P < 0,001$). Na palha do sítio 1, o conteúdo remanescente de ^{14}C nas amostras foi de $60,0 \pm 0,3$, $57,1 \pm 0,6$ e $53,4 \pm 1,3\%$ para os tratamentos glicose, glicose + amônio e glicose + nitrato respectivamente. Na palha de cana-de-açúcar proveniente do sítio 2, o conteúdo restante de ^{14}C foi de $60,3 \pm 1,1$, $56,5 \pm 0,8$ e $51,2 \pm 0,8\%$, respectivamente, para os tratamentos glicose, glicose + amônio e glicose + nitrato. Em ambos os solos (Figuras 3.6B e 3.6D), todavia, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$), com valor médio de $63,5 \pm 0,8\%$ e $70,1 \pm$

Figura 3.6 – Conteúdo de ^{14}C remanescente nos tratamentos com ^{14}C -glicose associada ou não às formas de N mineral, aplicados em palha (A: sítio 1; C: sítio 2) e solo (B: sítio 1; D: sítio 2) de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Os pontos representam os valores médios e as barras verticais o erro padrão da média ($n = 4$). As linhas representam o ajuste dos dados a um modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

0,3% para o conteúdo remanescente de ^{14}C no solo do sítio 1 e 2 respectivamente. A palha de cana-de-açúcar apresentou maior evolução de $^{14}\text{CO}_2$ comparativamente ao solo, independentemente do tratamento utilizado ($P < 0,05$). Pequenas quantidades de ^{14}C foram recuperadas no extrato de K_2SO_4 ao fim do experimento de laboratório.

Em geral, a recuperação do ^{14}C adicionado inicialmente representou $< 0,9\%$, indicando que quantidades extremamente reduzidas permaneceram em solução ou nos sítios trocáveis após 168 h. Estudo prévio reportou que a glicose não é adsorvida em sítios trocáveis da fase sólida do solo (KUZYAKOV; JONES, 2006). A comparação dos resultados de ^{14}C remanescente verificados neste estudo com os trabalhos disponíveis na literatura exigem certa cautela, pois a taxa de depleção do ^{14}C é dependente da quantidade (concentração e volume) adicionada de ^{14}C -glicose ao solo (HILL; FARRAR; JONES, 2008). De modo geral, observa-se grande amplitude nos valores de ^{14}C remanescente a partir da aplicação de ^{14}C -glicose no solo (LADD; JOCTEUR-MONROZIER; AMATO, 1992; CONDE et al., 2005; BODDY et al., 2007; HILL; FARRAR; JONES, 2008; GLANVILLE et al., 2012; BIRGANDER et al., 2013). Embora a avaliação da mineralização da ^{14}C -glicose tenha sido exaustivamente estudada no solo, até onde se sabe, não foram encontrados trabalhos avaliando a adição do carboidrato associado ou não às formas de N mineral em resíduos culturais, sobretudo, de cana-de-açúcar.

Os resultados indicaram que a maior parte da ^{14}C -glicose presente em todos os tratamentos foi catabolizada em produtos microbianos após entrada na célula dos microrganismos, exibindo assim altos valores de EUC (Figura 3.7A). Assim como nos resultados de ^{14}C remanescente, a palha de cana-de-açúcar de ambos os sítios também apresentaram diferenças quanto à EUC dos compostos adicionados. Para a palha do sítio 1, maiores valores de EUC foram verificados no tratamento glicose ($0,59 \pm 0,01$), seguido de glicose + amônio ($0,57 \pm 0,01$) e glicose + nitrato ($0,52 \pm 0,01$). A palha do sítio experimental 2 apresentou a seguinte tendência para os valores de EUC: glicose ($0,59 \pm 0,01$) > glicose + amônio ($0,56 \pm 0,01$) > glicose + nitrato ($0,51 \pm 0,01$). Para os solos, contudo, não foram verificadas diferenças quanto à EUC nos tratamentos utilizados ($P > 0,05$), sendo que os valores médios do referido índice foram de $0,62 \pm 0,01$ e $0,69 \pm 0,01$ para o solo do sítio experimental 1 e 2 respectivamente. Os valores de EUC do presente estudo são semelhantes aos reportados por Sinsabaugh et al. (2013). Em relação aos valores de $t_{1/2}$ para a depleção de ^{14}C nos diferentes tratamentos, não foram verificadas interações

significativas entre os meios (palha e solo) e os substratos (glicose, glicose + amônio e glicose + nitrato) ($P > 0,05$), sendo exibidos apenas os valores médios (Figura 3.7B). Para o sítio 1, foi observado maior valor de $t_{1/2}$ no solo ($11,0 \pm 0,4$ h) comparativamente à palha ($6,9 \pm 0,1$ h) ($P < 0,001$), enquanto que no sítio 2 não foram observadas diferenças entre a palha ($7,3 \pm 0,5$ h) e o solo ($7,9 \pm 0,5$ h) ($P > 0,05$).

Analisando-se os resultados, verifica-se que a aplicação de ^{14}C -glicose associada às formas de N mineral (N-NH_4^+ ou N-NO_3^-) favoreceu a depleção do ^{14}C comparativamente à aplicação isolada do carboidrato lábil nas amostras de palha de ambos os sítios. A limitação de N na palha para os microrganismos, com base em sua elevada relação C/N e disponibilidade de N mineral extremamente baixa (Tabelas 3.1

Figura 3.7 – Eficiência de uso do C (A) e tempo de meia-vida do reservatório de rápida mineralização (B) determinados por meio de um modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem para ^{14}C -glicose associada ou não às formas de N mineral, aplicada em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Nota: em relação ao tempo de meia-vida, não houve interação da palha ou solo com os compostos aplicados, sendo exibidos apenas os valores médios. As barras verticais indicam o erro padrão da média ($n = 4$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

e 3.2), explica o incremento na degradação do ^{14}C adicionado originalmente na forma de glicose pela adição de N mineral, resultando em estreitamento da relação C/N no material orgânico. O efeito *priming*, descrito por Kuzyakov, Friedel e Stahr (2000) como um aumento na taxa de ciclagem da matéria orgânica do solo pela entrada de material orgânico com baixa relação C/N ou fertilizantes minerais, pode ter ocorrido na palha de cana-de-açúcar de ambos os sítios deste estudo pela adição de N mineral. A glicose, por ser altamente lábil e fundamental na ciclagem do C no solo (PAUL, 2006), também pode proporcionar efeito *priming* por aumentar a ciclagem do C proveniente da célula microbiana (WU et al., 1993). Portanto, a aplicação de glicose juntamente com N mineral no solo resulta em aumento considerável no efeito *priming* (CONDE et al., 2005).

Como não foram detectadas diferenças quanto aos valores de $t_{1/2}$ entre qualquer tratamento (glicose e suas associações com N mineral) para a palha e solo dos dois sítios, é possível inferir que a diferenciação na depleção de ^{14}C entre os tratamentos aplicados na palha iniciou-se na fase de mineralização lenta (a_2) do modelo exponencial decrescente duplo de primeira ordem. Nessa fase, como descrito anteriormente, não é possível determinar qual composto orgânico que resultou na liberação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da célula microbiana (HOBBIE; HOBBIE, 2013). Uma vez que o substrato marcado em ^{14}C entra na célula microbiana e não é catabolizado (respirado, por exemplo), o mesmo pode ser utilizado no crescimento da população ou armazenado (HILL; FARRAR; JONES, 2008). A ciclagem da comunidade microbiana e dos polímeros resultará, então, na liberação de $^{14}\text{CO}_2$. Conde et al. (2005) também verificaram aumento na mineralização do ^{14}C aplicado na forma de glicose quando houve associação do carboidrato com N mineral $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, comparativamente à aplicação exclusiva de ^{14}C -glicose. A ausência de efeito na mineralização de ^{14}C pela adição de N nos solos se deve à estreita relação C/N e alta disponibilidade de N-NO_3^- de ambos. Essas hipóteses são suportadas pelo fato de que solos e material orgânico com relações C/N estreitas indiquem mineralização líquida de N (BRADY; WEIL, 2007).

Embora seja uma tarefa complexa definir hipóteses concretas para explicar o maior incremento na depleção de ^{14}C pela aplicação de uma fonte nítrica (KNO_3) comparativamente a uma fonte amoniacal de N $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ na palha de ambos os sítios, uma possível explicação está relacionada à incorporação (imobilização) do NO_3^- pela biomassa microbiana. Como é de conhecimento geral, os microrganismos

necessitam realizar a redução assimilatória do NO_3^- , que se baseia na excreção de enzimas extracelulares (redutase do nitrato e nitrito) para redução do NO_3^- à NH_4^+ , permitindo assim a absorção do N pela célula microbiana. O processo de redução assimilatória do NO_3^- , ao contrário da absorção direta de NH_4^+ , exige gasto energético pela biomassa microbiana (PURI; ASHMAN, 1999). Assim, é sugerido que a maior depleção de ^{14}C na palha de cana-de-açúcar no tratamento glicose + nitrato seja resultado da utilização do referido carboidrato (ou qualquer outro composto orgânico carbonáceo formado a partir dele) para uso energético na incorporação pelos microrganismos do NO_3^- disponível. Com isso, ocorreu a consequente liberação de $^{14}\text{CO}_2$ devido à mineralização do ^{14}C . Conde et al. (2005) reportaram aumento no conteúdo de N-NO_2^- no solo pela adição conjunta de ^{14}C -glicose e N-NH_4^+ , e atribuíram o fato à redução assimilatória do NO_3^- .

No tempo zero (0 h), o tratamento glicose + amônio apresentou o conteúdo mais elevado de N-NH_4^+ na palha e solo de ambos os sítios (Figura 3.8A) ($P < 0,001$). O resultado era obviamente esperado, uma vez que as amostras receberam 125 mg dm^{-3} N-NH_4^+ nesse tratamento. Devido ao conteúdo extremamente baixo de N-NH_4^+ nativo em qualquer meio (palha ou solo), o N-NH_4^+ exógeno adicionado representou quase que a totalidade da fração amoniacal nas amostras. O conteúdo médio de N-NH_4^+ para o tratamento glicose + amônio foi de $125,45 \pm 0,06 \text{ mg dm}^{-3}$, enquanto que o valor médio para os tratamentos restantes era de $0,45 \pm 0,06 \text{ mg dm}^{-3}$ N-NH_4^+ . No final do período experimental (168 h), o conteúdo de N-NH_4^+ manteve-se superior no tratamento glicose + amônio comparativamente aos demais tratamentos, tanto na palha quanto no solo ($P < 0,001$) (Figura 3.8B). O conteúdo de N-NH_4^+ no tratamento glicose + amônio para a palha e solo do sítio 1 era de $26,61 \pm 4,22$ e $86,52 \pm 7,29 \text{ mg dm}^{-3}$ respectivamente. Para a palha e solo de cana-de-açúcar do sítio 2, o conteúdo de N-NH_4^+ no mesmo tratamento era de $20,95 \pm 4,31$ and $32,64 \pm 2,18 \text{ mg dm}^{-3}$ respectivamente. Desse modo, o conteúdo de N-NH_4^+ no tratamento glicose + amônio decresceu 78,8 e 30,9% para a palha e solo do sítio 1, ao passo que a redução na palha e solo do sítio 2 foi de, respectivamente, 83,3 e 74,0% do N-NH_4^+ inicialmente presente (0 h). Os demais tratamentos (sem adição de N-NH_4^+) mantiveram o conteúdo extremamente baixo de N-NH_4^+ (média de $0,73 \pm 0,05 \text{ mg dm}^{-3}$) que foi detectado no início do experimento.

Figura 3.8 – Conteúdo de N-NH₄⁺ na estimativa do tempo zero (A) e 168 h (B) após a aplicação de ¹⁴C-glicose, ¹⁴C-glicose + amônio [via (NH₄)₂SO₄] e ¹⁴C-glicose + nitrato (via KNO₃) em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. As barras verticais indicam o erro padrão da média ($n=4$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em palha ou solo de cada sítio pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

O tratamento glicose + nitrato, onde as amostras receberam 125 mg dm⁻³ N-NO₃⁻, apresentou o maior conteúdo de N-NO₃⁻ em relação aos demais tratamentos, na amostragem realizada no tempo zero (0 h) ($P < 0,001$), independentemente do meio (palha ou solo) (Figura 3.9A). O conteúdo de N-NO₃⁻ para o mesmo tratamento era de, respectivamente, $125,17 \pm 0,17$ e $154,69 \pm 3,54$ mg dm⁻³ para as amostras de palha e solo do sítio 1, enquanto que para o sítio 2 os valores de N-NO₃⁻ eram de $125,26 \pm 0,26$ e $141,01 \pm 2,17$ mg dm⁻³ para a palha e solo respectivamente. O conteúdo de N-NO₃⁻ nativo das amostras de solo dos sítios 1 e 2 representou 19,2 e 11,3% do N-NO₃⁻ total no tempo zero respectivamente. Nos demais tratamentos, o conteúdo de N-NO₃⁻ na palha de cana-de-açúcar de ambos os sítios era $< 0,30$ mg dm⁻³, enquanto que para as amostras de solo dos sítios 1 e 2 era de 29,69 e 16,01 mg dm⁻³ respectivamente. Após 168 h (Figura 3.9B), o conteúdo de N-NO₃⁻ no tratamento

com adição do ânion supracitado (glicose + nitrato) permaneceu maior em relação aos demais tratamentos, em qualquer meio e sítio experimental ($P < 0,001$). A depleção do conteúdo de N-NO_3^- no tratamento glicose + nitrato foi de 33,5 e 5,7% para a palha e solo do sítio 1 respectivamente. Para o sítio 2, a redução nos valores de N-NO_3^- no mesmo tratamento foi de 28,1 e 16,5%, respectivamente, para a palha e solo. Após 168 h da aplicação dos compostos, foi verificado aumento de 48,3 e 49,9% no conteúdo de N-NO_3^- no tratamento glicose + amônio no solo do sítio 1 e 2 respectivamente. O tratamento glicose + amônio nas palhas de cana-de-açúcar, no entanto, mantiveram o conteúdo extremamente reduzido de N-NO_3^- após 168 h da aplicação dos compostos. Da mesma forma, nos demais tratamentos (controle e glicose), os valores de N-NO_3^- na palha e no solo dos dois sítios não se alteraram entre os dois tempos de amostragem.

Figura 3.9 – Conteúdo de N-NO_3^- na estimativa do tempo zero (A) e 168 h (B) após a aplicação de ^{14}C -glicose, ^{14}C -glicose + amônio [via $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] e ^{14}C -glicose + nitrato (via KNO_3) em palha e solo de dois sítios experimentais cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. As barras verticais indicam o erro padrão da média ($n = 4$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em palha ou solo de cada sítio pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

Com base nos resultados descritos acima, foi possível calcular a estimativa do balanço do N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) nos diferentes tratamentos, especialmente naqueles onde houve adição do nutriente. A imobilização líquida do N amoniacal nas amostras foi definida como a diferença no conteúdo de N-NH_4^+ entre os tempos de amostragem (0 e 168 h), descontando-se também o aumento no conteúdo de N-NO_3^- entre os tempos de extração supracitados devido à nitrificação líquida. No caso do N nítrico, a diferença no conteúdo de N-NO_3^- no tempo zero e 168 h após a aplicação dos tratamentos permitiu calcular a imobilização líquida do N-NO_3^- . As perdas de N_2 e N_2O no compartimento do N-NO_3^- foram desconsideradas, pois as amostras de palha e solo foram incubadas com umidade ajustada para 60% da CMRA, objetivando-se evitar a formação de microsítios anaeróbios, que poderiam favorecer o processo de desnitrificação.

O balanço do N mineral para o tratamento glicose + amônio na palha e solo dos sítios experimentais é exibido a seguir. Na palha do sítio 1, do total de N-NH_4^+ que foi removido desse reservatório ($99,10 \text{ mg dm}^{-3}$), 99,0% ($98,13 \text{ mg dm}^{-3}$) foram devidos à imobilização pelos microrganismos, enquanto que o restante (1,0%; $0,97 \text{ mg dm}^{-3}$) foi nitrificado. Para a palha do sítio 2, a remoção de $104,39 \text{ mg dm}^{-3}$ de N-NH_4^+ ao fim do experimento foi devida quase que exclusivamente à absorção microbiana (99,3%; $103,63 \text{ mg dm}^{-3}$), sendo que o restante (0,7%; $0,97 \text{ mg dm}^{-3}$) sofreu nitrificação. No solo do sítio experimental 1, do total de N-NH_4^+ removido ($38,73 \text{ mg dm}^{-3}$), 71,6% ($27,73 \text{ mg dm}^{-3}$) foram devidos à nitrificação, enquanto que o remanescente foi imobilizado pela microbiota (28,4%; $11,00 \text{ mg dm}^{-3}$). Por fim, no solo do sítio 2, do total de N-NH_4^+ que foi removido desse compartimento ($92,85 \text{ mg dm}^{-3}$), 82,3% ($76,91 \text{ mg dm}^{-3}$) foram devidos à imobilização pelos microrganismos, enquanto que o restante (17,17%; $15,94 \text{ mg dm}^{-3}$) foi nitrificado. Para o tratamento glicose + nitrato, a imobilização do N-NO_3^- foi de, respectivamente, 33,5 ($41,88 \text{ mg dm}^{-3}$) e 5,7% ($8,87 \text{ mg dm}^{-3}$) do conteúdo inicial da fração nítrica para as amostras de palha e solo do sítio 1. No sítio 2, por sua vez, a imobilização das formas nítricas de N foi de 28,1 ($35,11 \text{ mg dm}^{-3}$) e 16,5% ($23,33 \text{ mg dm}^{-3}$) do conteúdo inicial de N-NO_3^- para a palha e solo respectivamente. Nos demais tratamentos (controle e glicose), as variações no conteúdo de N mineral entre as amostragens (0 e 168 h) não apresentaram diferenças significativas.

A relação entre o conteúdo imobilizado de N-NH_4^+ e de N-NO_3^- ($\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$) foi, em média, de 2,7 e 2,6 para a palha e solo respectivamente, indicando que a

imobilização de N-NH_4^+ foi mais intensa que a de N-NO_3^- em qualquer meio (palha ou solo de cana-de-açúcar). Resultados semelhantes para a relação descrita acima foram reportados por Puri e Ashman (1999), que fizeram uso de técnica isotópica (^{15}N) em amostras de solo de uma região temperada. Embora existam diferenças marcantes na composição dos grupos microbianos nas amostras de palha e solo utilizados neste estudo (Figura 3.1 e Tabela 3.3), tais características parecem não ter influenciado na proporção de imobilização das formas minerais de N. A biomassa microbiana tem preferência pela imobilização do N amoniacal ao nítrico, uma vez que este último necessita ser reduzido a N-NH_4^+ antes de ser absorvido (PURI; ASHMAN, 1999). A preferência dos microrganismos do solo pela absorção de N-NH_4^+ em relação ao N-NO_3^- é reconhecida e foi relatada por diversos autores (WICKRAMASINGHE et al., 1985; RECOUS; MARY, 1990; JACKSON et al., 1992; PURI; ASHMAN, 1999). Os menores valores das relações C/N (Tabela 3.1) e COD/NOD (Tabela 3.2) do solo do sítio 1 em relação ao solo do sítio 2 explicam a menor imobilização de N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) e maior nitrificação líquida, em valores absolutos, ocorrida no primeiro solo (sítio 1). O histórico de aplicação de fertilizante organomineral nesse local durante vários anos pode ter estimulado a microbiota do solo, pelo aporte de C orgânico lábil e compostos nitrogenados de baixa relação C/N. Possíveis diferenças na população dos microrganismos nitrificadores entre os solos também não devem ser descartadas.

Embora a preferência de imobilização pelos microrganismos do NH_4^+ ao NO_3^- seja de conhecimento da comunidade científica há tempos, os resultados obtidos no presente estudo podem favorecer o manejo da fertilização nitrogenada da cana-de-açúcar, especialmente quando da presença de palha superficial no campo, uma vez que as maiores taxas de imobilização do N mineral foram verificadas no resíduo vegetal em comparação com o solo superficial. É possível que a aplicação de fontes nitrogenadas nítricas aumente a eficiência de uso do N pela cultura, visto que a imobilização microbiana do NO_3^- é sensivelmente menor que a de NH_4^+ , como relatado neste estudo e também verificado por outros autores citados anteriormente. Assim, o tempo de permanência do NO_3^- na solução do solo é maior se comparado ao do NH_4^+ , uma vez que os microrganismos são mais competitivos que as plantas na exploração do reservatório de N-NH_4^+ . A menor concorrência entre os microrganismos e plantas pelo N-NO_3^- pode favorecer a maior absorção dessa fração do N mineral pela cana-de-açúcar ao longo do ciclo de desenvolvimento da cultura. Por outro lado, as desvantagens pelo uso de fontes nítricas se dão pela possibilidade de lixiviação do

NO_3^- em situações onde a cultura não apresenta sistema radicular desenvolvido; possibilidade da ocorrência de desnitrificação do NO_3^- à N_2O , em caso de formação de microsítios anaeróbios no solo; além do gasto energético pela planta para que ocorra a redução assimilatória do NO_3^- à NH_4^+ no interior das células vegetais. Apesar da ureia apresentar rápida taxa de nitrificação no solo, as perdas consideráveis de N por volatilização de NH_3 pela aplicação superficial do referido fertilizante em canaviais (MARIANO et al., 2012) podem inviabilizar sua utilização, sobretudo por questões de caráter econômico e ambiental.

3.4 Conclusões

1. A palha localizada na zona de transição palha-solo de canaviais disponibiliza compostos do NOD que podem ficar em solução ou mesmo adsorvidos na fase sólida do solo superficial.
2. Ocorre rápida mineralização de peptídeos e ureia, ao contrário da proteína, que apresenta a taxa de mineralização mais lenta dentre os compostos avaliados. A proteína, contudo, possui elevada capacidade de sorção na fase sólida do solo de ambos os sítios.
3. A adição de ^{14}C -glicose associada a uma fonte nítrica de N (KNO_3) em palha de cana-de-açúcar intensifica a mineralização de ^{14}C em relação à aplicação isolada do carboidrato ou mesmo quando combinado à uma fonte amoniacal $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. A imobilização microbiana de NH_4^+ é, em média, 2,65 vezes superior à de NO_3^- tanto na palha quanto no solo.

Referências

AMELUNG, W.; LOBE, I.; DU PEREZ, C.C. Fate of microbial residues in sandy soils of the South African Highveld as influenced by prolonged arable cropping. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 53, p. 29-35, 2002.

ANTIA, N.J.; HARRISON, P.J.; OLIVEIRA, L. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell Biology and ecology. **Phycologia**, Odense, v. 30, p. 1-89, 1991.

AZEVEDO, L.C.B.; STÜRMER, S.L.; LAMBAIS, M.R. Early changes in arbuscular mycorrhizal development in sugarcane under two harvest management systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, p. 995-1005, 2014.

BARON, M.H.; REVAULT, M.; QUIQUAMPOIX, H. Protein adsorption on soil mineral surfaces. In: CARMONA, P.; NAVARRO, R.; HERNANZ, A. (Ed.). **Spectroscopy of biological molecules: modern trends**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 503-504.

BARRETO, H.J.; WESTERMAN, R.L. Soil urease activity in winter wheat residue management systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 53, p. 1455-1458, 1989.

BIRGANDER, J.; REISCHKE, S.; JONES, D.L.; ROUSK, J. Temperature adaptation of bacterial growth and ^{14}C -glucose mineralisation in a laboratory study. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, UK, v. 65, p. 294-303, 2013.

BODDY, E.; HILL, P.W.; FARRAR, J.; JONES, D.L. Fast turnover of low molecular weight components of the dissolved organic carbon pool of temperate grassland field. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 827-835, 2007.

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

BREMNER, J.M. Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 321-329, 1995.

BUYER, J.S.; SASSER, M. High throughput phospholipid fatty acid analysis of soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 127-130, 2012.

BUYER, J.S.; TEASDALE, J.R.; ROBERTS, D.P.; ZASADA, I.A.; MAUL, J.E. Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 831-841, 2010.

CANTARELLA, H.; CERRI, C.E.P.; CARVALHO, J.L.N.; MAGALHÃES, P.S.G. How much sugarcane trash should be left on the soil? **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 1-2, 2013.

CERRI, C.C.; GALDOS, M.V.; MAIA, S.M.F.; BERNOUX, M.; FEIGL, B.J.; POWLSON, D.; CERRI, C.E.P. Effect of sugarcane harvesting on soil carbon stocks in Brazil: an examination of existing data. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 62, p. 23-28, 2011.

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

CHOTE, J.L.; LADD, J.N.; AMATO, M. Sites of microbial assimilation, and turnover of soluble and particulate ^{14}C -labelled substrates decomposing in a clay soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 205-218, 1998.

CONDE, E.; CARDENAS, M.; PONCE-MENDOZA, A.; LUNA-GUIDO, M.L.; CRUZ-MONDRAGÓN, C.; DENDOOVEN, L. The impacts of inorganic Nitrogen application on mineralization of ^{14}C -labelled maize and glucose, and on priming effect in saline alkaline soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 681-691, 2005.

CULMAN, S.W.; SNAPP, S.S.; FREEMAN, M.A.; SCHIPANSKI, M.E.; BENISTON, J.; LAL, R.; DRINKWATER, L.E.; FRANZLUEBBERS, A.J.; GLOVER, J.D.; GRANDY, A.S.; LEE, J.; SIX, J.; MAUL, J.E.; MIRKSY, S.B.; SPARGO, J.T.; WANDER, M.M. Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 494-504, 2012.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 305-310, 2013.

DOURADO-NETO, D.; TIMM, L.C.; OLIVEIRA, J.C.M.; REICHARDT, K.; BACCHI, O.O.S.; TOMINAGA, T.T.; CÁSSARO, F.A.M. State-space approach for the analysis of soil water content and temperature in a sugarcane crop. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1215-1221, 1999.

FARRELL, M.; HILL, P.W.; WANNIARACHCHI, S.D.; FARRAR, J.; BARDGETT, R.D.; JONES, D.L. Rapid peptide metabolism: a major component of soil nitrogen cycling? **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 25, p. 1-11, 2011.

FINDLAY, R.H. Determination of microbial community structure using phospholipid fatty acid profiles. In: KOWALCHUK, G.A.; BRUIJIN, F.J.D.; HEAD, I.M.; AKKERMANS, A.D.L.; ELSAS, J.D.V. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 983-1004.

FORTES, C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Long-term decomposition of sugarcane harvest residues in São Paulo State, Brazil. **Biomass & Bioenergy**, Amsterdam, v. 42, p. 189-198, 2012.

FORTES, C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; FERREIRA, D.A.; FRANCO, H.C.J.; OTTO, R. Recovery of Nitrogen (¹⁵N) by sugarcane from previous crop residues and urea fertilisation under a minimum tillage system. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 13, p. 42-46, 2011.

FORTES, C.; VITTI, A.C.; OTTO, R.; FERREIRA, D.A.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O. Contribution of Nitrogen from sugarcane harvest residues and urea for crop nutrition. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 313-320, 2013.

FRANCO, H.C.J.; PIMENTA, M.T.B.; CARVALHO, J.L.N.; MAGALHÃES, P.S.G.; ROSSELI, C.E.V.; BRAUNBECK, O.A.; VITTI, A.C.; KÖLLN, O.T.; ROSSI NETO, J. Assessment of sugarcane trash for agronomic and energy purposes in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 305-312, 2013.

FRANKENBERGER JUNIOR, W.T.; TABATABAI, M.A. Amidase and urease activities in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 64, p. 153-166, 1982.

FROSTEGÅRD, A.; BÅÅTH, E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, p. 59-65, 1996.

FROSTEGÅRD, A.; TUNLID, A.; BÅÅTH, E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 151-163, 1991.

_____. Use and misuse of PLFA measurements in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1621-1625, 2011.

GALDOS, M.; CAVALETT, O.; SEABRA, J.E.A.; NOGUEIRA, L.A.H.; BONOMI, A. Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 104, p.576-582, 2013.

GE, T.; YUAN, H.; ROBERTS, P.; JONES, D.L.; QIN, H.; TONG, C.; HUANG, D. Amino acid and peptide dynamics in horticultural soils under conventional and organic management strategies. **Journal of Soils and Sediments**, Berlin, v.12, p.323-333, 2012.

GLANVILLE, H.; ROUSK, J.; GOLYSHIN, P.; JONES, D.L. Mineralization of low molecular weight carbon substrates in soil solution under laboratory and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 48, p. 88-95, 2012.

GUERRA, J.P.M.G.; COLETA JUNIOR, J.R.; ARRUDA, L.C.M.; SILVA, G.A.; KULAY, L. **International Journal of Life Cycle Assessment**, Berlin, v. 19, p. 814-825, 2014.

HAUSINGER, R.P. Metabolic versatility of prokaryotes for urea decomposition. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 2520-2522, 2004.

HILL; P.W.; FARRAR, J.F.; JONES, D.L. Decoupling of microbial glucose uptake and mineralization in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 616-624, 2008.

HILL; P.W.; FARRELL, M.; JONES, D.L. Bigger may be better in soil N cycling: does rapid acquisition of small L-peptides by soil microbes dominate fluxes of protein-derived N in soil? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 48, p. 106-112, 2012.

HILL, P.W.; QUILLIAM, R.S.; DeLUCA; T.H.; FARRAR, J.; FARREL, M.; ROBERTS, P.; NEWSHAM, K.K.; HOPKINS, D.W.; BARDGETT, R.D.; JONES, D.L. Acquisition and assimilation of nitrogen as peptide-bound and D-enantiomers of amino acids by wheat. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, e19220, 2011.

HINGSTON, F.J.; POSNER, A.M.; QUIRK, J.P. Anion adsorption by goethite and gibbsite. II. Desorption of anions by hydrous oxide surfaces. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 25, p. 16-26, 1974.

HOBBIE; J.E.; CRAWFORD, C.C. Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 14, p. 528-532, 1969.

HOBBIE, J.E.; HOBBIE, E.A. Amino acid cycling in plankton and soil microbes studied with radioisotopes: measured amino acids in soil do not reflect bioavailability. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 107, p. 339-360, 2012.

_____. Microbes in nature are limited by carbon and energy: the starving-survival lifestyle in soil and consequences for estimating microbial rates. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 1-11, 2013.

HOFSETZ, K.; SILVA, M.A. Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. **Biomass & Bioenergy**, Amsterdam, v. 46, p. 564-573, 2012.

HSU, P.H. Aluminum hydroxides and oxyhydroxides. In: DIXON, J.B.; WEED, S.B. (Ed.). **Minerals in soil environments**. Madison: SSSA, 1989. p. 331-378.

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

JACKSON, L.E.; SCHIMEL, J.P.; FIRESTONE, M.K. Short term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 409-415, 1989.

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

_____. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 55, p. 60-69, 2012.

JONES, D.L.; WILLETT, V.B. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 991-999, 2006.

JONES, D.L.; OWEN, A.G.; FARRAR, J.F. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions soil extracts. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1893-1902, 2002.

JONES, D.L.; SHANNON, D.; MURPHY, D.V.; FARRAR, J. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 749-756, 2004.

JONES, D.L.; JOHN, R.H.; WILLET, V.B.; FARRAR, J.F.; HODGE, A. Dissolved organic nitrogen uptake by plants – an important N uptake pathway? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 413-423, 2005a.

JONES, D.L.; KEMMITT, S.J.; WRIGHT, D.; CUTTLE, S.P.; BOL, R.; EDWARDS, A.C. Rapid intrinsic rates of amino acid biodegradation in soils are unaffected by agricultural management strategy. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1267-1275, 2005b.

JONES, D.L.; WILLETT, V.B.; STOCKDALE, E.A.; MACDONALD, A.J.; MURPHY, D.V. Molecular weight of dissolved organic carbon, nitrogen, and phenolics in grassland soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 142-150, 2012.

JONES, D.L.; KIELLAND, K.; SINCLAIR, F.L.; DAHLGREN, R.A.; NEWSHAM, K.K.; FARRAR, J.F.; MURPHY, D.V. Soil organic nitrogen mineralization across a global latitudinal gradient. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 23, p. 1-5, 2009.

KAISER, C.; FRANK, A.; WILD, B.; KORANDA, M.; RICHTER, A. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 ω 6,9 and 18:1 ω 9. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 2543-2556, 2010.

KUZYAKOV, Y.; JONES, D.L. Glucose uptake by maize roots and its transformation in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 851-860, 2006.

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

LADD, J.N.; JOCTEUR-MONROZIER, L.; AMATO, M. Carbon turnover and nitrogen transformations in an Alfisol and Vertisol amended with [U-¹⁴C] glucose and [¹⁵N] ammonium sulfate. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 359-371, 1992.

LEAL, M.R.L.V.; GALDOS, M.V.; SCARPARE, F.V.; SEABRA, J.E.A.; WALTER, A.; OLIVEIRA, C.O.F. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: a literature review. **Biomass & Bioenergy**, Amsterdam, v. 53, p. 11-19, 2013.
MANZONI, S.; JACKSON, R.B.; TROFYMOW, J.A.; PORPORATO, A. The global stoichiometry of litter nitrogen mineralization. **Science**, New York, v. 321, p. 684-686, 2008.

MARIANO, E.; TRIVELIN, P.C.O.; VIEIRA, M.X.; LEITE, J.M.; OTTO, R.; FRANCO, H.C.J. Ammonia losses estimated by an open collector from urea applied to sugarcane straw. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 411-441, 2012.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 5, p. 62-71, 2001.

MORITA, R.Y. **Bacteria in oligotrophic environments**: starvation-survival lifestyle. New York: Chapman Hall, 1997. 529 p.

MULVANEY, R.L. Nitrogen: inorganic forms. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1996. pt. 3: Chemical methods, p. 1123-1184. (SSSA Book Series, 5).

NANNIPIERI, P.; PAUL, E.A. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2357-2369, 2009.

NIELSEN, T.H.; BONDE, T.A.; SØRENSEN, J. Significance of microbial urea turnover in N cycling of three Danish agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, New York, v. 25, p. 147-157, 1998.

OBURGER, E.; JONES, D.L. Substrate mineralization studies in the laboratory show different microbial C partitioning dynamics than in the field. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1951-1956, 2009.

PAUL, E.A. **Soil microbiology and biochemistry**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2006. 552 p.

PURI, G.; ASHMAN, M.R. Microbial immobilization of ¹⁵N-labelled ammonium and nitrate in a temperate woodland soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 929-931, 1999.

RAISON, R.J.; CONNELL, M.J.; KHANNA, P.K. Methodology for studying fluxes of soil mineral-N in situ. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 521-530, 1987.

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

ROBERTS, P.; BOL, R.; JONES, D.L. Free amino sugar reactions in soil in relation to soil carbon and nitrogen cycling. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 3081-3092, 2007.

ROUSK, J.; JONES, D.L. Loss of low molecular weight dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON) in H₂O and 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 2331-2335, 2010.

SAGGAR, S.; PARSHOTAM, A.; HEDLEY, C.; SALT, G. ¹⁴C-labelled glucose turnover in New Zealand soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 2025-2037, 1999.

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

SINSABAUGH, R.L.; MANZONI, S.; MOORHEAD, D.L.; RICHTER, A. Carbon use efficiency of microbial communities: stoichiometry, methodology and modelling. **Ecology Letters**, Oxford, v. 16, p. 930-939, 2013.

SOARES, M.R. **Coeficientes de distribuição (K_D) de metais pesados em solos do Estado de São Paulo**. 2004. 202 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. 12th ed. Washington: USDA; Natural Resources Conservation Service. 2014.

SOLOMON, C.M.; COLLIER, J.L.; BERG, G.M.; GLIBERT, P.M. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. **Aquatic Microbial Ecology**, New York, v. 59, p. 67-88, 2010.

SORDI, R.; MANECHINI, C. Utilization of trash: a view from the agronomic and industrial perspective. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 1-2, 2013.

SPAROVEK, G.; SCHNUG, E. Temporal erosion-induced soil degradation and yield loss. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 1479-1486, 2001.

SUMNER, M.E.; MILLER, W.P. Cation exchange capacity and exchange coefficients. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1996. pt .3: Chemical methods, p. 1201-1229. (SSSA Book Series, 5).

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*: I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, p. 63-68, 1959.

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

TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; KARJOMAA, S.; ITÄVAARA, M. Priming effect as determined by adding ¹⁴C-glucose to modified controlled composting test. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13, p. 131-140, 2002.

VERSINI, A.; MARESCHAL, L.; MATSOUMBOU, T.; ZELLER, B.; RANGER, J.; LACLAU, J. Effects of litter manipulation in a tropical *Eucalyptus* plantation on leaching of mineral nutrients, dissolved organic nitrogen and dissolved organic carbon. **Geoderma**, Amsterdam, v. 232-234, p. 426-236, 2014.

VIEIRA-MEGDA, M.X.V.; MARIANO, E.; LEITE, J.M.; FRANCO, H.C.J.; VITTI, A.C.; MEGDA, M.M.; KHAN, S.A.; MULVANEY, R.L.; TRIVELIN, P.C.O. Contribution of fertilizer nitrogen to the total nitrogen extracted by sugarcane under Brazilian field conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Amsterdam, v. 101, p. 241-257, 2015.

WICKRAMASINGHE, K.N.; RODGERS, G.A.; JENKINSON, D.S. Nitrification in acid tea soils and a neutral grassland soil: effects of nitrification inhibitors and inorganic salts. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 249-252, 1985.

WILKINSON, A.; HILL, P.W.; FARRAR, J.F.; JONES, D.L.; BARDGETT, R.D. Rapid microbial uptake and mineralization of amino acids and peptides along a grassland productivity gradient. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 72, p. 75-83, 2014.

WU, J.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 10, p. 1435-1441, 1993.

ZELLES, L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. **Chemosphere**, Oxford, v. 35, p. 275-294, 1997.

_____. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, p. 111-129, 1999.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O insucesso dos diversos métodos avaliados neste estudo na predição do fornecimento de N pelo solo à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é resultado das diversas transformações que ocorrem no ciclo desse elemento e suas interações com fatores abióticos, uma vez que, ao contrário dos demais macro e micronutrientes (excetuando-se o S), o reservatório do N é a matéria orgânica do solo. Incubações de solo, embora utilizadas amplamente como métodos de referência para estimativa do N mineralizável, apresentam claras limitações quanto ao seu uso, como por exemplo, a ausência de sistema radicular das plantas nas amostras, visto que a região rizosférica pode alterar a diversidade microbiológica, umidade do solo e a taxa de mineralização de N. Os métodos químicos, muitas vezes concebidos empiricamente, fazem uso de extratores ácidos, básicos e agentes oxidantes fortes na maioria dos casos, resultando em remoção de frações desconhecidas do N orgânico, que não se correlacionam com o N absorvido pelas plantas no campo. Os métodos microbiológicos e a mineralização bruta de N (MBN), pouco avaliados em estudos dessa natureza, não levam em consideração as frequentes flutuações de temperatura e ciclos de secagem e reumedecimento que ocorrem no campo e que podem prejudicar ou mesmo estimular o processo de mineralização.

A identificação de frações do N do solo que representem um reservatório importante na ciclagem do nutriente é critério essencial na busca por um teste de solo eficiente. Diversas revisões de literatura têm sugerido um novo modelo mais realístico do ciclo do N no solo, onde a despolimerização de compostos orgânicos nitrogenados é definida como a parte crítica na ciclagem do elemento, pela disponibilização de monômeros para o N orgânico dissolvido (NOD) (SCHIMEL; BENNETT, 2004; NANNIPIERI; PAUL, 2009). Métodos que possam quantificar o potencial de despolimerização, ou mesmo estimar o tamanho do reservatório de compostos de baixo peso molecular do NOD podem representar uma abordagem promissora na estimativa do N disponível no solo. No entanto, tais metodologias certamente falharão caso não sejam integradas a fatores abióticos, uma vez que estes desempenham papel fundamental na disponibilidade de N no solo, moderando a cinética de mineralização. Como exemplo, diferentes combinações de umidade do solo e temperaturas de incubação podem resultar em variações significativas nos valores da MBN (PILBEAM; WARREN, 1995; MORAES, 2012). Dessa forma, é de suma

importância a avaliação de parâmetros macroclimáticos (precipitação, temperatura do ar, etc) e microclimáticos (temperatura do solo, umidade do solo, etc) que podem influenciar diretamente a ciclagem do N no campo. O desafio para pesquisas futuras, porém, é o de identificar os principais fatores controladores, especialmente aqueles pertencentes ao macroclima, cuja relação com o N mineralizável é pouco conhecida (DESSUREAULT-ROMPRÉ et al., 2010). Assim, o uso da modelagem matemática pode resultar em avanços significativos na avaliação da disponibilidade do nutriente no solo, caso parâmetros como fatores climáticos e métodos para a predição do N mineralizável sejam integrados aos modelos. A contribuição do N disponibilizado pela fixação biológica de N e/ou promoção do crescimento por bactérias diazotróficas também deve ser considerada na avaliação da disponibilidade de N para a cultura.

Embora o presente estudo não tenha utilizado parcelas experimentais onde há remoção parcial ou total da palha de cana-de-açúcar, foi verificado que este resíduo vegetal desempenha um papel de fornecedor de compostos do NOD para o solo superficial da camada de 0,0-2,5 cm. O solo, por sua vez, atua como um dreno do NOD, por adsorver nos colóides minerais e orgânicos, moléculas de aminoácidos e proteínas que poderão ser deslocadas para a solução caso haja depleção das mesmas nessa fase pela absorção por microrganismos ou plantas (JONES et al., 2005; FARRELL et al., 2011; HILL; FARRELL; JONES, 2012). A mineralização de aminoácidos, peptídeos, ureia e proteína, de modo geral, mais rápida na palha em relação ao solo, se deve ao uso dos compostos majoritariamente para a respiração da biomassa microbiana no resíduo cultural. As diferenças marcantes na composição da comunidade microbiana pela análise de PLFA entre a palha e o solo também deve ser destacada. Monômeros do NOD (aminoácidos, pequenos peptídeos, ácidos nucleicos, etc) podem ser absorvidos diretamente pela cana-de-açúcar em caso de limitação de N no sistema, ou ainda serem mineralizados pela biomassa microbiana, que poderá disponibilizar N-NH_4^+ caso a relação C/N no solo seja estreita. Contudo, pesquisas futuras são necessárias na avaliação de métodos que minimizem os distúrbios na estrutura *in situ* do solo, como a microdialise, para monitoramento do N mineral e NOD (INSELSBACHER et al., 2011).

Por fim, a maior mineralização da ^{14}C -glicose quando associada ao N-NO_3^- indica que a aplicação de fertilizantes nitrogenados nítricos sobre a palha de cana-de-açúcar pode intensificar o uso de C orgânico lábil pela microbiota localizada no resíduo vegetal, como substrato energético para a redução assimilatória do NO_3^- . Contudo, a

aplicação de N-NO_3^- resultou em taxa de imobilização microbiana 2,65 vezes menor que a de N-NH_4^+ , o que sugere maior tempo de residência do ânion supracitado na palha ou solo. Embora Robinson et al. (2011) tenham reportado a preferência de plântulas de cana-de-açúcar por N-NH_4^+ à N-NO_3^- , é importante lembrar que o referido estudo foi desenvolvido em sistema de cultivo hidropônico (sem utilização de solo), de modo que a imobilização microbiana de N mineral pode ser desprezada. Com isso, uma ponderação pode ser feita: a preferência da cultura pelo N-NH_4^+ se mantém vantajosa frente à elevada imobilização desse cátion, especialmente na palha, onde são aplicados os fertilizantes nitrogenados? Com base nos resultados de imobilização de N verificados, é pertinente a realização de estudos avaliando a eficiência de uso de fontes nitrogenadas amoniacais e nítricas pela cana-de-açúcar, em condições de campo.

Referências

- DESSUREAULT-ROMPRÉ, J.; ZEBARTH, B.J.; BURTON, D.L.; SHARIFI, M.; COOPER, J.; GRANT, C.A.; DRURY, C.F. Relationships among mineralizable soil nitrogen, soil properties, and climatic indices. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 1218-12127, 2010.
- FARRELL, M.; HILL, P.W.; WANNIARACHCHI, S.D.; FARRAR, J.; BARDGETT, R.D.; JONES, D.L. Rapid peptide metabolism: a major component of soil nitrogen cycling? **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 25, p. 1-11, 2011.
- HILL, P.W.; FARRELL, M.; JONES, D.L. Bigger may be better in soil N cycling: does rapid acquisition of small L-peptides by soil microbes dominate fluxes of protein-derived N in soil? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 48, p. 106-112, 2012.
- INSELBACHER, E.; ÖHLUND, J.; JÄMTGÅRD, S.; HUSS-DANEL, K.; NÄSHOLM, T. The potential of microdialysis to monitor organic and inorganic nitrogen compounds in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1321-1332, 2011.
- JONES, D.L.; JOHN, R.H.; WILLET, V.B.; FARRAR, J.F.; HODGE, A. Dissolved organic nitrogen uptake by plants – an important N uptake pathway? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 413-423, 2005.
- 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.

NANNIPIERI, P.; PAUL, E.A. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2357-2369, 2009.

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.

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**, San Francisco, v. 6, e19045, 2011.

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