

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**JOÃO JOSÉ DE MIRANDA MILAGRES**

**Emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes do fertilizante aplicado a solos  
cultivados com cana-de-açúcar pelo método do traçador <sup>15</sup>N**

**Piracicaba**

**2014**



**JOÃO JOSÉ DE MIRANDA MILAGRES**

**Emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes do fertilizante aplicado a solos  
cultivados com cana-de-açúcar pelo método do traçador <sup>15</sup>N**

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear  
na Agricultura da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na  
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. José Albertino Bendassolli**

**Piracicaba**

**2014**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Milagres, João José de Miranda

Emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes do fertilizante aplicado a solos cultivados com cana-de-açúcar pelo método do traçador <sup>15</sup>N / João José de Miranda Milagres; orientador José Albertino Bendassolli. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

103 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Desnitrificação 2. Espectrometria de massas 3. Fertilizantes nitrogenados 4. Isótopos estáveis 5. Nitrificação 6. Vinhaça I. Título

CDU 621.039.85 : 633.61

Ao meu pai, **Jayr Milagres da Silva**,  
pela firmeza de caráter, simplicidade e honestidade,

À minha mãe, **Rita Isabel Araújo Milagres**,  
pelo amor, dedicação e carinho,

Às minhas irmãs, **Simone e Valéria**,  
pelo incentivo e amizade.

## **DEDICO**

À minha esposa **Regina**, e aos nossos  
filhos, **Mateus, Yasmin e Clara**, pelo amor,  
carinho, apoio e companheirismo.

## **OFEREÇO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, iluminando o meu caminho.

Ao Professor José Albertino Bendassolli, pela orientação, amizade e, acima de tudo, pelo exemplo de vida e de dedicação ao próximo.

Ao Professor Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pelo apoio, incentivo, conhecimento compartilhado e exemplo de profissionalismo.

Ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa por apoiar a minha qualificação, permitindo que me dedicasse, exclusivamente, aos estudos.

Aos Professores Ivo Ribeiro da Silva e Reinaldo Bertola Cantarutti do DPS/UFV, pelo apoio a todas as minhas iniciativas de qualificação profissional.

À equipe do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP: Ana Paula, Bento, Clélber, Glauco, Hugo, Juliana e Magda, pela dedicação e prazeroso convívio; aos técnicos José Aurélio Bonassi (Pingin) e Miguel Luiz Baldessin pelos conhecimentos compartilhados sobre técnicas de vácuo e espectrometria de massas de razão isotópica, imprescindíveis na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pela concessão da bolsa de estudo; à FAPESP (Processo 2013/08980-4), pelo suporte financeiro.

Ao Engenheiro Agrônomo André Cesar Vitti, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA de Piracicaba/SP, pelo apoio na condução dos experimentos de campo.

Aos amigos da Pós-Graduação: Oriel T. Kölln, Murilo I. M. de Moraes, José Marcos Leite, Eduardo Mariano, Paulo R. C. Lazzarini, Hugo A. G. Villalba, Lucas Miachon, Stefânia M. S. Dandrea, Michele X. V. Megda, Evandro L. Schöninger, Beatriz Nastaro, Felipe R. Nolasco, André Ferreira, Diego Vendramini, Graziela M. de Moraes, Karine B. G. Campos, Alexssandra L. R. M. Rossete e Rafael Otto, pelos momentos prazerosos de trabalho e diversão.

Aos estagiários do LIE/CENA: Jussara, Carol, João Luís, Lucas e Luis, pela ajuda e pelo agradável convívio; a Ana Paula (ainda estagiária) e ao Luiz Henrique, por terem se comprometido com meu trabalho e ajudado imensamente.

Ao amigo Carlos Roberto Sant'Ana Filho, pelo apoio, pelas ideias e pela amizade construída ao longo dessa etapa.

Aos amigos do Edifício Jequitibá, pela acolhida fraterna e pelos momentos de descontração.

A todos que, embora não citados no texto, contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal nessa etapa da minha vida.

**OBRIGADO!**

## RESUMO

MILAGRES, J. J. de M. **Emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes do fertilizante aplicado a solos cultivados com cana-de-açúcar pelo método do traçador <sup>15</sup>N.** 2014. 103 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O reduzem a eficiência da adubação e podem causar danos ambientais. O método do traçador isotópico (<sup>15</sup>N) é indicado para medições de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, mas não há relatos de sua utilização no Brasil na quantificação desses gases. O objetivo deste estudo foi adaptar o método do traçador <sup>15</sup>N às condições brasileiras para quantificar N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O derivados do fertilizante aplicado à cana-de-açúcar. Para o ajuste do método foram conduzidos três experimentos: um em condições controladas e dois em condições de campo. Em ambiente controlado foram utilizados três solos com diferentes classes texturais. A influência da umidade (40, 60 e 80% da capacidade máxima de retenção de água - CMRA) e da adição ou não de dextrose (500 mg kg<sup>-1</sup> de C), foram outros parâmetros avaliados. O K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> enriquecido em 23,24% em átomos de <sup>15</sup>N foi a fonte de N (100 mg kg<sup>-1</sup> de N) utilizada. Os trabalhos de campo foram realizados em Latossolo Vermelho da região de Piracicaba-SP, em área de cana-de-açúcar sem despalha a fogo. No segundo experimento, foram testadas: fontes de N (<sup>15</sup>ureia e <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, ambos com 31,9% em átomos de <sup>15</sup>N); doses de N (55 e 110 kg ha<sup>-1</sup>); com e sem vinhaça (100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>). No terceiro foram testadas doses de N (70 e 140 kg ha<sup>-1</sup>) na forma de <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>; doses de vinhaça (75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>); com e sem a cobertura de palha (11 Mg ha<sup>-1</sup>). Em cada experimento, buscou-se aprimorar o protocolo de coleta, preparo e análise dos gases. No primeiro experimento observou-se que somente tratamentos com dextrose emitiram N<sub>2</sub>O, sendo as emissões aumentadas com a elevação da CMRA de 40 para 60%. Perdas de N (N<sub>2</sub> + N<sub>2</sub>O) do K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> variaram de 0,04 a 48,26%. No segundo experimento não foram observadas emissões nos tratamentos com <sup>15</sup>ureia. Nos tratamentos com <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, somente N<sub>2</sub>O foi detectado. A vinhaça potencializou as emissões de N<sub>2</sub>O, mas os fatores de emissão ficaram abaixo de 0,4%. A não detecção do N<sub>2</sub> levantou a hipótese que o enriquecimento isotópico dos fertilizantes foi insuficiente para marcar o N<sub>2</sub> do interior das câmaras. Então, no último experimento, utilizou-se o <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> enriquecido a 98 e a 10,43% para as determinações de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, respectivamente. Neste experimento a manutenção da palha intensificou as emissões de N<sub>2</sub>O proveniente do <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>; a umidade, a temperatura, o N-mineral e o C-lábil do solo não apresentaram correlações significativas com emissões de N<sub>2</sub>O. Os fatores de emissão foram inferiores a 0,2%. No último experimento, também não foi detectado o N<sub>2</sub>, sugerindo que o N<sub>2</sub>O tenha sido o produto final da desnitrificação nos experimentos de campo. Os resultados mostraram que as adaptações realizadas no método do traçador <sup>15</sup>N foram eficazes para a quantificação dos gases. Outras adaptações, entretanto, deverão surgir à medida que a adoção do método do traçador <sup>15</sup>N se intensifique no Brasil.

**Palavras-chave:** IRMS. Nitrificação. Desnitrificação. Isótopo. Vinhaça. Palha.



## ABSTRACT

MILAGRES, J. J. de M. **N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from fertilizer applied on soil cultivated with sugarcane measured by <sup>15</sup>N tracer method.** 2014. 103 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions decrease the fertilization efficiency and can cause environmental damages. The <sup>15</sup>N tracer method is used to measure N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions, but there are no reports of its application in Brazil. The objective of the present study was to adapt the <sup>15</sup>N tracer method to Brazilian conditions to quantify the N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O from fertilizers applied in sugarcane crop. Three experiments were conducted to adjusting the method: one in controlled conditions and the others in field. In controlled conditions, three soils with distinct textural class were evaluated. It was measured the moisture content (40, 60 and 80 % of water holding capacity – CMRA) and two levels of dextrose (0 and 500 mg C kg<sup>-1</sup>). K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> (23.24 atom% <sup>15</sup>N) was the N source used (100 mg kg<sup>-1</sup>). The field experiments were carried out on a Rhodic Dystrudox in Piracicaba region, Sao Paulo state. In the second experiment, two N sources (urea and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, both with 31.9 atom% <sup>15</sup>N), two N levels (55 and 110 kg ha<sup>-1</sup>) and two vinasse addition levels (0 and 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) were evaluated. In the third experiment, two N levels (70 and 140 kg ha<sup>-1</sup>) using <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> as N source, two vinasse levels (75 and 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) and the presence (11 Mg ha<sup>-1</sup>) or not of straw covering were evaluated. In each experiment, we try to improve our sampling protocol, gases preparing and analysis based on the limitations detected. In the first experiment, the N<sub>2</sub>O emissions occurred only in dextrose presence and were increased when the CMRA was raised to 60%. The N losses (N<sub>2</sub>+N<sub>2</sub>O) from K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> varied from 0.04 to 48.26%. In the second experiment, it was not observed N<sub>2</sub>O emission with urea fertilization. In the treatments with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> fertilization, it was only observed N<sub>2</sub>O emission. The vinasse application potentiated the N<sub>2</sub>O emissions, but the emissions factors were below 0.4 %. We believed that fertilizer isotopic enrichment was not sufficient to label the N<sub>2</sub> inside chambers and because of this it was not possible measure N<sub>2</sub> emission. So, in the last experiment, we used the <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> enriched with 98 and 10.43 atom% <sup>15</sup>N to measure the N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emission, respectively. In the same experiment, the straw maintenance on soil surface increased the N<sub>2</sub>O emissions from NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. The moisture, temperature, N-mineral and the C-labile were not significantly correlated with N<sub>2</sub>O emissions. The emissions factors were under of 0.2%. In the last experiment, likewise, it was not detected N<sub>2</sub> emission, suggesting that the final product from denitrification was N<sub>2</sub>O in field experiments. Our results showed that adaptations realized in <sup>15</sup>N tracer method were effective to quantify gases emissions. However, others adaptations can arise as result of intensification in adoption of <sup>15</sup>N tracer method in Brazil.

**Keywords:** IRMS. Nitrification. Denitrification. Isotope. Vinasse. Straw.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
<b>2 PERDAS DE N POR DESNITRIFICAÇÃO AVALIADAS PELO MÉTODO DO TRAÇADOR <sup>15</sup>N</b> .....	20
RESUMO .....	20
ABSTRACT .....	21
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
2.3.1 Emissão acumulada de N <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> O proveniente da fonte nítrica .....	31
2.3.2 Perdas relativas de N nas formas de N <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> O e fração molar de N <sub>2</sub> O .....	34
2.3.3 Balanço de <sup>15</sup> N .....	37
<b>2.4 CONCLUSÕES</b> .....	40
REFERÊNCIAS .....	40
<b>3 UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DO TRAÇADOR <sup>15</sup>N PARA AVALIAR AS EMISSÕES DE N<sub>2</sub> E N<sub>2</sub>O PROVENIENTES DA FERTILIZAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES FONTES DE N</b> .....	44
RESUMO .....	44
ABSTRACT .....	45
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos .....	49
3.2.1 Determinação do tempo de fechamento das câmaras para amostragem dos gases .....	50
3.2.3 Amostragem dos gases .....	51
3.2.4 Preparo das amostras para análise de N <sub>2</sub> O no IRMS .....	52
3.2.5 Análise dos gases .....	54
3.2.6 Análise das variáveis relacionadas (precipitação, temperatura do ar e do solo e umidade do solo) .....	55
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
3.3.1 Tempo de fechamento das câmaras .....	56
3.3.2 Variáveis relacionadas .....	57

3.3.3 Emissões .....	60
<b>3.4 CONCLUSÕES</b> .....	67
REFERÊNCIAS .....	67
<b>4 EMISSÕES DE N<sub>2</sub> E N<sub>2</sub>O PELO MÉTODO DO TRAÇADOR <sup>15</sup>N E ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR</b> .....	72
RESUMO .....	72
ABSTRACT .....	73
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	74
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	77
4.2.1 Delineamento experimental e tratamentos .....	77
4.2.2 Amostragem dos gases .....	79
4.2.3 Preparo das amostras para análise de N <sub>2</sub> O no IRMS .....	81
4.2.4 Análise dos gases .....	83
4.2.5 Análise das variáveis relacionadas (precipitação, temperatura do ar e do solo, umidade do solo e teores de nitrato, amônio e carbono lábil do solo) .....	84
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	86
4.3.1 Eficiência da transferência de N <sub>2</sub> O através da linha de alto vácuo .....	86
4.3.2 Variáveis relacionadas .....	88
4.3.3 Emissões .....	93
4.3.3.1 Emissões de N <sub>2</sub> proveniente do fertilizante .....	93
4.3.3.2 Emissões de N <sub>2</sub> O proveniente do fertilizante .....	94
4.3.3.3 Fator de Emissão .....	98
<b>4.4 CONCLUSÕES</b> .....	99
REFERÊNCIAS .....	100

## 1 - INTRODUÇÃO

A população mundial atingiu em 2011 a marca de sete bilhões de habitantes e, segundo estimativas da ONU, em 2050 ultrapassará os nove bilhões. Aumentar em 70% a produção de alimentos até 2050 e combater a fome e a pobreza serão alguns dos desafios da agricultura nas próximas décadas (FAO, 2009). Além da necessidade de aumentar a produção de alimentos, o crescimento populacional irá, também, demandar um aumento na produção de energia, tornando a agricultura ainda mais essencial, uma vez que é utilizada para a produção de matéria prima de fontes de energia renováveis.

A FAO estima que 90% do aumento da produção agrícola virão do aumento da produtividade e 10% da expansão das fronteiras agrícolas, uma vez que há poucas áreas agricultáveis no mundo que podem ser exploradas sem danos ambientais. Para incrementar a produtividade agrícola será necessário aumentar a quantidade de insumos, principalmente dos fertilizantes que, se não utilizados em quantidades adequadas, podem causar prejuízos econômicos e ambientais.

A adubação nitrogenada é indispensável para a maioria das culturas agrícolas. O elevado valor do adubo nitrogenado e sua alta taxa de aplicação fazem com que represente um dos insumos mais caros da agricultura. Para reduzir a quantidade aplicada de nitrogênio é necessário que haja um aumento da eficiência da adubação a fim de não comprometer a produtividade. Resultados de ensaios mostraram perdas do N-fertilizante variando de 12 a 60%, indicando que a eficiência da adubação pode ser melhorada (TRIVELIN et al., 2002; GAVA et al., 2006; VITTI et al., 2007; FENILLI, 2008; FRANCO et al., 2008).

Dentre as principais possibilidades de perdas de N no sistema solo-planta estão: a erosão do solo; a volatilização da amônia ( $\text{NH}_3$ ); a lixiviação do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ); as trocas gasosas de N pela parte aérea dos vegetais e as perdas na forma de óxidos de N ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$  e  $\text{N}_2\text{O}$ ) e nitrogênio elementar ( $\text{N}_2$ ). Estas duas últimas estão relacionadas, principalmente, aos processos de nitrificação e desnitrificação no solo (KOOL et al., 2011).

O  $\text{N}_2$  é o produto final da desnitrificação e ocupa 78% (v/v) do volume dos gases na atmosfera, sendo a molécula extremamente estável, graças à ligação tripla de seus átomos. O  $\text{N}_2\text{O}$  é um intermediário obrigatório do processo de desnitrificação e pode ser gerado também durante a nitrificação. A perda de N na forma de  $\text{N}_2\text{O}$  reduz a eficiência da fertilização nitrogenada e pode causar um impacto negativo sobre o meio ambiente, pois é um dos

principais gases do efeito estufa (IPCC, 2007), além de ser um intermediador do processo de destruição da camada de ozônio (CRUTZEN, 1972).

Desde que o ciclo do nitrogênio foi proposto, acreditava-se que a nitrificação era mediada, somente, pelos grupos de bactérias quimioautotróficas, as *Nitrosomonas*, que oxidam a amônia, e as *Nitrobacter*, que oxidam o nitrito. Acreditava-se, também, que a desnitrificação era realizada somente por bactérias em condições anaeróbias. Atualmente é sabido que outros microrganismos, como os fungos e as arqueas, estão envolvidos nos processos de nitrificação e desnitrificação (Figura 1), e que várias bactérias reduzem o nitrito ou nitrato a  $N_2O$  e  $N_2$ , mesmo na presença de  $O_2$ , tornando a desnitrificação aeróbia mais comum do que uma mera exceção (HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008).

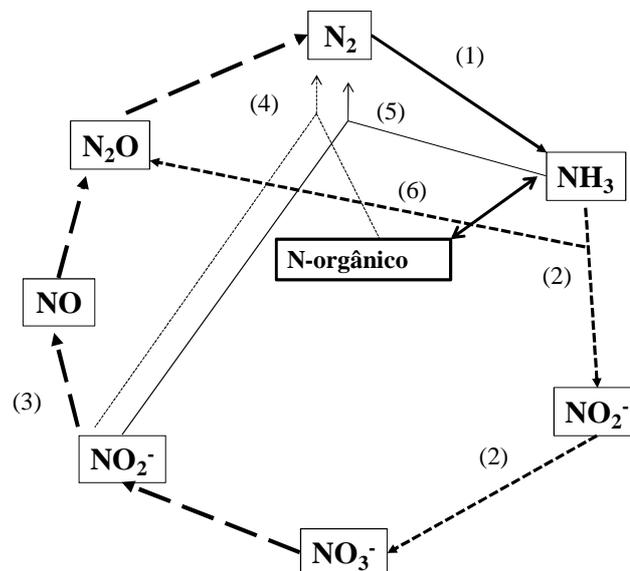
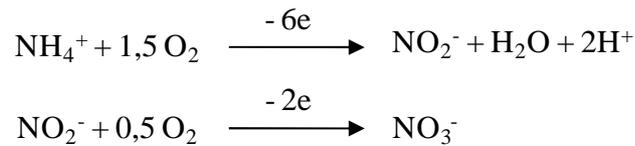


Figura 1 - Processos microbiológicos do ciclo do nitrogênio: (1) fixação; (2) nitrificação por bactérias, nitrificação por arqueas e nitrificação por microrganismos heterotróficos; (3) desnitrificação por bactérias aeróbias e anaeróbias, desnitrificação por nitrificadores, desnitrificação por fungos e desnitrificação por arqueas; (4) e (5) codesnitrificação por fungos; (5) oxidação anaeróbia da amônia e (6) produção de  $N_2O$  durante a nitrificação (oxidação da amônia). (Fonte: HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008).

A nitrificação é a conversão biológica do N reduzido, geralmente na forma de amônia ( $NH_3$ ) ou amônio ( $NH_4^+$ ), para N oxidado na forma de nitrito ( $NO_2^-$ ) ou nitrato ( $NO_3^-$ ) (BREMNER, 1997). De maneira geral, as reações de nitrificação podem ser resumidas da seguinte forma:



A desnitrificação é um processo respiratório que ocorre, quase sempre, na ausência de  $\text{O}_2$ , no qual óxidos de nitrogênio servem como receptores finais de elétrons (CANTARELLA, 2007; HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008). Embora a desnitrificação completa origine uma perda de N do sistema solo-planta, ela é de fundamental importância no ciclo global do nitrogênio, uma vez que é o principal processo de retorno à atmosfera do N inorgânico do solo (LIU et al., 2007). As etapas da desnitrificação, catalisadas pela ação de quatro enzimas, são usualmente representadas como:



A disponibilidade de N inorgânico e carbono lábil, a concentração de oxigênio, além de fatores como pH, textura, temperatura e umidade do solo, influenciam as atividades microbiológicas e a difusão dos gases, aumentando ou diminuindo a produção e a emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ , bem como a razão  $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ . Os processos de geração dos gases dependem de uma complexa interação entre as propriedades do solo, microrganismos, fatores climáticos e práticas de manejo e são extremamente variáveis no tempo e no espaço (MATHIEU et al., 2006; SAGGAR et al., 2013).

Práticas agrícolas que promovam alterações nas condições do solo irão modificar a intensidade e a frequência dos processos que levam a geração e a emissão dos gases  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ . As práticas que elevam a disponibilidade de N e C e que aumentam a umidade do solo irão intensificar as atividades microbiológicas e, conseqüentemente, aumentar os riscos de perdas de N do sistema solo-planta. A manutenção dos resíduos vegetais sobre o solo após a colheita, a aplicação de fertilizantes nitrogenados e a irrigação são práticas que aumentam a

produtividade das culturas, mas que devem ser otimizadas não só por motivos econômicos, mastambém, por motivos ambientais.

A determinação do  $N_2O$  é normalmente realizada por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons CG-DCE. A determinação é relativamente simples, uma vez que o CG-DCE possui sensibilidade para detectar a variação de concentração de  $N_2O$  contra um nível traço de  $N_2O$  atmosférico que, atualmente, é de 324 ppb (IPCC, 2013). A determinação de  $N_2$  é mais complexa devido às dificuldades de medição de pequenas quantidades emitidas em uma atmosfera que, naturalmente, contém 78% (v/v) desse gás. Um dos métodos mais indicados para a quantificação simultânea de  $N_2$  e  $N_2O$  é o método do traçador  $^{15}N$ , que consiste em marcar a fonte de N ( $^{15}NH_4^+$  ou  $^{15}NO_3^-$ ) e posteriormente determinar o  $^{15}N_2$  e  $^{15}N_2O$  proveniente da fonte marcada, utilizando um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS – *Isotope Radio Mass Spectrometer*). Apesar da sua indicação e da utilização em vários países, não há relatos da adoção desse método no Brasil para a quantificação de  $N_2$  e  $N_2O$ .

Com vista no exposto, torna-se relevante adaptar a técnica do traçador  $^{15}N$  às condições brasileiras, para que se possa avaliar a magnitude das emissões de óxido nitroso e dinitrogênio oriundas do fertilizante aplicado em culturas de grande interesse para o país, como a cana-de-açúcar. As informações geradas pela quantificação das perdas de N nas formas de  $N_2$  e  $N_2O$  serão importantes para a elaboração de estratégias de manejo que aumentem a eficiência da adubação nitrogenada e reduzam o impacto ambiental ocasionado pelo uso de fertilizantes.

Portanto, o presente estudo teve como objetivos:

- Otimizar os parâmetros operacionais do IRMS para a quantificação das emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  provenientes de uma fonte marcada com  $^{15}N$ ;
- Elaborar um protocolo de coleta e preparo de amostras gasosas ( $N_2$  e  $N_2O$ ) para análise no IRMS;
- Avaliar, em condições controladas, o efeito da textura, da umidade e da disponibilidade de carbono no solo sobre as perdas gasosas de N na forma de  $N_2$  e  $N_2O$ , utilizando-se do método do traçador  $^{15}N$ ;
- Quantificar as emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  em solo cultivado com cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo, avaliando o efeito da temperatura e da umidade do solo, das fontes e doses de N, das doses de vinhaça e da cobertura do solo com palha.

Os resultados experimentais deste trabalho serão apresentados em três capítulos, a saber:

1. Perdas de N por desnitrificação avaliadas pelo método do traçador  $^{15}\text{N}$ ;
2. Utilização do método do traçador  $^{15}\text{N}$  para avaliar as emissões de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  provenientes da fertilização da cana-de-açúcar com diferentes fontes de N;
3. Emissões de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  pelo método do traçador  $^{15}\text{N}$  e atributos físicos e químicos do solo cultivado com cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

BREMNER, J. M. Sources of nitrous oxide in soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 49, p 7-16, 1997.

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

CRUTZEN, P. J. SST's – A threat to the earth's ozone shield. **Ambio**, Stockholm, v. 1, p. 41-51, 1972.

FAO.2050: Increased investment in agricultural research essential. Roma, 2009. Disponível em:<<http://www.fao.org/news/story/en/item/35686/icode/>>. Acesso em: 03 out. 2013.

FENILLI, T. A. B.; REICHARDT, K.; FAVARIN, J. L.; BACCHI, O. O. S.; SILVA, A. L.; TIMM, L. C. Fertilizer <sup>15</sup>N balance in a coffee cropping system: a case study in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1459-1469, 2008.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2763-2770, 2008. Número especial.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. A. Balanço do nitrogênio da uréia (15N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n.3, p. 477-486, 2006.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 54, p. 33-45, 2008.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **Summary for Policymakers**. Climate Change 2007. Synthesis report of 4<sup>th</sup> Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 22. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **Summary for Policymakers**. Climate Change 2013. The physical science basis. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

KOOL, D. M.; DOLFING, J.; WRAGE, N.; VAN GROENIGEN, J. W. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 174-178, 2011.

LIU, X. J.; MOSIER, A. R.; HALVORSON, A. D.; REULE, C. A.; ZHANG, F. S. Dinitrogen and N<sub>2</sub>O emissions in arable soil: Effect of tillage, N source and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2362-2370, 2007.

MATHIEU, O.; LÉVÊQUE, J.; HÉNAULT, C.; MILLOX, M. J.; BIZOUARD, F.; ANDREUX, F. Emission and spatial variability of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with <sup>15</sup>N isotopic techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 941-951, 2006.

SAGGAR, S.; JHA, N.; DESLIPPE, J.; BOLAN, N. S.; LUO, J.; GILTRAP, D. L.; KIM, D. G.; ZAMAN, M.; TILLMAN, R. W. Denitrification and N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: Process, measurements, modeling and mitigating negative impacts. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 465, p. 173-195, 2013.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas de nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 193-201, 2002.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; FRANCO, H. C. J.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 491-498, 2007.

## 2 - PERDAS DE N POR DESNITRIFICAÇÃO AVALIADAS PELO MÉTODO DO TRAÇADOR $^{15}\text{N}$

### Resumo

Os gases  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  gerados pela desnitrificação incrementam as perdas de N no sistema solo-planta, reduzindo a eficiência da adubação nitrogenada e podendo causar danos ambientais. Quantificar as emissões desses gases é complexo, devido, principalmente, a dificuldade de medição do  $\text{N}_2$  em uma atmosfera composta por 78% (v/v) deste gás. Um dos métodos utilizados para determinação simultânea de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  é o método do traçador  $^{15}\text{N}$ , mas sua utilização não tem precedentes no Brasil. O objetivo deste trabalho foi quantificar o  $\text{N}_2$  e o  $\text{N}_2\text{O}$  provenientes do  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  aplicado a solos com diferentes texturas e umidade, na ausência e na presença de uma fonte de C lábil, utilizando o método do traçador  $^{15}\text{N}$ . Nos três solos utilizados (Neossolo Quartzarênico (NQ); Latossolo Vermelho (LV-J), textura franco argilo arenosa e Latossolo Vermelho (LV-P), textura argilosa), avaliou-se três níveis de umidade (40, 60 e 80% da capacidade máxima de retenção de água - CMRA), com e sem a adição de dextrose ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de C), com 5 repetições, em delineamento inteiramente casualizado, representando um fatorial  $3 \times 2$ . Todos os tratamentos receberam uma dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de N ( $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  com 23,24% em átomos de  $^{15}\text{N}$ ). Os solos foram incubados em frascos de vidro por 18 dias e os gases foram analisados diariamente em espectrômetro de massas de razão isotópica. Emissões de  $\text{N}_2$  ocorreram em todos os tratamentos, mas somente nos tratamentos com a adição da dextrose ( $\text{D}^+$ ) foram observadas emissões de  $\text{N}_2\text{O}$ , sendo essas aumentadas com a elevação da umidade de 40 para 60% da CMRA. O LV-J com 80% da CMRA, no tratamento  $\text{D}^+$ , apresentou a maior emissão acumulada de N ( $48,26 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Perdas relativas de N ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ), proveniente do  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ , variaram de 0,04 a 48,26%. Com o balanço do  $^{15}\text{N}$  observou-se que a desnitrificação ocorreu em todos os tratamentos, embora as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  não tenham sido detectadas nos tratamentos que não receberam a fonte de C lábil, sugerindo um aprisionamento dos gases, principalmente no solo mais argiloso. O método do traçador  $^{15}\text{N}$  mostrou-se adequado para quantificação dos gases  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  proveniente de uma fonte nítrica marcada com  $^{15}\text{N}$ .

**Palavras-chave:**  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ . Espectrometria de massas de razão isotópica. Balanço de  $^{15}\text{N}$ .

## Abstract

$N_2$  and  $N_2O$  gases generated by denitrification increase N losses in the soil-plant system, thus making nitrogen fertilizer less efficient, and can cause environmental damage. Quantifying emissions of these gases is complex, especially for  $N_2$  because 78% (v/v) of the atmosphere is comprised of this gas, thereby making it difficult to measure. The  $^{15}N$  tracer method is used to simultaneously determine  $N_2$  and  $N_2O$ , but its use has no precedent in Brazil. This study aimed to quantify  $N_2$  and  $N_2O$  from  $K^{15}NO_3$  applied to soils with different textures and moisture contents in the absence and presence of a source of labile C using the  $^{15}N$  tracer method. In the three soils used (Quartzipsamment, sandy texture (NQ); Rhodic Eutrudox, sandy clay loam texture (LV-J); and Rhodic Dystrudox, clayey texture, (LV-P)), three moisture contents were evaluated (40, 60, and 80% of water holding capacity - CMRA) with ( $D^+$ ) and without ( $D^-$ ) dextrose added ( $500 \text{ mg kg}^{-1} \text{ C}$ ). Five replicates in a completely randomized  $3 \times 2$  factorial design were measured for each soil. All of the treatments received a dose of  $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ N}$  ( $KNO_3$  with the nitrate moiety labeled with  $^{15}N$  at 23.24 atom %). The soils were incubated in glass flasks for 18 days, and the gases were analyzed daily in an isotope ratio mass spectrometer (IRMS).  $N_2$  emissions occurred in all of the treatments, but  $N_2O$  emissions only occurred in the treatment with dextrose added ( $D^+$ ), showing increases with increasing moisture content from 40 to 60% CMRA. LV-J with 80% CMRA in the  $D^+$  treatment exhibited the highest accumulated N emission ( $48.26 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Relative N losses ( $N_2 + N_2O$ ) from  $K^{15}NO_3$  ranged from 0.04 to 48.26%. Regarding  $^{15}N$  balance, denitrification occurred in all of the treatments, but the  $N_2O$  emissions remained undetected in the treatments without a source of labile C added, thereby suggesting that the gases were trapped, especially in the more clayey soil. The  $^{15}N$  tracer method was adequate in quantifying  $N_2$  and  $N_2O$  gas emissions from a nitrogen source labeled with  $^{15}N$ .

**Keywords:**  $N_2$ .  $N_2O$ . Isotope ratio mass spectrometry.  $^{15}N$  balance.

## 2.1 – Introdução

A perda de N do fertilizante provocada pela emissão de gases, como o nitrogênio molecular ( $N_2$ ) e o óxido nitroso ( $N_2O$ ), é uma das razões para a baixa eficiência da adubação nitrogenada (SCHEER et al., 2009). O  $N_2$  é produzido nos ecossistemas terrestres, principalmente por bactérias desnitrificadoras que, em meio anaeróbico, reduzem o nitrato ( $NO_3^-$ ) a  $N_2O$  e, em seguida, a  $N_2$ , se a sequência de redução for completa (BREMNER, 1997). O  $N_2O$  pode ser gerado no solo por outros processos além da desnitrificação, sendo a nitrificação um dos mais relevantes (KOLL et al., 2011; BUTTERBACH-BAHL et al., 2013).

A produção de  $N_2$  remove o N reativo da biosfera, fechando o ciclo global do N, sem danos ambientais (LIU et al., 2007). Entretanto, havendo emissão de  $N_2O$ , prejuízos ambientais poderão ocorrer, pois esse é um importante gás do efeito estufa (IPCC, 2007) e um catalisador na destruição da camada de ozônio (CRUTZEN, 1972). Dentre os diversos fatores que influenciam a desnitrificação, a disponibilidade de uma fonte nítrica, a baixa concentração de oxigênio e a disponibilidade de uma fonte de carbono lábil, estão entre os principais (MATHIEU et al., 2006).

Os gases emitidos são geralmente mensurados após a contenção em câmaras estáticas instaladas sobre o solo para facilitar a coleta das amostras. A concentração de  $N_2O$  do interior das câmaras é normalmente determinada por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE). A quantificação do  $N_2$  é mais complexa devido às dificuldades de medição de pequenas quantidades desse gás em uma atmosfera que, naturalmente, contém 78% (v/v) de  $N_2$  em sua composição (DAVIDSON; SEITZINGER, 2006).

Métodos de quantificação têm sido propostos na tentativa de entender melhor os fatores que controlam a os processos de geração e emissão de  $N_2$  e  $N_2O$  a partir do solo. Alguns desses métodos são baseados em: a) uso do isótopo estável  $^{15}N$  para medir diretamente as emissões de  $^{15}N_2$  e  $^{15}N_2O$  (BAILY et al., 2012; MORSE; BERNHARDT, 2013; LEWICKA-SZCZEBAK et al., 2013), ou medir indiretamente  $^{15}N_2 + ^{15}N_2O$ , pelo balanço de massas (GAVA et al., 2006; FENILLI et al., 2008); b) uso do isótopo radioativo  $^{13}N$  (SPEIR; KETTLES; MORE, 1995); c) aplicação de gases inibidores, como o acetileno, para bloquear a desnitrificação por meio da inativação da enzima redutase do óxido nitroso (TIEDJE; SIMKINS; GROFFMAN, 1989) e d) substituição da atmosfera do solo por uma

atmosfera livre de  $N_2$ , para posterior medida direta das emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  provenientes do solo (DANNENMENN et al., 2008; SCHEER et al., 2009; YANG; SILVER, 2011).

A escolha do método para a quantificação das emissões é baseada, normalmente, pela disponibilidade de equipamentos de medição e pelo local de instalação do experimento, uma vez que todos os métodos possuem vantagens e desvantagens. Para o método do isótopo radioativo são necessários equipamentos para a produção e quantificação do  $^{13}N$  que, por sua vez, possui um tempo de meia vida de apenas 9,97 minutos (DAVID, 2005), inviabilizando os experimentos de campo (BUTTERBACH-BAHL; WILLIBALD; PAPEN, 2002). A substituição da atmosfera do solo por um gás inerte (He ou Ar) também é difícil a campo, pela facilidade de contaminação com o  $N_2$  atmosférico (STEVENS; LAUGHLIN, 1998). O método da inibição da desnitrificação pela aplicação do acetileno (inibição por acetileno) é utilizado em experimentos de campo e de laboratório, entretanto há problemas com o uso desta técnica, como a inibição simultânea da nitrificação (KLEMEDTSSON; SCENSSON; ROSSWALL, 1988), a distribuição irregular do inibidor no solo (JORDAN; WELLER; CORRELL, 1998) e o bloqueio incompleto da redutase do óxido nitroso, quando a concentração de  $NO_3^-$  no solo é baixa (SIMARMATA; BENKISER; OTTOW, 1993). Para o método do isótopo estável  $^{15}N$  (traçador  $^{15}N$ ), as principais limitações são: disponibilidade de um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS – *isotope ratio mass spectrometer*); alto limite de detecção do IRMS e a necessidade da marcação do substrato com o  $^{15}N$  (GROFFMAN et al., 2006).

O método mais utilizado até o momento é o da inibição por acetileno. Esse baseia-se na capacidade do gás acetileno em inibir a enzima redutase do óxido nitroso, impedindo a redução do  $N_2O$  para  $N_2$ , sendo o  $N_2O$  quantificado por CG-DCE. Nesse método, o  $N_2$  é estimado pela diferença entre o  $N_2O$  emitido nos tratamentos com e sem  $C_2H_2$ , ou seja, além das desvantagens citadas no parágrafo anterior, não é possível coletar os gases no mesmo momento, a partir do mesmo local de coleta.

O método do traçador  $^{15}N$  também vem sendo utilizado para a quantificação de  $N_2$  e  $N_2O$  e tem como princípio a diminuta variação na abundância natural dos isótopos estáveis  $^{14}N$  e  $^{15}N$  (99,6337 e 0,3663%, respectivamente). A técnica isotópica que emprega os isótopos estáveis de N ( $^{14}N$  e  $^{15}N$ ) como traçadores consiste, basicamente, em fornecer ao organismo em estudo um composto nitrogenado no qual a razão  $^{15}N:^{14}N$  é diferente da natural e, em seguida, avaliar a distribuição do isótopo pesado do elemento ( $^{15}N$ ) no sistema em estudo. Os átomos de  $^{14}N$  e  $^{15}N$  contidos no  $N_2$  formam as moléculas  $^{14}N^{14}N$ ,  $^{14}N^{15}N$  e  $^{15}N^{15}N$ , que podem

ser escritas como  $^{28}\text{N}_2$ ,  $^{29}\text{N}_2$  e  $^{30}\text{N}_2$ . A separação dessas moléculas de  $\text{N}_2$  após a ionização, e a quantificação das mesmas em IRMS, permite calcular a contribuição da fonte marcada com  $^{15}\text{N}$  sobre a quantidade total do gás produzido. Apesar das vantagens do método e de sua ampla utilização em diversos países, no Brasil não há precedentes do uso do traçador  $^{15}\text{N}$  para a quantificação dos gases  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ .

Os danos ambientais provocados pela emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  e a maior facilidade para quantificá-lo, têm gerado um maior número de pesquisas em relação às emissões de  $\text{N}_2$ . Os trabalhos que visam apenas estimar o fator de emissão (FE - quantidade de  $\text{N}_2\text{O}$  derivado do fertilizante nitrogenado), quando utilizam o CG-DCE, necessitam de tratamentos sem a adição do fertilizante nitrogenado, para que assim, subtraindo das emissões dos tratamentos com N, possam calcular o FE. A grande variabilidade espacial das emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  (MATHIEU et al., 2006), além do efeito *priming* da adição de N no estímulo a desnitrificação do N do solo, podem gerar resultados equivocados na estimativa do FE. Com o uso do método do traçador  $^{15}\text{N}$ , não há a necessidade do tratamento sem a adição de N, sendo os cálculos do FE realizados somente com as emissões das parcelas que receberam o fertilizante nitrogenado enriquecido em  $^{15}\text{N}$ .

Vale ressaltar que tanto as emissões de  $\text{N}_2$  quanto as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  causam prejuízos econômicos, uma vez que diminuem a disponibilidade de N para as plantas, independentemente da razão  $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ . Medir as quantidades de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ , derivados das transformações que o N do fertilizante sofre no solo, fornecerá informações sobre práticas agrícolas que possam mitigar as emissões e melhorar a eficiência da adubação nitrogenada. Este estudo, realizado em laboratório, teve como objetivo quantificar as perdas gasosas de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  provenientes do  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  aplicado a solos com diferentes classes texturais e umidade, na ausência e na presença de uma fonte de C prontamente disponível, utilizando o método do traçador  $^{15}\text{N}$ .

## 2.2 – Material e Métodos

Para medir as emissões de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  e avaliar a influência da umidade do solo e da disponibilidade de C no processo de desnitrificação, foram utilizados três solos com texturas distintas e com alguns atributos listados na Tabela 1. Para cada solo, foram avaliados três níveis de umidade, com e sem a adição de C, em delineamento inteiramente casualizado com

cinco repetições, representando um fatorial 3x2. As doses de N e C aplicadas visaram potencializar a desnitrificação e assim gerar os gases  $N_2$  e  $N_2O$ .

O experimento foi realizado no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo – LIE/CENA/USP, Piracicaba, SP. Os solos utilizados foram coletados em áreas cultivadas com cana-de-açúcar, sendo dois da região de Piracicaba-SP e um da região de Jaú-SP. Os solos de Piracicaba foram classificados como Neossolo Quartzarênico (NQ) e Latossolo Vermelho (LV-P) e o solo coletado em Jaú, como Latossolo Vermelho (LV-J) (EMBRAPA, 2006). A caracterização química e física dos solos indicou atributos bem distintos (Tabela 1).

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos dos solos

Solo	pH <sup>(1)</sup>	COT <sup>(2)</sup>	N <sup>(2)</sup>	C lábil <sup>(3)</sup>	Argila <sup>(4)</sup>	Classe Textural	Ds <sup>(5)</sup>	Dp <sup>(6)</sup>
		--- - - - - g kg <sup>-1</sup> - - - - -					kg dm <sup>-3</sup>	
NQ	4,8	3,59	0,39	0,24	74	Arenoso	1,49	2,48
LV-J	5,1	8,50	0,86	0,47	272	Franco Argilo Arenoso	1,29	2,73
LV-P	4,2	15,29	1,53	0,60	573	Argiloso	0,93	2,71

<sup>(1)</sup>pH em  $CaCl_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup> (RAIJ et al., 2001); <sup>(2)</sup>Carbono orgânico total e nitrogênio total por combustão seca; <sup>(3)</sup>Carbono lábil (WEIL et al., 2003); <sup>(4)</sup>Método da proveta (EMBRAPA, 1997); <sup>(5)</sup>Densidade do solo pelo método da proveta (EMBRAPA, 1997); <sup>(6)</sup>Densidade de partículas pelo método do balão volumétrico (EMBRAPA, 1997)

Amostras dos solos (0 a 0,2 m) foram secas ao ar e passadas em peneira de 2 mm, obtendo-se a terra fina seca ao ar (TFSA). Subamostras foram pesadas e secas em estufa por 48 h a 105 °C, para a determinação da umidade natural da TFSA.

Os níveis de umidade utilizados neste experimento foram de 40, 60 e 80% da capacidade máxima de retenção de água no solo (CMRA), obtidos com a adição de água desionizada. Nos tratamentos com adição de carbono, foram aplicados 4mL de uma solução de dextrose, com concentração necessária para o fornecimento adicional de 500 mg kg<sup>-1</sup> de C (base seca). A fonte nítrica na forma de  $K^{15}NO_3$ , marcada com 23,24% em átomos de <sup>15</sup>N (SANT ANA FILHO et al., 2008), foi diluída em água desionizada e aplicada na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> de N (base seca).

Em frascos de vidro de 350 cm<sup>3</sup>, foram colocados 200 cm<sup>3</sup> de solo, correspondendo a 297, 257 e 186 g dos solos NQ, LV-J e LV-P, respectivamente. Os frascos possuíam tampas metálicas com vedante interno e foram vazadas para a fixação de um septo de borracha de bromobutil que permitiu a coleta das amostras gasosas por meio de seringas. Os solos foram acondicionados nos frascos e pré-incubados com 30% da CMRA, em estufa climatizada (BOD) a 25 °C, durante cinco dias (Figura 1). A pré-incubação foi necessária para estabilizar as atividades microbiológicas (LIU et al., 2007). Após a pré-incubação, os frascos foram abertos e receberam os tratamentos, sem que os solos fossem revolvidos. Adicionou-se água desionizada até próximo à umidade desejada, depois foram adicionados 4,0 mL da solução de dextrose (tratamentos com C), e 5,0 mL da solução de K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, atingindo a umidade correspondente a cada tratamento. As soluções foram aplicadas utilizando-se pipetas automáticas. Depois de concluídos os tratamentos, os frascos foram fechados hermeticamente e retornaram para a BOD a 25 °C.

Durante 18 dias, com intervalos de 24 horas, amostras de ar foram coletadas do interior dos frascos, utilizando-se seringas plásticas. As amostras coletadas foram injetadas dentro de tubos de vidro (Labco Exetainer) com capacidade de 12 mL, apropriados ao amostrador automático do IRMS (Figura 1). Os Exetainers foram previamente lavados com Hélio 6.0 (99,9999 % de pureza) a uma pressão de 0,2 MPa, durante 65 segundos. A pressão de He dentro dos Exetainers impediu a entrada de N<sub>2</sub> atmosférico durante a introdução das agulhas, tanto das seringas quanto do amostrador, mas restringiu o volume de gás injetado para 4,0 mL de ar. Após a coleta das amostras, os frascos foram abertos por cinco minutos para a renovação da atmosfera interna (Figura 1).



Figura 1 – Frascos de incubação com tampa metálica e septo de borracha (a); solos incubados em BOD a 25 °C (b); introdução de amostras em Exetainer (c); frascos destampados para renovação do ar (d).

O IRMS possibilita a análise simultânea de  $N-N_2$  e  $N-N_2O$ , mas devido à elevada concentração de  $N_2$  em relação à de  $N_2O$ , optou-se pela determinação individual dos gases. Para a análise de  $N-N_2O$ , foram injetados nos Exetainers, 4,0 mL de ar do interior dos frascos de incubação e para a determinação de  $N_2$ , 0,2 mL. As amostras foram analisadas no mesmo dia da coleta, utilizando um IRMS (Hydra 20-20, SerCon Co., UK), interfaceado com um analisador automático de N e C (ANCA-GSL, SerCon Co., UK) acoplado a um amostrador automático (222 XL Liquid Handler, Gilson) (Figura 2). De acordo com o manual do equipamento, para uma massa de 10  $\mu g$  de N em sedimentos, a precisão da análise para abundância natural é de 1,23‰ (delta per mil  $^{15}N$ ), sendo essa massa adotada como o valor mínimo aceitável para a quantificação do  $N-N_2O$ .

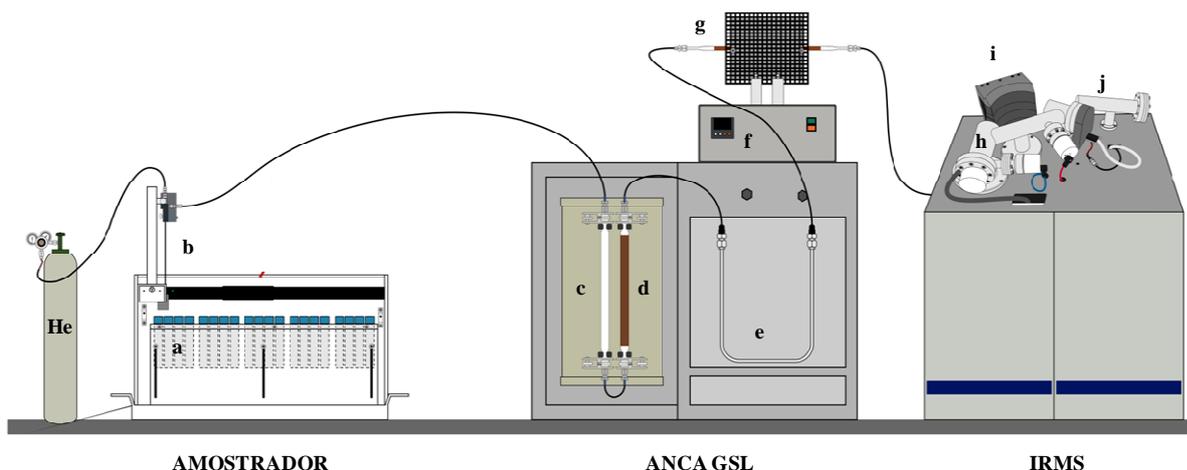


Figura 2 – Diagrama do IRMS: a) Exetainers; b) agulha de duplo orifício; c) coluna com  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ; d) coluna com Carbosorb; e) coluna cromatográfica; f) sistema de aquecimento; g) coluna de redução contendo cobre metálico) fonte de íons; i) campo magnético; j) coletores de íons.

Os gases contidos nos Exetainers foram carregados para o interior do ANCA-GSL, por meio de um fluxo de  $75 \text{ mL min}^{-1}$  de He 6.0, injetado pela agulha de duplo orifício do amostrador. No interior do ANCA-GSL, o gás passou por uma coluna contendo  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , para a remoção do vapor de água, e na sequência por uma coluna contendo Carbosorb, para a eliminação do  $\text{CO}_2$ . Uma coluna cromatográfica ( $500 \times 6,35 \times 4 \text{ mm}$ ), preenchida com Carbosieve G (fase estacionária) e aquecida a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , separou o  $\text{N}_2$  de possíveis contaminantes. Devido ao seu caráter apolar, o  $\text{N}_2$  fluiu primeiro, 80 s depois da injeção da amostra, e seguiu para o IRMS após atravessar uma coluna de redução (fios de  $\text{Cu}^0$  a  $650 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que removeu o  $\text{O}_2$  coeluído. A remoção do  $\text{O}_2$  preveniu a formação de NO na fonte de íons, pela reação entre  $\text{O}_2$  e  $\text{N}_2$  que poderia gerar um falso sinal massa:carga(m:z) 30 (STEVENS et al., 1993). O  $\text{N}_2\text{O}$  eluiu 80 s depois do  $\text{N}_2$ , atravessando o forno contendo  $\text{Cu}^0$ , reduzindo-se a  $\text{N}_2$  (Figura 2).

O IRMS Hydra 20-20 possui três coletores que integram as correntes de íons de m:z 28, 29 e 30. Dessa forma, tanto o N proveniente do  $\text{N}_2$ , quanto o N proveniente do  $\text{N}_2\text{O}$  foram analisados pela integração das correntes de íons de m:z 28, 29 e 30. O tempo de análise foi de 300 s por amostra.

As concentrações de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  foram calculadas usando, como padrão de referência, uma mistura gasosa ( $\text{N}_2 + \text{N}_2\text{O}$ ) de valor conhecido. O padrão de  $\text{N}_2$  utilizado foi o ar atmosférico (78% em volume de  $\text{N}_2$  e 0,3663% em átomos de  $^{15}\text{N}$ ), considerando a densidade do  $\text{N}_2$  igual a  $1,25 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . O padrão de  $\text{N}_2\text{O}$  foi extraído de um cilindro comercial com

pureza de 99,9% (0,3663% em átomos de  $^{15}\text{N}$ ) e densidade de  $1,80 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Os padrões de referência foram coletados utilizando-se seringas de insulina, sendo injetados, dentro dos Exetainers contendo He, volumes de  $100 \mu\text{L}$  de ar +  $100 \mu\text{L}$  de  $\text{N}_2\text{O}$ , correspondendo às quantidades de  $97,6 \mu\text{g}$  de N-ar e  $114,55 \mu\text{g}$  de N- $\text{N}_2\text{O}$ . A cada dez amostras, foram analisados dois padrões da mistura  $\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}$ , sendo um utilizado para o cálculo da massa de N e da abundância de  $^{15}\text{N}$  e o outro para simples conferência (amostra controle).

Para o cálculo das quantidades emitidas de N- $\text{N}_2$  ou N- $\text{N}_2\text{O}$  foi utilizada a seguinte equação:

$$Ne = \frac{Na \times Vlf}{Va \times Ms}$$

onde:

*Ne*: N emitido na forma de  $\text{N}_2$  ou  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ );

*Na*: massa de N na amostra (mg);

*Vlf*: volume livre do frasco (mL);

*Va*: volume injetado da amostra (mL);

*Ms*: massa de solo no frasco (kg).

Para calcular a emissão de N- $\text{N}_2$  ou N- $\text{N}_2\text{O}$  proveniente da fonte marcada com  $^{15}\text{N}$ , foi utilizada a equação:

$$Nepf = \frac{(\%^{15}\text{Na} - \%^{15}\text{Nar})}{(\%^{15}\text{Nf} - \%^{15}\text{Nar})} \times Ne$$

onde:

*Nepf*: N emitido na forma de  $\text{N}_2$  ou  $\text{N}_2\text{O}$  proveniente da fonte nítrica ( $\text{mg kg}^{-1}$ );

$\%^{15}\text{Na}$ : % de  $^{15}\text{N}$  na amostra de gás;

$\%^{15}\text{Nar}$ : % de  $^{15}\text{N}$  no ar atmosférico (0,3663%);

$\%^{15}\text{Nf}$ : % de  $^{15}\text{N}$  na fonte marcada (23,24%);

*Ne*: N emitido na forma de  $\text{N}_2$  ou  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

A emissão acumulada de N-N<sub>2</sub> ou N-N<sub>2</sub>O proveniente do K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> foi calculada somando-se as *Nepf* de cada tempo de amostragem.

Ao final do período de incubação, os solos, ainda dentro dos frascos, foram secos em estufa ventilada a 40 °C, sendo posteriormente removidos e acondicionados em sacos plásticos. Dentro dos sacos, os solos foram homogeneizados e subamostras foram retiradas e moídas em moinho de bola, pesadas em balança de alta precisão e acondicionadas em cápsulas de estanho para análise de N total e de abundância de <sup>15</sup>N, utilizando o IRMS configurado para análise de sólidos. Com os dados das emissões dos gases e dos teores de N remanescente do solo proveniente da fonte marcada, fez-se o balanço de <sup>15</sup>N.

Para verificar a recuperação do <sup>15</sup>N logo após a aplicação dos tratamentos, cinco amostras do solo NQ foram pré incubadas juntamente com as demais, sendo analisadas logo após terem recebido a fonte nítrica marcada (100 mg kg<sup>-1</sup> de N) e a umidade elevada a 40% da CMRA. Esta condição foi escolhida por ser o tratamento menos propício à desnitrificação.

Os dados foram testados quanto à normalidade e, quando não seguiram uma distribuição normal, foram transformados utilizando o método de transformação Box-Cox (SAS, versão 9.2). Após as transformações, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 2.3 - Resultados e Discussão

A abundância isotópica de <sup>15</sup>N das amostras, expressa em % em átomos de <sup>15</sup>N, variou de 14,14 a 23,24 para N<sub>2</sub>O, de 0,366 a 1,239 para N<sub>2</sub> e de 0,66 a 5,26 para N-solo. A marcação do KNO<sub>3</sub> com 23,24% em átomos de <sup>15</sup>N não provocou problemas nas detecções isotópicas e foi suficiente para rastrear o N proveniente da fonte nítrica. Amostras altamente enriquecidas costumam contaminar a sequência analítica, sendo necessária a análise de várias amostras em branco para promover a descontaminação do sistema. Por outro lado, substratos com baixo enriquecimento não geram N<sub>2</sub> com marcação isotópica suficiente para alterar a composição isotópica do ambiente confinado, em função da grande diluição sofrida com o N<sub>2</sub> atmosférico. Trabalhos que quantificaram as emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O utilizaram fontes nitrogenadas enriquecidas com 20 a 99% em átomos de <sup>15</sup>N, sendo o menor enriquecimento

para condições controladas ou para condições de campo que visaram apenas o N<sub>2</sub>O (MORLEY; BAGGS, 2010; BAILY et al., 2012; MORSE; BERNHARDT, 2013).

As emissões apresentaram alta variabilidade, com coeficientes de variação para N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O de 76 e 70% no NQ, 81 e 28% no LV-J e 56 e 79% no LV-P. Em experimento de campo, Jones et al. (2011) reportaram um coeficiente de variação de 139% para N<sub>2</sub>O. Em condições controladas, Mathieu et al. (2006) encontraram valores de 70 e 140% para N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, quando trabalharam com amostras indeformadas de solo. Os diversos fatores que influenciam as emissões atuam conjuntamente, tornando difícil, mesmo em laboratório, reproduzir as condições para um mesmo tratamento.

Em 1.620 medições de N<sub>2</sub>O, houve apenas 174 detecções da presença do gás, que em média apresentou uma abundância de 21,45% em átomos de <sup>15</sup>N. O pequeno volume de gás injetado para análise de N<sub>2</sub>O (4 mL), imposto pela pressão de He contido nos Exertainers, pode ter dificultado a quantificação da massa de N-N<sub>2</sub>O das amostras. Uma alternativa para melhorar a detecção de N<sub>2</sub>O é extrair dos frascos de incubação ou dos coletores instalados no campo, um volume maior de gás e concentrar o N<sub>2</sub>O em linha de alto vácuo, antes de transferi-lo para o Exetainer. Considerando os três solos, verificou-se que 84% do N emitido na forma de N<sub>2</sub>O foram provenientes do K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, sendo o restante derivado do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pré-existente no solo ou da oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, em uma possível nitrificação.

### **2.3.1 - Emissão acumulada de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O proveniente da fonte nítrica**

Os solos apresentaram comportamento semelhante em relação às emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, mesmo possuindo atributos físicos e químicos distintos. Nos tratamentos sem a adição de dextrose (D<sup>-</sup>) não foram observadas emissões de N<sub>2</sub>O e as emissões acumuladas de N<sub>2</sub> não diferiram com o aumento da umidade, exceto no LV-P a 80% da CMRA (Figura 3).

Todos os tratamentos que receberam a dextrose (D<sup>+</sup>) emitiram N<sub>2</sub>O, sendo as emissões aumentadas com a elevação da umidade de 40 para 60% da CMRA. Não foram observadas diferenças nas emissões de N<sub>2</sub>O entre 60 e 80% da CMRA. O mesmo comportamento foi observado para o acúmulo de N<sub>2</sub> nos tratamentos D<sup>+</sup>, exceto no LV-P que a 60% da CMRA emitiu menos que a 80% (Figura 3c).

A maior emissão de  $N_2$  observada nos tratamentos  $D^-$  ocorreu no LV-P com 80% da CMRA, sendo de  $29,94 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2$ , medida no 9º dia de incubação (Figura 4c).

Nos tratamentos  $D^+$ , as maiores emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  foram determinadas no LV-J, sendo de  $11,54 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2$  a 80% da CMRA e  $8,91 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2O$  a 60% da CMRA (Figura 4f e 4h). No NQ, as máximas ocorreram no tratamento  $D^+$  a 60% da CMRA, sendo de  $1,18 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2$  e  $4,16 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2O$  (Figura 4e e 4h). No LV-P, as emissões máximas ocorreram no tratamento  $D^+$  a 80% da CMRA e foram mensuradas no 6º e no 5º dia de incubação ( $4,46 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2$  e  $3,55 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $N-N_2O$ ) (Figura 4f e 4i).

As emissões de  $N_2$  ocorreram ao longo de todo período de incubação, ao passo que as emissões de  $N_2O$  se concentraram do 2º ao 8º dia após a aplicação dos tratamentos, com a última emissão detectada no 12º dia, no NQ a 40% da CMRA (Figura 4d). As emissões máximas de  $N_2$  ocorreram 24 h após as máximas de  $N_2O$ , em todos os solos e tratamentos.

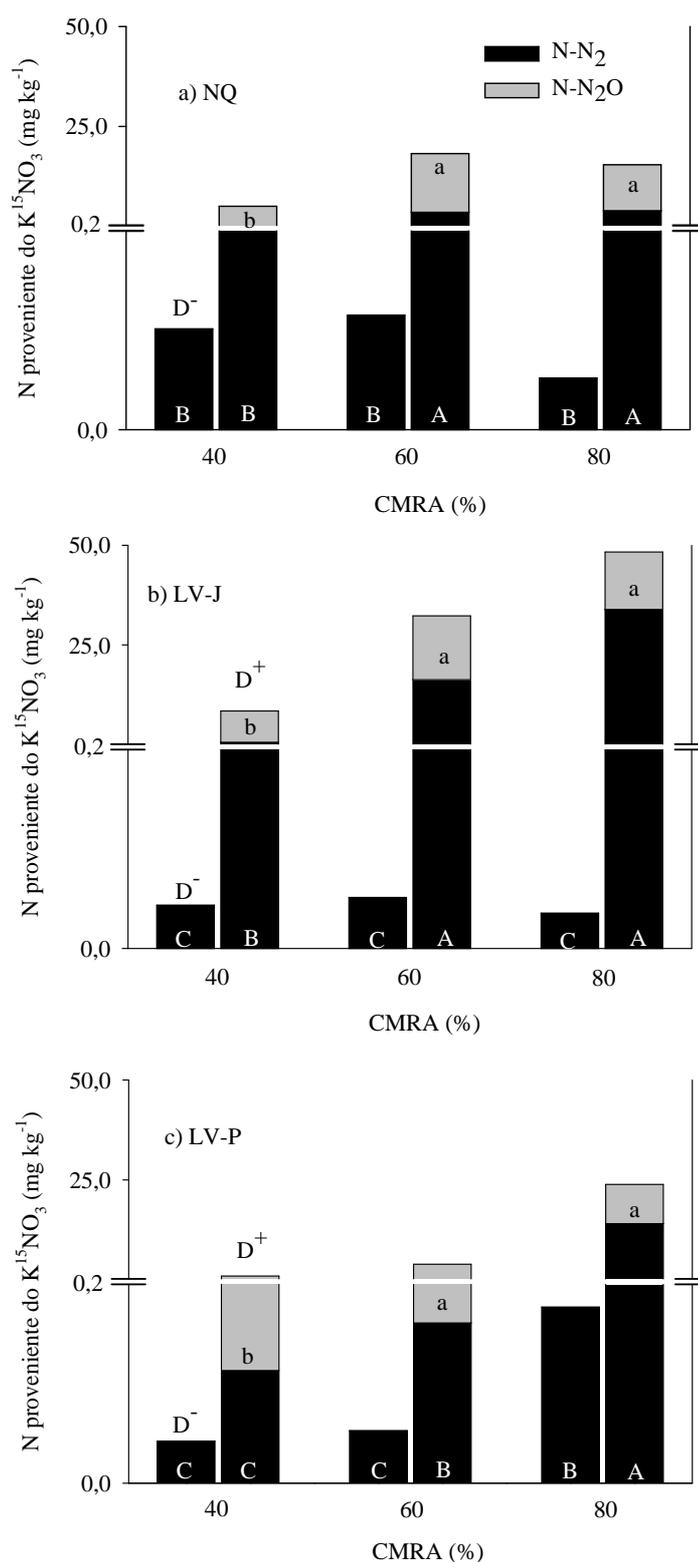


Figura 3 - Média das emissões acumuladas de N-gás provenientes do  $K^{15}NO_3$ , nas formas de  $N_2$  e  $N_2O$ . Para cada forma de N, diferentes letras maiúsculas para  $N_2$  e minúsculas para  $N_2O$ , dentro de cada solo, indicam diferenças entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). a) NQ: Neossolo Quartzarênico; b) LV-J: Latossolo Vermelho de Jaú; c) Latossolo Vermelho de Piracicaba; CMRA: capacidade máxima de retenção de água;  $D^-$ : sem adição de dextrose – 1ª barra de cada CMRA;  $D^+$ : com adição de dextrose – 2ª barra de cada CMRA.

Os valores dos fluxos acumulados foram semelhantes aos encontrados em pesquisas realizadas sob condições controladas, onde as emissões são expressas em massa de N por massa de solo. Emissões na faixa de 12 a 70 mg kg<sup>-1</sup> de N-N<sub>2</sub>O foram mensurados em solos do Canadá incubados com 100 e 500 mg kg<sup>-1</sup> de N e C, respectivamente, por 75 h à capacidade de campo (DRURY; McKENNEY; FINDLAY, 1991). Como os autores utilizaram o método da inibição por C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, é possível que o C da molécula tenha sido consumido como substrato e estimulado ainda mais a desnitrificação.

Utilizando um cromatógrafo gasoso com detector de captura eletrônica, Khalil et al. (2002) mediram as emissões de N<sub>2</sub>O em solo incubado por 25 dias com 60% do espaço poroso preenchido com água (EPPA), encontrando valores acumulados de 9,3 e 8,9 mg kg<sup>-1</sup> de N para os tratamentos com ureia e nitrato de potássio, na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> de N. O N<sub>2</sub>O foi detectado até o 25º dia de incubação, com as maiores emissões ocorrendo no 15º dia (699 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de N-N<sub>2</sub>O).

Como método do traçador <sup>15</sup>N, Liu et al. (2007) investigaram as emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O em solos sob plantio direto (PD) e convencional (PC), tratados com <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (100 mg kg<sup>-1</sup> de N) em duas condições de umidade (60 e 75% do EPPA). Após 14 dias de incubação, as emissões acumuladas de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes da fonte nítrica variaram de 0,52 e 0,88 mg kg<sup>-1</sup> de N (N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O) nos solos sob PC com 60% do EPPA a 9,48 e 6,62 mg kg<sup>-1</sup> de N (N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O) nos solos sob PD com 75% do EPPA.

Em experimentos de campo, os fluxos são expressos em massa de N por área, por tempo. As emissões máximas, seja em experimentos realizados em laboratório ou campo, ocorrem geralmente nas duas primeiras semanas após a aplicação do fertilizante ou logo após os eventos de precipitação (MORLEY; BAGGS, 2010; BAILY et al., 2012; SIGNOR; CERRI; CONANT, 2013).

### **2.3.2 - Perdas relativas de N nas formas de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O e fração molar de N<sub>2</sub>O**

Durante o período de incubação, as perdas relativas de N (N<sub>2</sub> + N<sub>2</sub>O) variaram de 0,04 a 48,26% (Tabela 2). As emissões de N<sub>2</sub>O foram maiores que as de N<sub>2</sub> na maioria dos tratamentos D<sup>+</sup> (exceto para LV-J a 80% da CMRA). De fato, quando se tem um excesso de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a relação N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub> aumenta devido à preferência dos microrganismos em utilizar o NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

como receptor de elétrons, ao invés do  $N_2O$  (CHARPUIS-LARDY et al., 2007; MORSE; BERNHARDT, 2013).

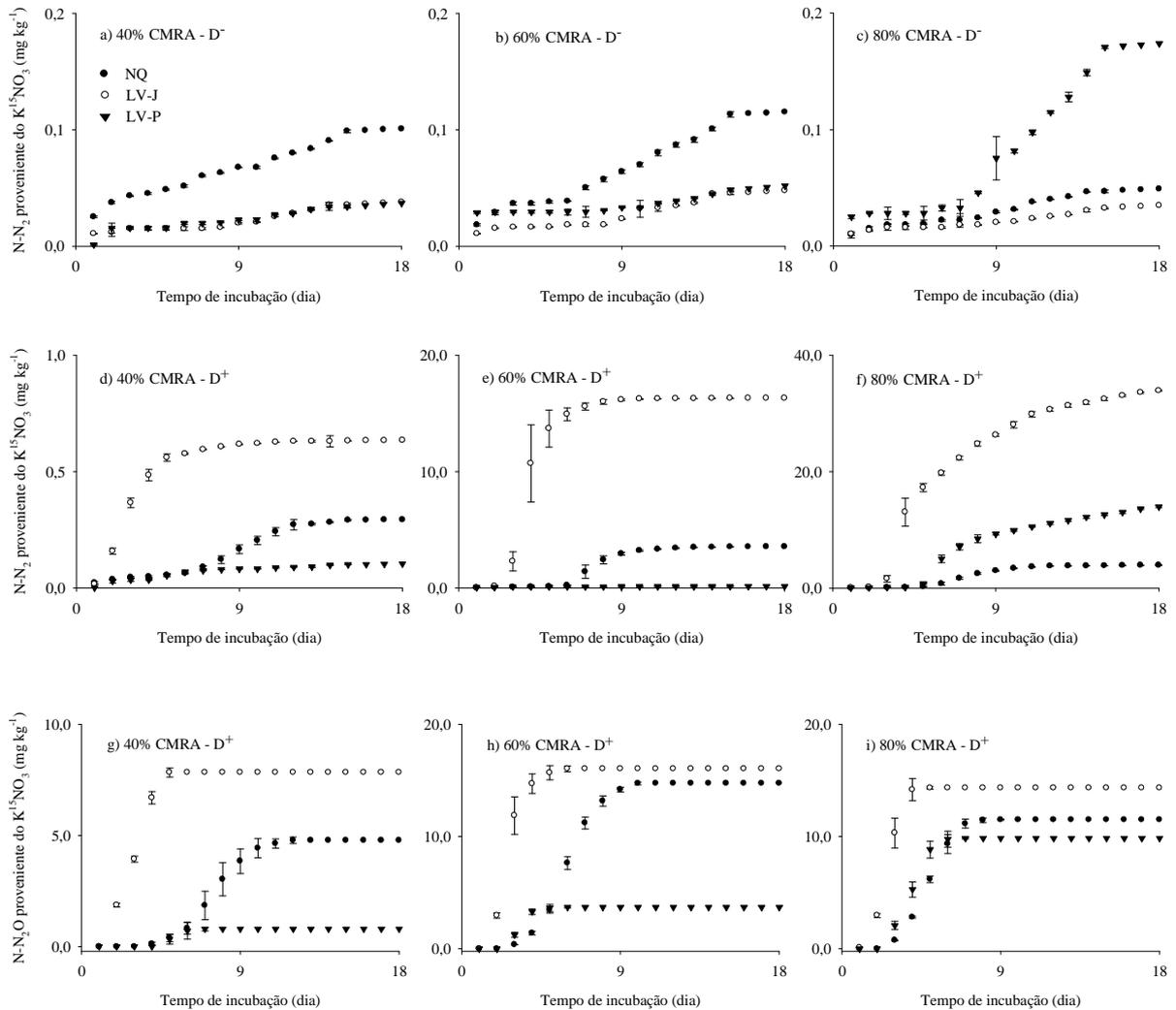


Figura 4 - Emissões acumuladas de  $N-N_2$  (a, b e c, sem dextrose (D<sup>-</sup>) e d, e e f, com dextrose (D<sup>+</sup>)) e  $N-N_2O$  (g, h e i, com dextrose (D<sup>+</sup>)), derivados do  $K^{15}NO_3$  aplicado aos solos (NQ: Neossolo Quartzarênico; LV-J: Latossolo Vermelho de Jaú e LV-P: Latossolo Vermelho de Piracicaba). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 5).

As perdas de  $N_2O$  derivado da fonte nítrica (fator de emissão do  $N_2O$  - FE) variaram de 0,79 a 16,03%. Na maioria dos tratamentos D<sup>+</sup> foram detectados valores acima de 1%, que é o valor sugerido pelo IPCC (2006) para estimar as emissões de  $N_2O$  provenientes da aplicação de fertilizantes nitrogenados (Tabela 2). Embora na literatura haja medidas de campo com FE superiores a 20% para solos cultivados com cana-de-açúcar (DENMEAD et al., 2010), no Brasil, trabalhos recentes mostraram FE variando de 0,31 a 12,95%

(CARMO et al., 2013; SIGNOR; CERRI; CONANT, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). No caso específico do trabalho de Denmead et al. (2010), os autores quantificaram o  $N_2O$  em uma condição muito propícia a desnitrificação, pois além de uma adubação com doses elevadas de N ( $160 \text{ kg ha}^{-1}$ ), o solo apresentava um lençol freático muito raso que propiciava às condições de anaerobiose. O FE de 12,95% relatado por Signor, Cerri e Conant (2013) foi obtido quando a dose de N foi de  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  na forma de nitrato de amônio, dosagem essa pouco comum para os cultivos de cana-de-açúcar no Brasil. O elevado fator de emissão encontrado em alguns tratamentos do presente trabalho se deve a manutenção, em todo período de incubação, de condições favoráveis à desnitrificação, como a umidade elevada, a temperatura constante ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e a alta disponibilidade de nitrato e carbono.

Tabela 2 - Perdas relativas de N proveniente da fonte nítrica ( $K^{15}NO_3$ ) na forma de  $N_2$  e  $N_2O$  e fração molar do  $N_2O$

Solo	CMRA	Dextrose	N- $N_2$	N- $N_2O$	Fração Molar do $N_2O$
	%		--- - - - % - - - - -		
NQ	40	SEM	$0,10 \pm 0,002$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
NQ	60	SEM	$0,12 \pm 0,018$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
NQ	80	SEM	$0,05 \pm 0,006$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
NQ	40	COM	$0,30 \pm 0,107$	$4,78 \pm 3,134$	$0,38 \pm 0,234$
NQ	60	COM	$3,54 \pm 1,055$	$14,73 \pm 2,087$	$0,82 \pm 0,041$
NQ	80	COM	$3,93 \pm 0,362$	$11,49 \pm 1,267$	$0,74 \pm 0,028$
LV-J	40	SEM	$0,04 \pm 0,003$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
LV-J	60	SEM	$0,05 \pm 0,006$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
LV-J	80	SEM	$0,04 \pm 0,004$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
LV-J	40	COM	$0,64 \pm 0,070$	$7,83 \pm 0,490$	$0,92 \pm 0,008$
LV-J	60	COM	$16,30 \pm 6,532$	$16,03 \pm 1,105$	$0,58 \pm 0,122$
LV-J	80	COM	$33,93 \pm 3,854$	$14,33 \pm 1,574$	$0,30 \pm 0,022$
LV-P	40	SEM	$0,04 \pm 0,006$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
LV-P	60	SEM	$0,06 \pm 0,002$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
LV-P	80	SEM	$0,18 \pm 0,021$	$0,00 \pm 0,000$	$0,00 \pm 0,000$
LV-P	40	COM	$0,12 \pm 0,028$	$0,79 \pm 0,650$	$0,35 \pm 0,217$
LV-P	60	COM	$0,16 \pm 0,014$	$3,72 \pm 0,524$	$0,96 \pm 0,004$
LV-P	80	COM	$14,00 \pm 1,494$	$9,85 \pm 1,901$	$0,40 \pm 0,041$

Com base na literatura, esperava-se que o aumento da condição de anaerobiose, provocado pelo aumento da umidade dos solos, estimulasse os microrganismos desnitrificadores, aumentando as emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  e diminuindo a fração molar do  $N_2O$ , devido à desnitrificação completa (DAVIDSON; SEITZINGER, 2006; MATHIEU et al., 2006; LIU et al., 2007). De fato foi observado que a fração molar diminuiu com o aumento da umidade no LV-J e, nos outros solos, quando a umidade foi aumentada de 60 para 80% da CMRA (Tabela 2).

### 2.3.3 - Balanço de $^{15}N$

A recuperação média do  $^{15}N$  remanescente no NQ com 40% da CMRA, realizada logo após a aplicação da fonte nítrica marcada, foi de  $95 \pm 5,9\%$  ( $n = 5$ ). Os 5% não quantificados podem ser considerados um erro analítico ou metodológico. No cálculo do balanço, foi aplicado um fator de correção, multiplicando-se o teor de N derivado da fonte nítrica encontrado no solo, por 1,053.

Esperava-se que neste experimento de incubação, realizado em frascos de vidro hermeticamente fechados, o balanço de  $^{15}N$  aproximasse dos 100%, mas isto não foi verificado em nenhum tratamento (Figura 5). Morse e Bernhardt (2013), trabalhando com amostras de solo incubadas com fontes marcadas, mediram o  $N-^{15}NH_4^+$  e  $N-^{15}NO_3^-$  dos solos e as emissões de  $^{15}N_2$  e  $^{15}N_2O$ , encontrando valores para  $^{15}N$  não recuperado de até 79%, não discutindo as possíveis causas dessa perda do  $^{15}N$ .

A desnitrificação, considerada neste estudo como sendo a soma do N-ar + N não recuperado, ocorreu em todos os tratamentos, embora as emissões de  $N_2O$  não tenham sido detectadas nos tratamentos que não receberam a fonte de C lábil (Figura 5). Nos tratamentos  $D^-$ , as quantidades não recuperadas de  $^{15}N$  dentro de cada solo, foram semelhantes, exceto no solo LV-P a 80% da CMRA. Nos tratamentos  $D^+$  do LV-J, o aumento da umidade incrementou, de forma aparentemente linear, a desnitrificação (Figura 5b). No LV-P, a umidade de 80% da CMRA estimulou, de maneira mais acentuada, o processo de desnitrificação, inclusive no tratamento  $D^-$  (Figura 5c).

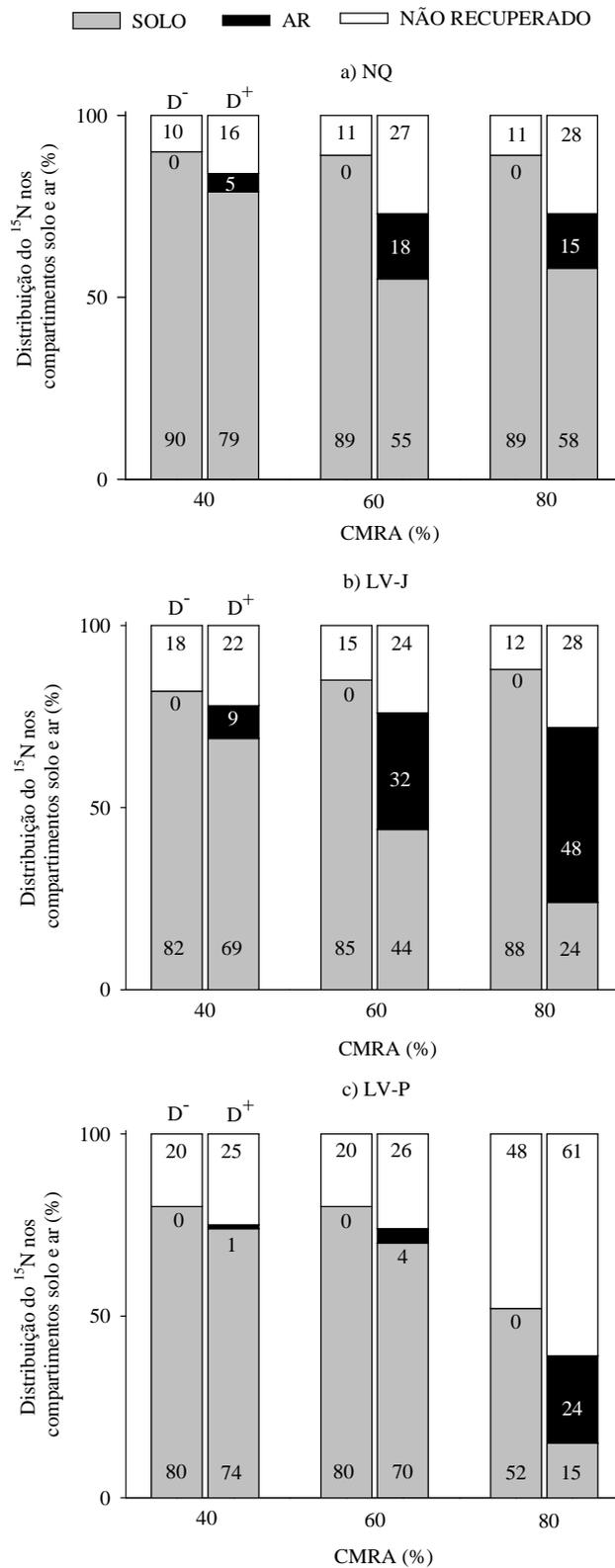


Figura 5 – Recuperação de N nos compartimentos solo (N-total) e ar ( $N-N_2 + N-N_2O$ ). a) NQ: Neossolo Quartzarênico; b) LV-J: Latossolo Vermelho de Jaú; c) LV-P: Latossolo Vermelho de Piracicaba; CRMA: capacidade máxima de retenção de água; D<sup>-</sup>: sem adição de dextrose – 1ª barra de cada CMRA; D<sup>+</sup>: com adição de dextrose – 2ª barra de cada CMRA.

A não recuperação total do  $^{15}\text{N}$  indicou que grande quantidade dos gases gerados pela desnitrificação pode ter ficado aprisionada no espaço poroso dos solos, sendo perdida durante os procedimentos de secagem e destorroamento das amostras, ao término do experimento (Figura 5). Durante a secagem, a difusão dos gases para a superfície do solo foi facilitada pela diminuição do conteúdo de água. O destorroamento liberou os gases contidos nos poros que não se comunicavam com a superfície do solo. Clough et al. (2001) verificaram emissões significativas de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  após o destorroamento de um solo úmido colocado no interior de uma *gloverbox*. Os autores relataram que havia mais  $\text{N}_2$  retido nos espaços porosos do solo que o  $\text{N}_2\text{O}$ , provocando a diminuição da razão  $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$  de 0,51 para 0,41 após o destorroamento. Se essa tendência fosse verificada neste trabalho, haveria uma diminuição mais acentuada das frações molares de  $\text{N}_2\text{O}$  com o aumento da umidade, confirmando que o aumento da umidade, quando o  $\text{NO}_3^-$  e o C não são limitantes, propicia a desnitrificação completa.

As quantidades não recuperadas de  $^{15}\text{N}$  foram menores no solo NQ, possivelmente pela menor retenção dos gases em função da maior quantidade de macroporos. Em todos os solos, nos tratamentos  $\text{D}^+$ , as quantidades não recuperadas de  $^{15}\text{N}$  foram maiores, fortalecendo a ideia do aprisionamento dos gases e posterior perda dos mesmos durante a secagem e destorroamento. Embora a desnitrificação tenha sido maior no solo argiloso (LV-P) a 80% da CMRA, a maior emissão durante o período de incubação ocorreu no solo de textura média (LV-J), possivelmente pela maior facilidade de difusão dos gases. Esse aprisionamento dos gases no solo, em condições de campo, é benéfico, uma vez que as chances do  $\text{N}_2\text{O}$  ser reduzido a  $\text{N}_2$  aumentam, mitigando as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$ .

Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos relatados na literatura, mesmo quando outro método de quantificação foi utilizado, indicando o potencial do método do traçador  $^{15}\text{N}$  na quantificação das perdas de N do fertilizante nas formas de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ . A influência da umidade do solo e da disponibilidade de C lábil no processo de desnitrificação foi novamente comprovada, alertando que práticas agrícolas que elevem a disponibilidade de C e que mantenham a umidade do solo mais alta podem intensificar as atividades microbianas e conseqüentemente, aumentar os riscos de perda de N por meio das emissões de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ .

## 2.4 - Conclusões

1. As emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes da fonte nítrica marcada com <sup>15</sup>N foram intensificadas com a adição de uma fonte lábil de carbono e com o aumento da umidade do solo.
2. Grande parte dos gases gerados na desnitrificação ficou aprisionada no espaço poroso dos solos, principalmente no mais argiloso, sendo liberada com a diminuição da umidade e com o revolvimento dos mesmos.
3. Os procedimentos analíticos adotados no uso do método do traçador <sup>15</sup>N foram eficientes para a quantificação dos gases N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes da fonte nítrica.

## Referências

BAILY, A.; WATSON, C. J.; LAUGHLIN, R.; MATTHEWS, D.; MC GEOUGH, K.; JORDAN, P. Use of the <sup>15</sup>N gas flux method to measure the source and level of N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions from grazed grassland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 94, n.2-3, p. 287-298. 2012.

BREMNER, J. M. Sources of nitrous oxide in soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 49, p 7-16, 1997.

BUTTERBACH-BAHL, K.; BAGGS, E. M.; DANNENMANN, M.; KIESE, R.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 368, 20130122, 2013.<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>.

BUTTERBACH-BAHL, K.; WILLIBALD, G.; PAPEN, H. Soil core method for direct simultaneous determination of N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from forest soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 240, p. 105-116, 2002.

CARMO, J. B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L. C.; SOUZA NETO, E. R.; PITOMBO, L. M.; 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 Brasil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **Global Change Biology Bioenergy**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 267-280, 2013.

CHARPUIS-LARDY, L.; WRAGE, N.; METAY, A.; CHOTTE, J.; BERNOUX, M. Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. **Global Change Biology**, Oxford, v. 13, p. 1-17, 2007.

CLOUGH, T. J.; SHERLOCK, R. R.; CAMERON, K. C.; STEVENS, R. J.; LAUGHLIN, R. J.; MÜLLER, C. Resolution of the  $^{15}\text{N}$  balance enigma? **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 39, p. 1419-1431, 2001.

CRUTZEN, P. J. SST's – A threat to the earth's ozone shield. **Ambio**, Stockholm, v. 1, p. 41-51, 1972.

DANNENMANN, M.; BUTTERBACH-BAHL, K.; GASCHÉ, R.; WILLIBALD, G.; PAPAN, H. Dinitrogen emissions and the  $\text{N}_2:\text{N}_2\text{O}$  emission ratio of a Rendzic Leptosol as influenced by pH and forest thinning. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2317-2323, 2008.

DAVID, R. L. (Ed.). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 85. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

DAVIDSON E. A.; SEITZINGER, S. The enigma of progress in denitrification research. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 16, n. 6, p. 2057-2063, 2006.

DENMEAD, O. T.; MACDONALD, B. C. T.; BRYANT, G.; NAYLOR, T.; WILSON, S.; GRIFFITH, D. W. T.; WANG, W. J.; SALTER, B.; WHITE, I.; MOODY, P. W. Emissions of methane and nitrous oxide from Australian sugarcane soils. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 150, p. 748-756, 2010.

DRURY, C. F.; MCKENNEY, D. J.; FINDLAY, W. I. Relationships between denitrification microbial biomass and indigenous soil properties. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 751-755, 1991.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPS, 1997. 212 p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

FENILLI, T. A. B.; REICHARDT, K.; FAVARIN, J. L.; BACCHI, O. O. S.; SILVA, A. L.; TIMM, L. C. Fertilizer  $^{15}\text{N}$  balance in a coffee cropping system: a case study in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1459-1469, 2008.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICH, R.; SILVA, M. A. Balanço do nitrogênio da uréia ( $^{15}\text{N}$ ) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n.3, p. 477-486, 2006.

GROFFMAN, P. M.; ALTABET, M. A.; BOHLKE, J. K.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DAVID, M. B.; FIRESTONE, M. K.; GIBLIN, A. E.; KANA, T. M.; NIELSEN, L.P.; VOYTEK, M.A. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 16, n. 6, p. 2091-2122, 2006.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Guidelines for national greenhouse gas inventories: Agriculture, Forestry and Other Land Use**. Hayama: National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006. v. 4. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>>. Acesso em: 10 out 2013.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2007: The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

JONES, S. K.; FAMULARI, D.; DI MARCO, C. F.; NEMITZ, E.; SKIBA, U. M.; REES, R. M.; SUTTON, M. A. Nitrous oxide emissions from managed grassland: a comparison of eddy covariance and static chamber measurements. **Atmospheric Measurement Techniques Discussion**, Göttingen, v. 4, p. 1079-1112, 2011.

JORDAN, T. E.; WELLER, D. E.; CORRELL, D. L. Denitrification in surface soils of riparian forest: Effects of water, nitrate and sucrose. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 833-843, 1998.

KHALIL, M. I.; ROSENANI, A. B.; VAN CLEEMPUT, O.; BOECKX, P.; SHAMSHUDDIN, J.; FAUZIAH, C. I. Nitrous oxide production from an ultisol of the humid tropics treated with different nitrogen sources and moisture regimes. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 16, p. 59-65, 2002.

KLEMEDTSSON, L.; SVENSSON, B. H.; ROSSWALL, T. A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as source of nitrous oxide in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, p. 112-119, 1988.

KOOL, D. M.; DOLFING, J.; WRAGE, N.; VAN GROENIGEN, J. W. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 174-178, 2011.

LEWICKA-SZCZEBAK, D.; WELL, R.; GIESEMANN, A.; ROHE, L.; WOLF, U. An enhanced technique for automated determination of  $^{15}\text{N}$  signatures of  $\text{N}_2$ ,  $(\text{N}_2+\text{N}_2\text{O})$  and  $\text{N}_2\text{O}$  in gas samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 27, p. 1548-1558, 2013.

LIU, X. J.; MOSIER, A. R.; HALVORSON, A. D.; REULE, C. A.; ZHANG, F. S. Dinitrogen and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in arable soil: Effect of tillage, N source and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2362-2370, 2007.

MATHIEU, O.; LÉVÊQUE, J.; HÉNAULT, C.; MILLOX, M. J.; BIZOUARD, F.; ANDREUX, F. Emission and spatial variability of  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with  $^{15}\text{N}$  isotopic techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 941-951, 2006.

MORLEY, N.; BAGGS, E. M. Carbon and oxygen controls on  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  production during nitrate reduction. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1864-1871, 2010.

MORSE, J. L.; BERNHARDT, E. S. Using  $^{15}\text{N}$  tracers to estimate  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emissions from nitrification and denitrification in coastal plain wetlands under contrasting land-uses. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 57, p. 635-643, 2013.

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.

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

SANT'ANA FILHO, C. R.; BENDASSOLLI, J. A.; ROSSETE, A. L. R. M.; PIEDADE, S. M. S.; PRESTES, C. V. Production of  $^{15}\text{N}$ -enriched nitric acid ( $\text{H}^{15}\text{NO}_3$ ). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.25, n. 4, p.743-749, 2008.

SCHEER, C.; WASSMANN, R.; BUTTERBACH-BAHL, K.; LAMERS, J. P. A.; MARTIUS, C. The relationship between  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ , and  $\text{N}_2$  fluxes from fertilized and irrigated dry land soils of the Aral Sea Basin, Uzbekistan. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 314, p. 273-283, 2009.

SPEIR, T. W.; KETTLES, H. A.; MORE, R. D. Aerobic emissions of  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  from soil cores: measurement procedures using  $^{13}\text{N}$  labeled  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ . **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1289-1298, 1995.

SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P.; CONANT, R.  $\text{N}_2\text{O}$  emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

SIMARMATA, T.; BENKISER, G.; OTTOW, J. C. G. Effect of na increasing carbon nitrate-N ratio on the reliability of acetylene in blocking the  $\text{N}_2\text{O}$ -reductase activity of denitrifying bacteria in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 15, p. 107-112, 1993.

STEVENS, R. J.; LAUGHLIN, R. J.; ATKINS, G. J.; PROSSER, S. J. Automated determination of nitrogen-15-labeled dinitrogen and nitrous oxide by mass spectrometry. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 57, p. 981-988, 1993.

TIEDJE, J. M.; SIMKINS, S.; GROFFMAN, P. M. Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 115, p. 261-284, 1989.

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.

YANG, W.H.; SILVER, W.L. Application of the  $\text{N}_2/\text{Ar}$  technique to measuring soil-atmosphere  $\text{N}_2$  fluxes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v.26, p. 449-459, 2012.

### 3 - UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DO TRAÇADOR $^{15}\text{N}$ PARA AVALIAR AS EMISSÕES DE $\text{N}_2$ E $\text{N}_2\text{O}$ PROVENIENTES DA FERTILIZAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES FONTES DE N

#### Resumo

O método do traçador  $^{15}\text{N}$  é indicado para análise simultânea de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  derivados do fertilizante marcado, mas, apesar da indicação, este método ainda não foi utilizado no Brasil em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi quantificar as emissões de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  por meio do método do traçador  $^{15}\text{N}$ , a partir da aplicação dos fertilizantes marcados, ureia e nitrato de amônio, na cultura da cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. Foram testadas duas fontes de N (ureia e nitrato de amônio, ambas marcadas com 31,9% em átomos de  $^{15}\text{N}$ ), duas doses de N (55 e 110  $\text{kg ha}^{-1}$ ), com e sem a adição de vinhaça (100  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ ), em esquema fatorial  $2^3$ . Durante 10 dias consecutivos, amostras de gás foram retiradas de coletores instalados na linha de adubação e analisadas em espectrômetro de massas de razão isotópica, após concentração do  $\text{N}_2\text{O}$  em linha de alto vácuo. Não foram observadas emissões nos tratamentos com ureia, e nos tratamentos com nitrato de amônio, somente o  $\text{N}_2\text{O}$  foi detectado. A vinhaça potencializou as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$ , mas mesmo assim, os fatores de emissão dos tratamentos foram baixos, sendo de 0,17 e 0,35% para as doses de 55 e 110  $\text{kg ha}^{-1}$  de N. Ao longo dos 10 dias, a perda diária máxima de N- $\text{N}_2\text{O}$  proveniente do nitrato de amônio foi de 79,9  $\text{g ha}^{-1}$ , ocorrida no 5º dia após a aplicação do fertilizante e coincidindo com a maior precipitação do período.

**Palavras-chave:** IRMS. Fator de emissão. Ureia. Nitrato de amônio. Vinhaça.

## Abstract

The  $^{15}\text{N}$  tracer method is suitable for simultaneous analysis of  $\text{N}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$  from labile fertilizer, but in spite of this, it has not been used in Brazil on field conditions. The aim of this study was to quantify the  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emissions from the application of label fertilizers, urea and ammonium nitrate, using the  $^{15}\text{N}$  tracer method, in sugarcane crop harvested without straw burning. The treatments were assigned in full factorial combination: two N sources (urea and ammonium nitrate, both labeled with 31.9 atom%  $^{15}\text{N}$ ); two N levels (55 and 110  $\text{kg ha}^{-1}$ ) were tested with and without the addition of vinasse (100  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ ). During 10 consecutive days, gas samples were taken from collectors installed in fertilization row and analyzed in isotope ratio mass spectrometer, after  $\text{N}_2\text{O}$  concentration in high-vacuum line. No emissions were observed in treatments with urea addition. In treatments with ammonium nitrate, only  $\text{N}_2\text{O}$  was detected. The vinasse addition potentiated  $\text{N}_2\text{O}$  emissions, but even so the emission factors of the treatments were low, 0.17 and 0.35% for 55 and 110  $\text{kg N ha}^{-1}$ , respectively. During the 10 days, the maximum daily loss of  $\text{N}_2\text{O-N}$  from the ammonium nitrate was 79.9  $\text{g ha}^{-1}$ , which occurred on the 5<sup>th</sup> day after fertilizer application and coincided with the highest rainfall period.

**Keywords:** IRMS. Emission factor. Urea. Ammonium nitrate. Vinasse.

### 3.1 - Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo produzido na safra 2013/2014, aproximadamente 659 milhões de toneladas de cana moída, em uma área de 8,8 milhões de hectares (CONAB, 2014). Mais da metade da produção (54,8%) foi destinada a fabricação do etanol que vem alavancando a produção de cana-de-açúcar desde a última década. Os produtos da cana-de-açúcar foram responsáveis por 17,5% da produção de energia primária no Brasil em 2012, contribuindo para a construção de uma das matrizes energéticas mais limpas do planeta, onde 46% das fontes são renováveis (BRASIL, 2013).

O consumo estimado de N-fertilizante no país em 2010/2011 foi de 2,86 milhões de toneladas, dos quais 22% foram utilizados na cultura da cana-de-açúcar (HEFFER, 2013). Para essa cultura, tem sido recomendada uma dose de N variando de 40 a 80 kg ha<sup>-1</sup>, para a cana planta e 100 a 150 kg ha<sup>-1</sup>, para a cana soca. A cultura demanda uma grande quantidade de fertilizantes nitrogenados, considerando que 80% das áreas de cana-de-açúcar no Brasil são ocupadas com cana soca.

Trabalhos que utilizaram o método do traçador <sup>15</sup>N para avaliar a recuperação do N-fertilizante na cana-de-açúcar têm mostrado que a cultura absorve menos de 50% do N disponibilizado pelo adubo (VITTI et al., 2007; FRANCO et al., 2008; VITTI et al., 2011). No balanço de <sup>15</sup>N no sistema solo-planta, quando não se consegue recuperar todo o <sup>15</sup>N aplicado, mesmo analisando o solo em profundidade e a amônia volatilizada, atribui-se essa perda à emissão dos gases N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub> (TRIVELIN et al., 2002; FRANCO et al., 2008).

A preocupação ambiental com a emissão de gases do efeito estufa na cadeia produtiva da cana-de-açúcar tem estimulado a realização de pesquisas que visam quantificar as emissões de N<sub>2</sub>O, mas que não geram, entretanto, nenhum dado a respeito das emissões de N<sub>2</sub> (CARMO et al., 2013; SIGNOR; CERRI; CONANT, 2013; VARGAS et al., 2014). Se o enfoque da pesquisa for a perda de N no sistema solo-planta, a quantificação do N<sub>2</sub> passa a ser fundamental, uma vez que a emissão desse gás pode superar a emissão de N<sub>2</sub>O, como observado nos trabalhos de Baily et al. (2012) e Morse e Bernhardt (2013).

Dois processos biológicos se destacam na geração de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O: a nitrificação para N<sub>2</sub>O e a desnitrificação para N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub> (KOLL et al., 2011). Fatores climáticos, população de microrganismos, práticas de manejo e características do solo influenciam a produção dos gases, sendo bastante variável a razão N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub>. Devido à heterogeneidade do solo, a

nitrificação e a desnitrificação podem ocorrer simultaneamente e o predomínio de um processo sobre o outro está intimamente ligado à disponibilidade de  $O_2$ . A desnitrificação é realizada, principalmente, por bactérias anaeróbias facultativas que, na ausência de  $O_2$  utilizam os óxidos de nitrogênio como receptores finais de elétrons, reduzindo o  $NO_3^-$  a  $N_2O$ , podendo chegar a  $N_2$  (CANTARELLA, 2007; HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008). A produção de  $N_2O$  durante a nitrificação ocorre em uma condição de baixa pressão de  $O_2$ , fazendo com que os microrganismos aeróbios reduzam o  $NO_2^-$  a  $N_2O$  (KHALIL; MARY; RENAULT, 2004). A relação  $N_2O:N_2$  tende a aumentar em solos com alto teor de  $NO_3^-$ , pois o ganho energético na redução do  $NO_3^-$  a  $N_2O$  é maior que do  $N_2O$  a  $N_2$  (CHARPUS-LARDY et al., 2007).

O carbono é fonte de energia para os microrganismos e estimula o crescimento da microbiota do solo, aumentando as taxas de respiração e, conseqüentemente, diminuindo a oxigenação do meio (BAGGS et al., 2001). Com a diminuição da disponibilidade de  $O_2$ , haverá um aumento na emissão de  $N_2O$ , tanto pela nitrificação, quanto pela desnitrificação. Quando a umidade e a disponibilidade de  $NO_3^-$  não são limitantes, há maiores fluxos de  $N_2O$  em solos com maior quantidade de carbono orgânico disponível (RUSER et al., 2006). Em solos com condições propícias à desnitrificação, a disponibilidade de carbono orgânico intensifica as emissões de N, principalmente na forma de  $N_2$  (MATHIEU et al., 2006). Assim sendo, a presença de carbono orgânico disponível aumenta as emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  e diminui a razão  $N_2O:N_2$ .

A adoção da colheita mecanizada da cana-de-açúcar vem aumentando a cada ano no Brasil. A manutenção dos restos culturais da safra anterior aumenta a disponibilidade de C e ajuda a manter a umidade do solo durante a safra. Outra prática comum no país é o aproveitamento da vinhaça na forma de fertilizante líquido. A cada litro de etanol produzido são gerados, em média, 11L de vinhaça (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008) que, se aplicada à cultura, promoverá um benefício nutricional à planta, pois é fonte K, N e C, principalmente. Tanto a manutenção da palha quanto à aplicação da vinhaça, favorecem os processos microbiológicos de produção de  $N_2$  e  $N_2O$ . Em trabalhos recentes, foram relatados aumento nas emissões de  $N_2O$  devido a utilização da vinhaça e a manutenção do resíduo da colheita (CARMO et al., 2013; PAREDES et al., 2014; VARGAS et al., 2014).

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas sugere o valor de 1% para estimar o fator de emissão de  $N_2O$  (FE) proveniente dos fertilizantes nitrogenados (IPCC, 2006). Esse valor pode ser bastante irreal, em virtude da complexidade dos processos

envolvidos na geração dos gases e que são influenciados pelas condições edáficas e climáticas regionais. Para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil, pesquisas mostram uma ampla faixa de valores para o FE, conforme o manejo praticado (CARMO et al., 2013; SIGNOR; CERRI; CONANT, 2013; PAREDES et al., 2014). Estudos realizados sob diferentes condições são importantes para a criação de um banco de dados que irá auxiliar na elaboração de estratégias que visam minimizar as emissões de  $N_2O$  e aumentar a eficiência da adubação nitrogenada.

Todos os trabalhos realizados no Brasil utilizaram a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE) para quantificar as emissões de  $N_2O$  e efetuar o cálculo do FE. Quando se utiliza o CG-DCE para calcular o FE é necessário um tratamento controle, sem a adição de N, para que a emissão desse tratamento seja subtraída da emissão do tratamento com N (GRANLI; BOCKMAN, 1994). Essa forma de calcular pode superestimar ou subestimar os resultados, uma vez que são utilizadas áreas distintas para compor o FE, e os processos de nitrificação e desnitrificação ocorrem com uma alta variabilidade espacial (MATHIEU et al., 2006).

A espectrometria de massas de razão isotópica, conjugada ao método do traçador  $^{15}N$ , permite medir, simultaneamente, o  $N_2$  e o  $N_2O$  provenientes do fertilizante nitrogenado, dispensando a obrigatoriedade do tratamento controle para o cálculo do FE. No Brasil, não há relatos da utilização do espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS – *Isotope Ratio Mass Spectrometer*) para a quantificação dos gases  $N_2$  e  $N_2O$ .

O objetivo deste trabalho foi avaliar as emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  na cultura da cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo, utilizando o método do traçador  $^{15}N$ , a partir da aplicação dos fertilizantes marcados, ureia e nitrato de amônio, com aplicação ou não de vinhaça.

### 3.2 - Material e Métodos

O experimento foi conduzido no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, em área pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA Centro Sul), situada na localização geográfica 22° 41' 06" S e 47° 38' 52" O, com altitude de 553 m em relação ao nível do mar. As emissões de  $N_2$  e  $N_2O$  foram avaliadas no mês de janeiro de 2013 numa terceira soqueira de cana-de-açúcar, variedade IAC87-3396, colhida sem despalha a fogo, onde havia, aproximadamente, 11 Mg ha<sup>-1</sup> de palha sobre a superfície do solo. A proximidade da área experimental com o Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de

Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (LIE-CENA/USP), onde foram realizadas as análises, permitiu a quantificação dos gases no mesmo dia da coleta das amostras.

### 3.2.1 - Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em um Latossolo Vermelho (Embrapa, 2006) com pH 4,3 ( $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>); 11,0 g kg<sup>-1</sup> de C (combustão seca); 1,0 g kg<sup>-1</sup> de N (combustão seca) e 581 g kg<sup>-1</sup> de argila. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 2<sup>3</sup>, correspondendo a duas fontes de N (ureia (U) e nitrato de amônio (NA)), ambos com 31,9% em átomos de <sup>15</sup>N, sendo o NA duplamente marcado); duas doses de N (55 e 110 kg ha<sup>-1</sup>); com e sem a aplicação de vinhaça *in natura* (100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) O experimento foi conduzido sob delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela foi constituída de uma área de 1,5 x 1,0 m com um segmento de linha adubada ao centro, distante 0,2 m da linha de plantio. As parcelas foram separadas, na mesma linha, por um segmento não adubado de 2,0 m e lateralmente por uma linha de plantio não adubada. Para facilitar a aplicação dos tratamentos, as parcelas foram delimitadas com fitilho e estacas de madeira, formando um retângulo de 1,5 x 1,0 m. No centro de cada parcela, sobre a linha de adubação, foi instalada uma câmara para a coleta dos gases. Externamente às câmaras, foram aplicados os fertilizantes com abundância natural, em filete contínuo, sobre a palha (Figura 1a). A vinhaça foi aplicada logo após a adubação, com auxílio de um regador. Durante a adubação e a aplicação da vinhaça, as câmaras foram mantidas cobertas com sacos plásticos. As fontes marcadas com <sup>15</sup>N foram utilizadas somente dentro das câmaras, respeitando as doses de cada tratamento. Após a aplicação da fonte marcada, aplicou-se a vinhaça na dose equivalente a área da câmara (Figura 1b). Amostras da vinhaça foram coletadas imediatamente após a aplicação e enviadas ao laboratório para análise. A caracterização química revelou um pH igual a 4,0; carbono total de 4,66 g L<sup>-1</sup>; nitrogênio total de 0,34 g L<sup>-1</sup> e potássio (K<sub>2</sub>O) de 1,45 g L<sup>-1</sup>.



Figura 1 - Parcela delimitada contendo câmara de coleta ao centro coberta com saco plástico (a); câmara aberta e frascos contendo o fertilizante marcado com  $^{15}\text{N}$  e a vinhaça (b).

### 3.2.2 - Determinação do tempo de fechamento das câmaras para amostragem dos gases

As câmaras para coleta de gases são, normalmente, do tipo base-corpo e devem possuir, se cilíndricas, um diâmetro aproximado de 40 cm (ROCHETTE; ERIKSEN-HAMEL, 2008). Essas câmaras possuem um volume aproximado de 10 L e, portanto, necessitam permanecer fechadas por um longo período, para que a massa de  $\text{N-N}_2\text{O}$  na amostra a ser coletada alcance, no mínimo, 10  $\mu\text{g}$ , que é um valor seguro para uma análise precisa no IRMS Hydra 20-20 (SerCon Co., UK), conforme orientação do fabricante. O longo período de fechamento pode alterar as condições naturais do solo, influenciando os processos de geração e emissão de  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ .

Além do tempo de fechamento necessariamente elevado, o volume das câmaras de 40 cm de diâmetro dificulta a determinação do  $\text{N}_2$  proveniente do fertilizante marcado, uma vez que a diluição isotópica do  $^{15}\text{N}_2$  com o  $\text{N}_2$  do ar atmosférico é muito grande. Outra desvantagem, além das citadas, é o maior o gasto de fertilizante marcado devido ao maior diâmetro da base, aumentando o custo da pesquisa.

Para contornar os possíveis problemas na quantificação isotópica dos gases com a utilização de câmaras de grande volume, foram utilizadas câmaras de volume reduzido. As câmaras consistiram de frascos de vidro de 5,9 cm de diâmetro, sem fundo e com tampa metálica. As tampas possuíam vedante interno para o fechamento hermético e um septo de borracha de bromobutil para a amostragem dos gases. As amostragens foram realizadas com auxílio de seringas.

Para definir o tempo de permanência de fechamento das câmaras, três delas foram instaladas no CENA, em solo sob gramado, em área delimitada (30 x 30 cm). A instalação foi realizada no dia 2 de dezembro de 2012, cinco dias antes da aplicação do fertilizante (100 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de KNO<sub>3</sub> a 0,3663% de átomos de <sup>15</sup>N) e da vinhaça *in natura* (100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>).

Os gases foram amostrados ao longo do período diurno, considerando duas situações: câmaras permanentemente fechadas (CF) e câmaras abertas por 5 min após cada amostragem (CA). Na situação CF, o fechamento aconteceu às 10 horas do dia 11/12, sendo a primeira amostragem realizada às 11 horas da manhã (horário de verão). As amostragens seguintes foram realizadas às 12, 14 e 18 horas. Na situação CA, as câmaras foram fechadas às 8 horas da manhã do dia 12/12, sendo a primeira amostragem realizada às 9 horas e as demais às 11, 14 e 18 horas.

Em cada amostragem foram retirados 60 mL de gás. O N<sub>2</sub>O das amostras foi concentrado utilizando uma linha de alto vácuo e armadilhas criogênicas, sendo posteriormente analisado em um IRMS Hydra 20-20 (SerCon Co., UK), interfaceado com um analisador automático de N e C (ANCA-GSL, SerCon Co., UK) e acoplado a um amostrador automático (222 XL Liquid Handler, Gilson).

O tempo de fechamento das câmaras foi definido como sendo o suficiente para o acúmulo linear de uma massa de 100 µg de N-N<sub>2</sub>O. Essa massa está dentro da faixa para análise de N no IRMS Hydra 20-20.

### **3.2.3 - Amostragem dos gases**

Uma semana antes da aplicação dos tratamentos, as câmaras foram inseridas no solo das parcelas a 3 cm de profundidade, ficando com um volume livre, aproximado, de 150 cm<sup>3</sup>. A inserção das câmaras no solo foi realizada com o auxílio de um estilete para o corte da palha.

No período de 22 a 31 de janeiro de 2012, amostras de gases foram coletadas diariamente. As amostragens ocorreram entre 11 e 12 horas da manhã (horário de verão), sendo a primeira amostragem realizada 24 h após a aplicação dos tratamentos. Ao final de cada coleta, as câmaras foram abertas, sendo fechadas apenas na manhã do dia seguinte. Para

a determinação de  $N_2$ , foram coletados 0,2 mL de ar, com auxílio de seringas de insulina (Figura 2a). Duas amostras foram retiradas por câmara, sendo a segunda utilizada somente quando houve problemas analíticos na primeira. As amostras foram injetadas em Exetainers de 12 mL contendo He sob pressão. Prevendo uma menor emissão de  $N_2O$  em relação ao experimento realizado em ambiente controlado, foram amostrados 60 mL de ar de cada câmara. As seringas utilizadas para  $N_2O$  foram acopladas a uma válvula de três vias e uma agulha hipodérmica (0,7 x 0,3 mm) (Figura 2b). A válvula serviu para aprisionar o gás até a concentração e transferência do  $N_2O$  para os Exetainers de 12 mL. A etapa de concentração e transferência do  $N_2O$  foi realizada diariamente, no período da tarde, nas instalações do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP.

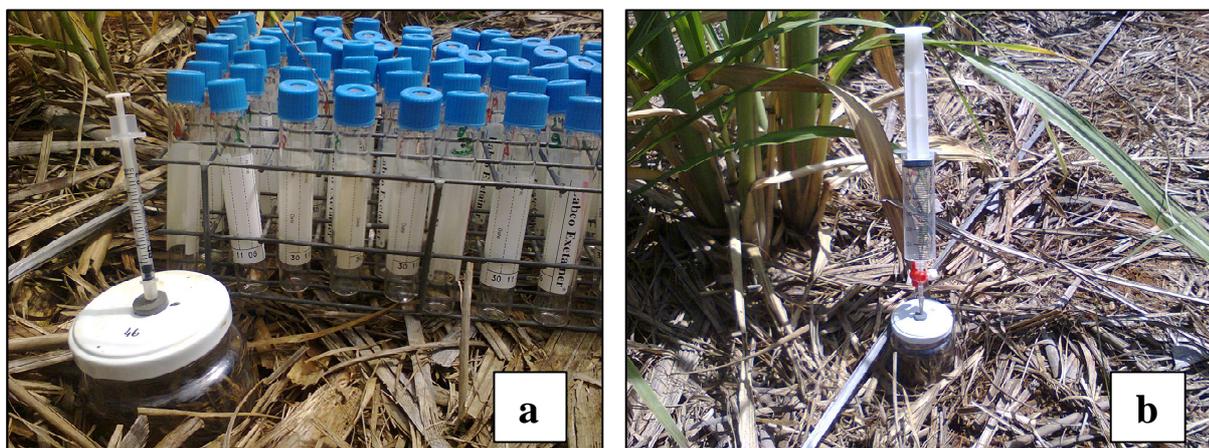


Figura 2 - Coleta de gás com seringa de insulina e Exetainers com He para o acondicionamento e posterior determinação de  $N_2$  (a); coleta de gás em seringa de 60 mL, acoplada a válvula de três vias, para determinação de  $N_2O$  (b).

#### 3.2.4 - Preparo das amostras para análise de $N_2O$ no IRMS

A concentração de  $N_2O$  nas amostras de gás foi realizada em linha de alto vácuo (LAV), construída em borossilicato. A LAV possuía bomba mecânica de dois estágios, modelo E2M5 Edward, associada a uma bomba difusora a óleo, refrigerada a ar, modelo B30207240 Edward, acompanhada de uma bomba criogênica e um medidor de vácuo Pirani PRE 10K Edwards (Figura 3a). A LAV atingiu pressões da ordem de 5,0 Pa.

Amostras injetadas na LAV passaram por armadilhas criogênicas (gelo seco e nitrogênio líquido). A primeira armadilha, composta por mistura de álcool e gelo seco (-73°C), reteve o vapor de água e o CO<sub>2</sub> (ponto de ebulição: -56,4 °C). A segunda armadilha, composta por N<sub>2</sub> líquido (-196 °C) foi responsável por reter o N<sub>2</sub>O (ponto de ebulição: -88,5 °C). O N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> das amostras passaram pelas armadilhas e foram liberados para a atmosfera. Após a retenção dos gases na armadilha de N<sub>2</sub> líquido, o N<sub>2</sub>O retido na mesma foi transferido, por diferença de pressão, devido à redução de temperatura, para o Exetainer acoplado a linha de alto vácuo. Após ter sua pressão igualada à pressão atmosférica com He, o Exetainer foi retirado da linha e, imediatamente, fechado manualmente (Figura 3b). O fechamento manual, uma limitação desse sistema de transferência de N<sub>2</sub>O, permitiu a entrada de uma pequena quantidade de ar atmosférico que foi suficiente para gerar interferência do N<sub>2</sub> na análise do N<sub>2</sub>O. Para monitorar essa interferência e corrigi-la no programa do IRMS, padrões de N<sub>2</sub>O foram injetados na LAV e analisados diariamente com as amostras vindas do campo.

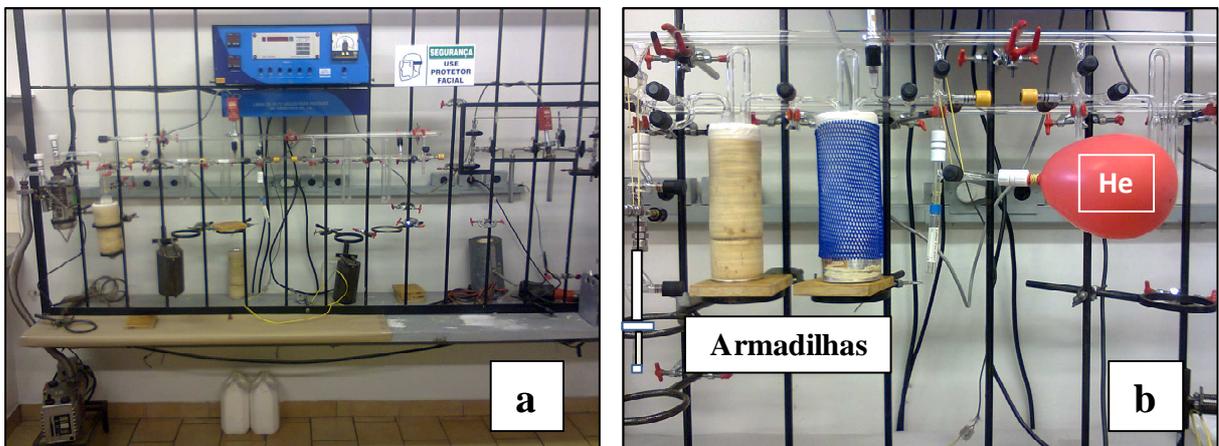


Figura 3 – Linha de alto vácuo do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP (a); detalhes da LAV, mostrando as armadilhas criogênicas e o balão contendo He utilizado para igualar a pressão do Exetainer à pressão atmosférica (b).

### 3.2.5 - Análise dos gases

Após a transferência dos gases para os Exetainers, as amostras foram introduzidas no IRMS por meio da agulha de duplo orifício do amostrador. Dois padrões de referência contendo uma mistura de N<sub>2</sub>e N<sub>2</sub>O (97,6 µg de N-ar e 114,55 µg de N-N<sub>2</sub>O) foram analisados a cada 16 amostras. Dois padrões de N<sub>2</sub>O (114,55 µg de N-N<sub>2</sub>O) foram injetados diariamente na LAV e analisados juntamente com as demais amostras, com a finalidade de verificar a eficiência da transferência na linha.

As emissões de N-gás foram calculadas utilizando-se a seguinte equação:

$$Ne = \frac{Na \times Vlc \times Lad}{Va \times \emptyset c \times t}$$

onde:

*Ne*: N emitido na forma de N<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O (g ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>);

*Na*: massa de N na amostra de gás (g);

*Va*: volume da amostra de gás coletada no campo (mL)

*t*: tempo de fechamento da câmara (h);

*Vlc*: volume livre da câmara (mL)

*Lad*: metros de linha adubada por hectare (6.667 metros, considerando o espaçamento de 1,5 m entre linhas;

*∅c*: diâmetro da câmara (m).

Para calcular a emissão de N-N<sub>2</sub> ou N-N<sub>2</sub>O proveniente do fertilizante marcado com <sup>15</sup>N, foi utilizada a equação:

$$Nepf = \frac{(\%^{15}Na - \%^{15}Nar)}{(\%^{15}Nf - \%^{15}Nar)} \times Ne$$

onde:

$Nepf$ : N emitido na forma de  $N_2$  ou  $N_2O$  proveniente do fertilizante ( $g\ ha^{-1}\ dia^{-1}$ );

$\%^{15}Na$ : % de  $^{15}N$  na amostra de gás;

$\%^{15}Nar$ : % de  $^{15}N$  no ar atmosférico (0,3663 %);

$\%^{15}Nf$ : % de  $^{15}N$  no fertilizante marcado (31,9 %);

$Ne$ : N emitido na forma de  $N_2$  ou  $N_2O$  ( $g\ ha^{-1}\ d^{-1}$ ).

A emissão acumulada de  $N-N_2$  e  $N-N_2O$  proveniente do fertilizante foi calculada somando-se os valores diários de  $Nepf$ .

### 3.2.6 - Análise das variáveis relacionadas (precipitação, temperatura do ar e do solo e umidade do solo)

A precipitação e a temperatura do ar foram monitoradas durante todo o período de condução do experimento pela observação dos dados gerados pelo posto meteorológico de Piracicaba, localizado na Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, cujas coordenadas geográficas são: 22° 42’ 30” S e 47° 38’ 00” O.

A temperatura do solo foi medida a 5 cm de profundidade e a 10 cm de distância do coletor, utilizando um termômetro termopar tipo K (modelo HI 935005N, Hanna Instruments). As medições foram realizadas imediatamente após a amostragem dos gases. A cada coleta de gases, dentro de cada parcela, foram retiradas amostras de solo de 0 a 10 cm de profundidade, para determinação da umidade gravimétrica do solo (diferença entre o peso fresco e o peso seco do solo, após ter permanecido em estufa a 105 °C até peso constante). Os valores da umidade gravimétrica foram convertidos em espaço poroso preenchido por água (EPPA) através da fórmula:

$$EPPA(\%) = \frac{\text{umidade gravimétrica} (\%) \times \text{densidade do solo}}{1 - \frac{\text{densidade do solo}}{\text{densidade de partículas}}}$$

onde a densidade do solo ( $1,42\ g\ cm^{-3}$ ) foi calculada pelo método do anel volumétrico (EMBRAPA, 1997) e a densidade de partículas ( $2,71\ g\ cm^{-3}$ ), pelo método do balão volumétrico (EMBRAPA, 1997).

As emissões acumuladas de  $N_2O$  foram testadas quanto à normalidade de distribuição, utilizando o teste Shapiro-Wilk  $W$  e foram transformadas ( $\log(\text{variável} + 1)$ ) antes de serem submetidas à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa estatístico SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2011). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 - Resultados e Discussão

#### 3.3.1 - Tempo de fechamento das câmaras

O ajuste linear da concentração do gás, com o tempo de fechamento da câmara de coleta é um dos critérios desejáveis na quantificação do  $N_2O$  (ROCHETTE; ERIKSEN-HAMEL, 2008). Nas duas situações de amostragem, o coeficiente de correlação linear foi elevado (0,99), indicando não haver efeito supressivo no aumento da concentração do gás no interior da câmara, sobre a difusão do gás do interior do solo (Figura 4).

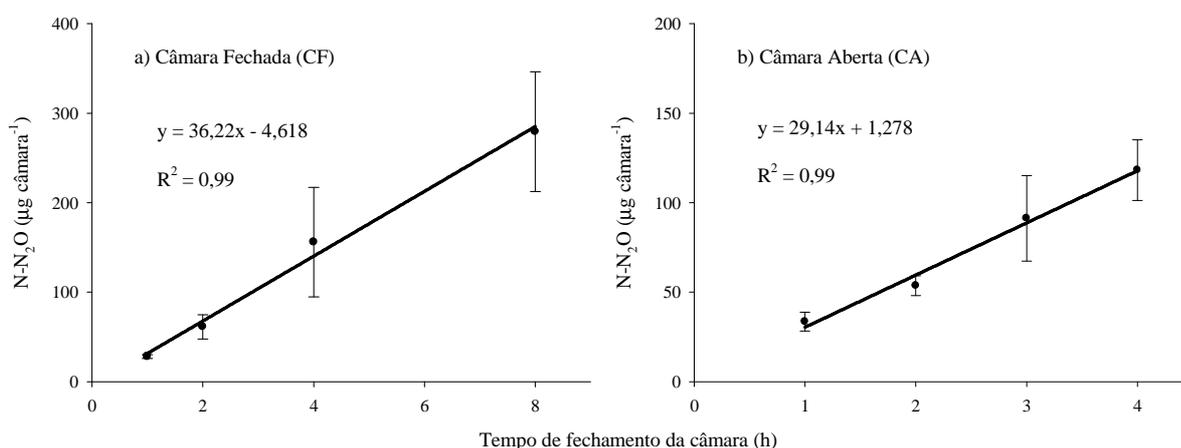


Figura 4 - Emissões de  $N-N_2O$  em câmara de 0,2 L. Câmara mantida fechada durante todo o período de amostragem (a); câmara aberta por 5 min após cada amostragem (b). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

Considerando a faixa ideal de quantificação de  $N$  no IRMS Hydra 20-20, de 100 a 200  $\mu\text{g}$ , estimou-se o tempo necessário de fechamento das câmaras para atingir o valor mínimo dentro da faixa, sendo de 2 h e 53 min para a situação CF e 3 h e 28 min para a

situação CA. É possível que a não abertura das câmaras após as amostragens (CF) possa ter provocado uma superestimação da emissão, atingindo os 100  $\mu\text{g}$  de N-N<sub>2</sub>O em um tempo menor.

O fluxo de N<sub>2</sub>O medido ao longo do período de amostragem não variou muito, principalmente na situação de amostragem CA (Tabela1). Considerando que as amostragens ocorreram em horários diferentes durante o dia, constatou-se não haver um horário específico que representasse a emissão média diária, podendo as amostras ser coletadas a qualquer hora do dia.

Tabela 1 - Fluxo de N-N<sub>2</sub>O ( $\text{mg m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) obtido a partir de dois sistemas de amostragem: câmara constantemente fechada (CF) e câmara aberta por 5 minutos após cada amostragem (CA).

Câmara Fechada (CF)		Câmara Aberta (CA)	
Tempo de Fechamento	Fluxo de N-N <sub>2</sub> O	Tempo de Fechamento	Fluxo de N-N <sub>2</sub> O
h	$\text{mg m}^{-2} \text{h}^{-1}$	h	$\text{mg m}^{-2} \text{h}^{-1}$
1	10 ± 0,1	1	12 ± 1,0
2	11 ± 1,3	2	10 ± 0,6
4	14 ± 2,6	3	11 ± 1,5
8	13 ± 1,5	4	11 ± 0,8

Média e o desvio padrão da média (n = 3).

O resultado desse ensaio embasou a decisão de realizar apenas uma coleta diária de gás, após três horas de fechamento das câmaras.

### 3.3.2 -Variáveis relacionadas

A precipitação total no período de condução do experimento foi de 77,1 mm, tendo a máxima ocorrida no dia 26 de janeiro (28,1 mm), cinco dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 5). Na região de Piracicaba-SP, os meses de janeiro são normalmente chuvosos, e na aplicação dos tratamentos o solo já se encontrava com a umidade elevada (Figura 6), pois já havia chovido 147,6 mm desde o início do mês (dados obtidos do Posto Meteorológico de Piracicaba, SP).

A umidade do solo tem efeito direto sobre a atividade de microrganismos, além de afetar a disponibilidade de  $O_2$  que tem seu coeficiente de difusão reduzido 10.000 vezes na água, quando comparado ao ar (CANTARELLA, 2007). Em solos com teor de umidade mais elevado, a difusão de  $NO_3^-$  e C solúvel para zonas anaeróbias pode ser facilitada e provocar um aumento na taxa de desnitrificação (LUO; TILLMAN; BALL, 1999). A produção máxima de  $N_2O$  devido à nitrificação ocorre quando o solo está com 55 a 65% do espaço poroso preenchido com água (EPPA). Acima de 70% a difusão do  $O_2$  fica limitada, e as emissões de  $N_2O$  e  $N_2$  provenientes da desnitrificação começam a se sobrepor as emissões derivadas da nitrificação (DALAL et al., 2003; BATEMAN; BAGGS, 2005). O volume de chuva no período do experimento manteve o EPPA sempre na faixa de 60 a 90% que é considerada ótima para a emissão de  $N_2O$  (SMITH et al., 2003; DENMEAD et al., 2010).

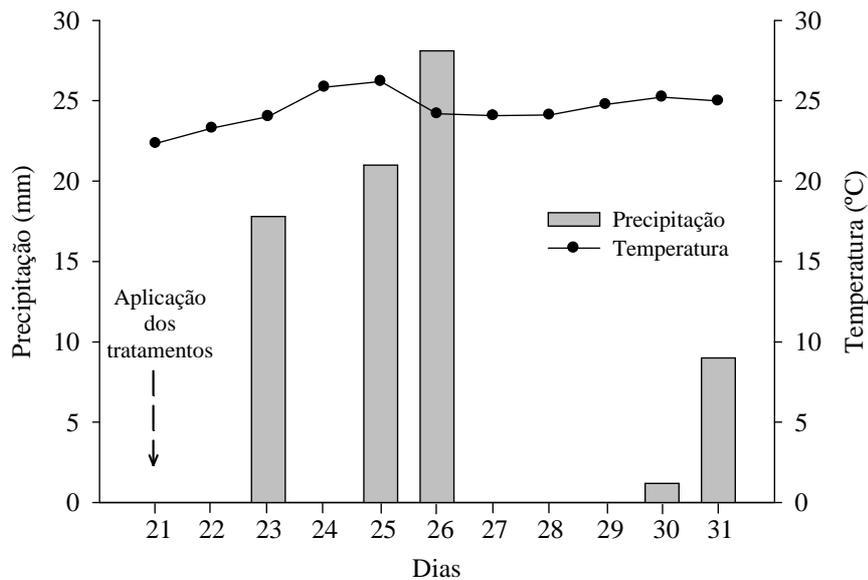


Figura 5 - Precipitação e temperatura do ar na área de condução do experimento (período de 21 a 31 de janeiro de 2013).

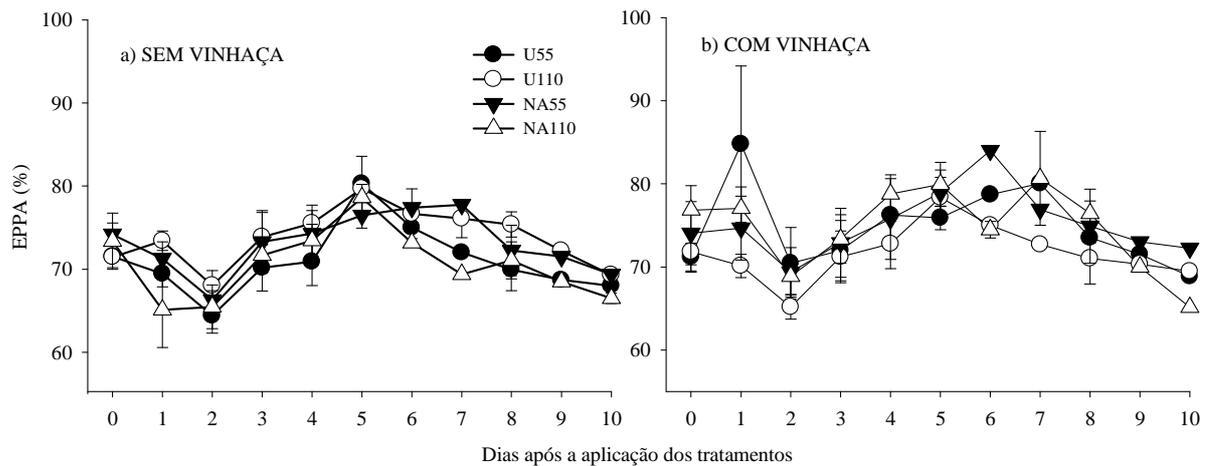


Figura 6 - Espaço poroso preenchido com água (EPPA) na profundidade de 0 a 10 cm, considerando os tratamentos: ureia (U) e nitrato de amônio (NA), nas doses de 55 e 110 kg ha<sup>-1</sup> de N, sem vinhaça (a) e com vinhaça (b). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

A temperatura média do ar no período foi de 24,5 °C, com mínima de 22,3 e máxima de 26,2 °C (Figura 5). A temperatura do solo, medida a 5 cm de profundidade, variou de 24,3 a 26,7 °C, com a média de 25,8 °C (Figura 7). Embora os processos de nitrificação e desnitrificação ocorram em uma ampla faixa de temperatura, sugere-se que temperaturas do solo por volta dos 30 °C sejam as ideais (FIRESTONE, 1982; SCHIMIDT, 1982). Castaldi (2000) observou que a desnitrificação aumenta progressivamente até 37 °C, sendo reduzida a temperaturas mais elevadas. Além dos efeitos diretos sobre a atividade dos microrganismos, a temperatura influencia a solubilidade e a difusão dos gases (CRASWELL, 1978).

A precipitação e a temperatura do ar são relacionadas à umidade e à temperatura do solo que, nesse estudo, foram adequadas aos processos de geração e perda de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O (GRANLI; BOCKMAN, 1994; DALAL et al., 2003). A adição de vinhaça poderia ter aumentado a umidade do solo, mas devida a precipitação ocorrida dois dias após a aplicação, esse efeito não foi observado (Figuras 6 e 7).

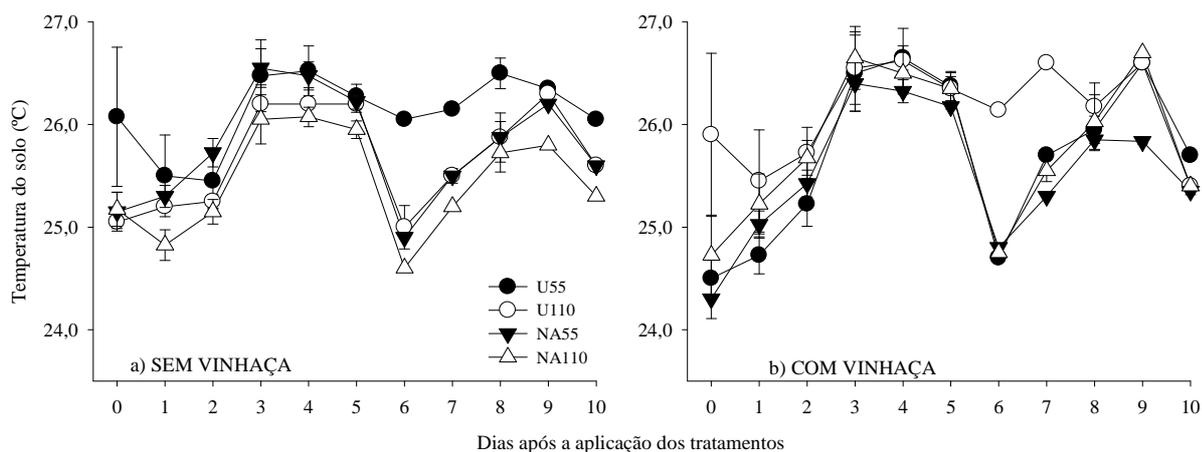


Figura 7 - Temperatura do solo medida a 5 cm de profundidade, considerando os tratamentos: ureia (U) e nitrato de amônio (NA), nas doses de 55 e 110 kg ha<sup>-1</sup> de N, sem vinhaça (a) e com vinhaça (b). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

### 3.3.3 - Emissões

Nas parcelas que receberam a ureia como fonte de N, não foram detectadas emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O. É possível que grande parte do N da ureia tenha se perdido por meio da volatilização da amônia (NH<sub>3</sub>), pois o fertilizante foi aplicado sobre a palha e não incorporado ao solo. A perda acentuada de N-NH<sub>3</sub> pode ter ocasionado uma diminuição significativa da quantidade de N-fertilizante disponível para a nitrificação e subsequente desnitrificação, ocasionando emissões de N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub> abaixo do limite de detecção do IRMS. Cantarella et al. (2008) calcularam perdas de até 25% do N-NH<sub>3</sub> proveniente da ureia aplicada sobre a palha da cana-de-açúcar, quando não ocorreu uma precipitação 24 h após a adubação. As perdas de N-NH<sub>3</sub> podem ultrapassar os 40% quando a ureia é aplicada sobre a palha da cana-de-açúcar (DENMEAD et al., 1990; CANTARELLA et al., 1999).

O volume de vinhaça aplicado imediatamente após a adubação, equivalente a 10 mm de chuva (100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>), não foi suficiente para incorporar a ureia, apesar do fertilizante marcado com <sup>15</sup>N estar na forma de pó. Haysom, Chapman e Vallis (1990), observaram que são necessários mais que 10 mm de chuva para reduzir as perdas por volatilização da ureia aplicada sobre uma grande quantidade de palha de cana-de-açúcar. A palha cria caminhos preferenciais de escoamento, dificultando a solubilização e lixiviação da ureia para o interior do solo (FRENEY et al., 1994).

Emissões de  $N_2O$  provenientes da adubação com ureia em áreas de cana-de-açúcar foram recentemente relatadas, sendo a quantificação do gás realizada por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (SIGNOR; CERRI; CONANT, 2013; PAREDES et al., 2014). O GC-DCE possui um limite de detecção inferior ao IRMS, mas quando se faz uso dele para estimar a perda de  $N_2O$  proveniente do fertilizante é necessário quantificar a emissão de um tratamento controle, sem N-fertilizante, o que pode superestimar as perdas gasosas, pois a fertilização estimula a nitrificação e a desnitrificação do N do solo (efeito *priming*) que, apresentando a mesma abundância natural de  $^{15}N$  do fertilizante, se mistura ao mesmo, impossibilitando a diferenciação entre o  $N_2O$  derivado do N-solo e o  $N_2O$  derivado do N-fertilizante.

Não foram detectadas emissões de  $N_2$  em nenhum dos tratamentos. Embora Stevens e Laughlin (1998) tenham sugerido uma faixa de enriquecimento do fertilizante variando de 20 a 80% em átomos de  $^{15}N$ , a marcação isotópica utilizada no presente trabalho (31,9%), pode não ter sido suficiente para marcar o  $N_2$  contido no interior das câmaras. A diluição isotópica do  $^{15}N_2$  proveniente dos fertilizantes, em um meio com 78% de  $N_2$  a 0,3663% em átomos de  $^{15}N$ , pode ter sido muito elevada, mesmo em uma câmara com volume reduzido.

Outra possível causa para a não detecção do  $^{15}N_2$  proveniente dos fertilizantes pode ter sido a ausência de emissão ocasionada pela não redução do  $N_2O$  a  $N_2$ , embora as condições de temperatura e umidade do solo, disponibilidade de C e N tenham sido ideais para que a desnitrificação fosse completa. Por outro lado, a condição de acidez do solo pode ter inibido a redução do  $N_2O$ , tornando-o o produto final da desnitrificação (BAGGS; SMALES; BATEMAN, 2010).

O volume de vinhaça utilizada no experimento promoveu um acréscimo de  $34 \text{ kg ha}^{-1}$  de N. O N da vinhaça poderia ter sido utilizado como substrato para os processos de nitrificação e desnitrificação, gerando os gases  $N_2O$  e  $N_2$ . Como a composição isotópica do N na vinhaça é semelhante a do ar atmosférico, não foi possível verificar se houve emissão de  $N_2$  proveniente da vinhaça. Entretanto, pelos resultados analíticos da composição isotópica do  $N_2O$ , constatou-se que 93% das emissões desse gás foram provenientes do nitrato de amônio, demonstrando a baixa contribuição da vinhaça como fonte de N para a geração de  $N_2O$ .

A não detecção dos gases nos tratamentos com ureia que receberam a dose de  $100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de vinhaça, confirma a baixa contribuição do N dessa fonte como substrato para os processos de nitrificação e desnitrificação. Todavia, Oliveira et al. (2013) encontraram fatores de emissão para a vinhaça de 0,68 e 0,44% após a adição de  $46 \text{ kg ha}^{-1}$  de N-vinhaça,

em área de cana-de-açúcar colhida com e sem despalha a fogo, respectivamente. Carmo et al. (2013) e Paredes et al. (2014) também quantificaram as emissões de  $N_2O$  proveniente da vinhaça aplicada à cana-de-açúcar, encontrando fatores de emissão de 3,0 e 2,5%, respectivamente. Os três trabalhos citados, entretanto, não utilizaram o método do traçador  $^{15}N$  e, embora a vinhaça tenha potencializado as emissões de  $N_2O$ , é temerário afirmar que o N da vinhaça tenha sido utilizado como substrato para os processos geradores do gás.

Neste estudo, as formas de N da vinhaça não foram transformadas em quantidades detectáveis de  $N_2O$ , mas a vinhaça foi importante nos processos de nitrificação e desnitrificação, pois as emissões de  $N_2O$  provenientes do nitrato de amônio (NA) foram superiores nos tratamentos que receberam a sua aplicação (Figura 8). É possível que a vinhaça tenha aumentado a disponibilidade de C lábil que estimulou o crescimento da microbiota do solo, originando microsítios anaeróbios em função da alta demanda de  $O_2$ . Ruser et al. (2006) observaram que a disponibilidade de C lábil e N, em um ambiente de baixa pressão de  $O_2$ , intensificaram as emissões de  $N_2O$  e  $N_2$ . Nos tratamentos com vinhaça não foi observado efeito das doses nas emissões acumuladas de  $N_2O$  (Figura 8).

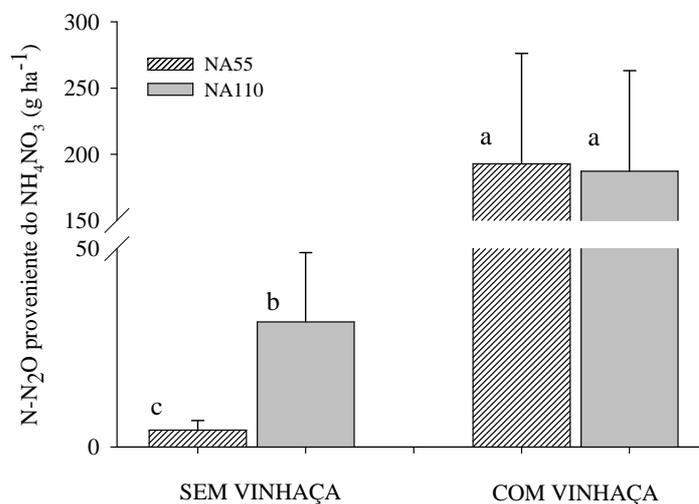


Figura 8 - Emissões acumuladas de  $N-N_2O$  proveniente do  $^{15}NH_4^{15}NO_3$  marcado com 31,9% em átomos de  $^{15}N$ . Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as doses 55 e 110  $kg\ ha^{-1}$  (NA55 e NA110), sem e com a aplicação de vinhaça ( $p < 0,05$ ).

Geralmente, os processos de geração e perda de  $N_2$  e  $N_2O$  ocorrem de forma intensa após a aplicação da fonte nitrogenada (LIU et al., 2007). Neste trabalho, as emissões máximas de  $N_2O$  foram determinadas no quinto dia após as aplicações do nitrato de amônio e da

vinhaça, coincidindo com a maior precipitação do período (Figuras 5 e 9). As parcelas que receberam o NA e a vinhaça estavam, em média, com 79% do EPPA. Neste dia, as quantidades de N-N<sub>2</sub>O emitidas aproximaram dos 80 g ha<sup>-1</sup> (Figura 9b).

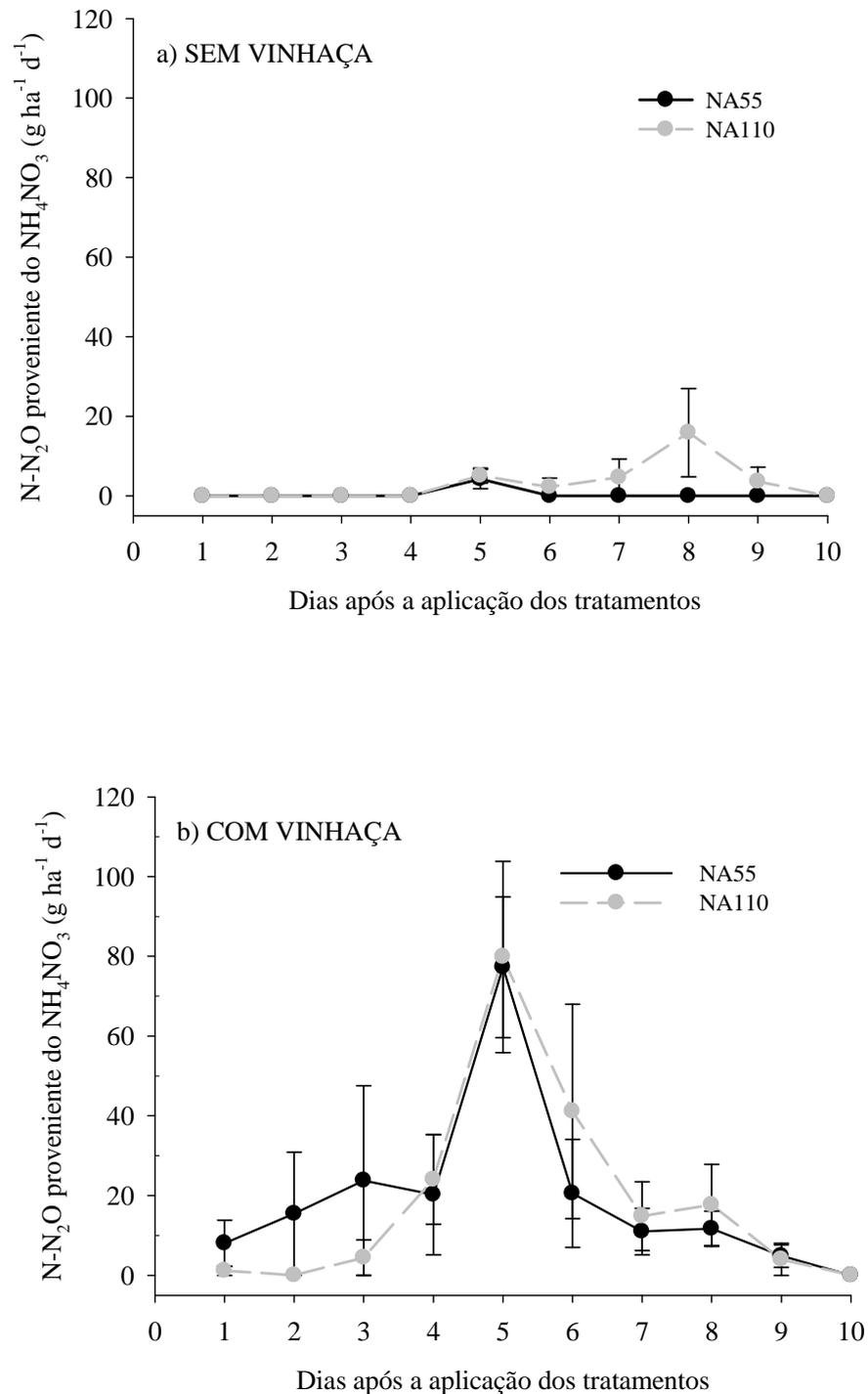


Figura 9 -Média diária das emissões de N-N<sub>2</sub>O derivado do <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> nas doses 55 (NA55) e 110 (NA110) kg ha<sup>-1</sup> de N, sem vinhaça (a) e com vinhaça (b). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

O fator de emissão dos diferentes tratamentos variou de 0,01 a 0,35%, sendo inferiores ao valor de 1% sugerido pelo IPCC para estimar as perdas de N-N<sub>2</sub>O provenientes dos fertilizantes nitrogenados. Os valores foram inferiores, também, a maioria dos valores encontrados nos diversos experimentos com cana-de-açúcar realizados no Brasil. Nos últimos anos, pesquisas realizadas no país relataram fatores de emissão variando de 0,2 a 12,95%, dependendo da condição de condução do experimento (Tabela 2). Essa grande variação é devida às complexas interações entre os fatores que influenciam os processos de geração e perda de N<sub>2</sub>O. A utilização de um valor fixo para estimar a quantidade de N do fertilizante perdida como N<sub>2</sub>O é, portanto, inadequada, pois dificilmente os fatores envolvidos na geração do gás serão os mesmos em diferentes momentos ou locais.

A emissão de gases a partir da aplicação do N-fertilizante dentro da câmara de coleta pode ocorrer, também, externamente as câmaras. Clough et al. (2001) quantificaram as emissões externas quando incubaram solos em vasos com drenos, dentro de uma *gloverbox*, encontrando valores de 13,3% de <sup>15</sup>N-N<sub>2</sub> e 9,3% de <sup>15</sup>N-N<sub>2</sub>O derivados do K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>. Segundo os autores, os gases gerados foram deslocados para baixo no perfil do solo pela água de irrigação, e retornaram a superfície por caminhos preferenciais externos à câmara. Dessa forma, quanto menor o diâmetro da câmara em relação à faixa adubada, maior a possibilidade de ocorrência de uma emissão externa, provocando a subestimação das emissões.

Embora a utilização do método do traçador <sup>15</sup>N permita a quantificação direta das emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O provenientes do fertilizante aplicado, o alto limite de detecção do espectrômetro de massas de razão isotópica é um fator limitante. As possíveis emissões ocorridas e não detectadas pelo IRMS poderiam ter aumentado as emissão acumuladas de N<sub>2</sub>O. Por outro lado, quando se utiliza tratamentos controle (sem N) para estimar as emissões de N<sub>2</sub>O dos tratamentos com N pelo método da cromatografia gasosa, corre-se o risco de superestimar as emissões, pois o N aplicado tem um efeito *priming*, estimulando os microrganismos a utilizar, também, o N do solo como substrato, produzindo N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O que irão se somar as emissões provenientes dos fertilizantes.

Tabela 2 - Dados da literatura sobre o fator de emissão de N<sub>2</sub>O (FE) na cultura da cana-de-açúcar, em diferentes localidades do Brasil, ciclos da cultura e práticas de manejo.

Localidade/Ciclo	Teor de Argila	Palhada	Vinhaça	N	N	Fonte	F.E.	Referência
				Vinhaça	Fertilizante			
	%	Mg ha <sup>-1</sup>	m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>	kg ha <sup>-1</sup>			%	
Jaú, SP/cana planta	11	0	0	0	60	Ureia	1,11 ± 0,75	Carmo et al. (2013)
		0	100	27	60	Ureia	2,65 ± 1,13	
		0	56	22	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,59 ± 0,29	
		0	0	0	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,68 ± 0,41	
Piracicaba, SP/cana soca	29	7	56	22	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,19 ± 0,84	Carmo et al. (2013)
		7	0	0	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,96 ± 0,46	
		14	56	22	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,89 ± 1,00	
		14	0	0	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,76 ± 0,3	
		21	56	22	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3,03 ± 1,22	
		21	0	0	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,03 ± 1,15	
Piracicaba, SP/cana soca	51	15	0	0	60	Ureia	2,85 ± 1,90	Signor, Cerri e Conant (2013)
		15	0	0	90	Ureia	3,59 ± 1,39	
		15	0	0	120	Ureia	6,67 ± 1,59	
		15	0	0	180	Ureia	4,31 ± 0,94	
		15	0	0	60	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,80 ± 1,00	
		15	0	0	90	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,33 ± 0,62	
		15	0	0	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,21 ± 2,11	
		15	0	0	180	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12,95 ± 2,95	

(Continua)

Tabela 2 - Dados da literatura sobre o fator de emissão de N<sub>2</sub>O (FE) na cultura da cana-de-açúcar, em diferentes localidades do Brasil, ciclos da cultura e práticas de manejo.

(Conclusão)

Localidade/Ciclo	Teor de Argila	Palhada	Vinhaça	NVinhaça	NFertilizante	Fonte	F.E.	Referência
	%	Mg ha <sup>-1</sup>	m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>		kg ha <sup>-1</sup>		%	
Goianésia, GO/cana soca	57	n.i. <sup>a</sup>	0	0	60	Ureia	1,10 ± 0,22	Signor, Cerri e Conant (2013)
		n.i.	0	0	120	Ureia	0,63 ± 0,12	
		n.i.	0	0	180	Ureia	0,31 ± 0,09	
		n.i.	0	0	60	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,22 ± 0,27	
		n.i.	0	0	120	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,53 ± 0,07	
		n.i.	0	0	180	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,22 ± 0,12	
Seropédica, RJ/cana soca	17	≈ 0	0	0	80	Ureia	0,2	Paredes et al. (2014)
		≈ 0	150	12	80	Ureia <sup>b</sup>	0,6	
		≈ 0	150	12	80	Ureia <sup>c</sup>	0,7	
Piracicaba, SP/cana soca	58	11	0	0	55	Ureia	0	Este estudo
		11	0	0	110	Ureia	0	
		11	0	0	55	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,01 ± 0,00	
		11	0	0	110	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,03 ± 0,02	
		11	100	34	55	Ureia	0	
		11	100	34	110	Ureia	0	
		11	100	34	55	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,35 ± 0,15	
11	100	34	110	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,17 ± 0,07			

<sup>a</sup>Não informado. Foi relatado que o experimento foi conduzido em área cultivada há mais de 20 anos com cana-de-açúcar, no quinto ano de condução da soqueira, colhida sem despalha a fogo. <sup>b</sup>Ureia aplicada dois dias após a aplicação da vinhaça. <sup>c</sup>Ureia aplicada dois dias antes da aplicação da vinhaça.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a potencialidade do uso do método do traçador  $^{15}\text{N}$ , em condições de campo. A ausência de detecção do  $\text{N}_2$  proveniente da ureia e do nitrato de amônio gera a hipótese que a marcação isotópica dos fertilizantes pode ter sido insuficiente para marcar o  $\text{N}_2$  do interior da câmara. Porém, uma marcação mais elevada poderá causar problemas analíticos na detecção do  $\text{N}_2\text{O}$  proveniente do fertilizante, pois a diluição isotópica do gás emitido, com o  $\text{N}_2\text{O}$  atmosférico, é pequena. Amostras de  $\text{N}_2\text{O}$  muito enriquecidas em  $^{15}\text{N}$  poderão promover efeito de memória e contaminar as amostras seguintes do conjunto a ser analisado, sendo necessário intercalar vários “brancos” entre as amostras para fazer a descontaminação do sistema.

### 3.4 - Conclusões

1. Não foram detectadas emissões de  $\text{N}_2$  provenientes da ureia e do nitrato de amônio.
2. Não foram detectadas emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  provenientes da ureia.
3. A aplicação da vinhaça potencializou as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  provenientes do nitrato de amônio.
4. Nos tratamentos com vinhaça, as diferentes doses de nitrato de amônio não provocaram diferenças nas emissões acumuladas de  $\text{N}_2\text{O}$ .

### Referências

BAGGS, E. M.; MILLAR, N.; NDUFA, J. K.; CADISCH, G. Effect of residue on  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from tropical soils. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPBELL, C.; WATSON, R.T. (Ed.). **A sustainable management of soil organic matter**. Chelsea: Ann Arbor Press, 2001.p. 56-89.

BAGGS, E. M.; SMALES, C. L.; BATEMAN, E. J. Changing pH shifts the microbial source as well as the magnitude of  $\text{N}_2\text{O}$  emission from soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p.793-805, 2010.

BAILY, A.; WATSON, C. J.; LAUGHLIN, R.; MATTHEWS, D.; McGEOUGH, K.; JORDAM, P. Use of the  $^{15}\text{N}$  gas flux method to measure the source and level of  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emissions from grazed grassland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 94, n. 2-3, p. 287-298. 2012.

BATEMAN, E. J.; BAGGS, E. M. Contributions of nitrification and denitrification to N<sub>2</sub>O emissions from soils at different water-filled pore space. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 41, p. 379-388, 2005.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia - MME. **Balço energético nacional 2013**: ano base 2012. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/mme/menu/todas\\_publicacoes.html](http://www.mme.gov.br/mme/menu/todas_publicacoes.html)>. Acesso em: 04 maio 2014.

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

CANTARELLA, H.; ROSSETTO, R.; BARBOSA, W.; PENNA, M. J.; RESENDE, L. C. L. Perdas de N por volatilização da amônia e resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada em sistema de colheita de cana sem queima prévia. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., 1999, Londrina. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1999. p. 82-87.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETTO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R. B.; QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilization from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 4, p. 397-401, 2008.

CARMO, J. B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L. C.; SOUZA NETO, E. R.; PITOMBO, L. M.; 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, n. 3, p. 267-280, 2013.

CASTALDI, S. Responses of nitrous oxide, dinitrogen and carbon dioxide production and oxygen consumption to temperature in forest and agricultural light-textured soils determined by model experiment. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, p. 67-72, 2000.

CHARPUS-LARDY, L.; WRAGE, N.; METAY, A.; CHOTTE, J.; BERNOUX, M. Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. **Global Change Biology**, Oxford, v. 13, p. 1-17, 2007.

CLOUGH, T. J.; SHERLOCK, R. R.; CAMERON, K. C.; STEVENS, R. J.; LAUGHLIN, R. J.; MÜLLER, C. Resolution of the <sup>15</sup>N balance enigma? **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 39, p. 1419-1431, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**: cana-de-açúcar, safra 2013/2014, quarto levantamento, abril 2014. Brasília, DF: CONAB, 2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_04\\_10\\_09\\_00\\_57\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_4o\\_lev\\_-\\_13.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_10_09_00_57_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_13.pdf)>. Acesso em: 04 maio 2014.

CRASWELL, E. T. Some factors influencing denitrification and nitrogen immobilization in a clay soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 10, p. 241-245, 1978.

DALAL, R. C.; WANG, W.; ROBERTSON, G. P.; PARTON, W. J. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, p. 165-195, 2003.

DENMEAD, O. T.; FRENEY, J. R.; JACKSON, A. V.; SMITH, J. W. B.; SAFFIGNA, P. G.; WOOD, A. W.; CHAPMAN, L. S. Volatilization of ammonia from urea and ammonium sulfate applied to sugarcane trash in North Queensland. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Kwa-Shukela, v. 12, p. 73-78, 1990.

DENMEAD, O. T.; MACDONALD, B. C. T.; BRYANT, G.; NAYLOR, T.; WILSON, S.; GRIFFITH, D. W. T.; WANG, W. J.; SALTER, B.; WHITE, I.; MOODY, P. W. Emissions of methane and nitrous oxide from Australian sugarcane soils. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 150, p. 748-756, 2010.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPS, 1997. 212 p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FIRESTONE, M. K. Biological denitrification. In: STEVENSON, F. J.; BREMNER, J. M.; HAUCK, R. D.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA, 1982. v. 22, p. 289-326.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2763-2770, 2008. Número especial.

FRENEY, J. R.; DENMEAD, O. T.; WOOD, A. W.; SAFFIGNA, P. G. Ammonia loss following urea addition to sugar cane trash blankets. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Kwa-Shukela, v. 16, p. 114-121, 1994.

GRANLI, T.; BOCKMAN, O. C. Nitrous oxide from agriculture. **Norwegian Journal of Agricultural Science**, Porsgrunn, v.12, p. 7-128, 1994.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 54, p. 33-45, 2008.

HAYSOM, M. B.; CHAPMAN, L. S.; VALLIS, I. Recovery of nitrogen from <sup>15</sup>N urea applied to a green cane trash blanket at Mackay. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Kwa-Shukela, v. 16, p. 79-84, 1990.

HEFFER, P. **Assessment of fertilizer use by crop at the global level 2010-2010/2011**. Paris: International Fertilizer Industry Association – IFA, 2013. Disponível em: <http://www.fertilizer.org/ItemDetail?iProductCode=9592Pdf&Category=STAT&WebsiteKey=411e9724-4bda-422f-abfc-8152ed74f306>. Acesso em: 04 maio 2014.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Guidelines for national greenhouse gas inventories: Agriculture, Forestry and Other Land Use**. Hayama: National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006. v. 4. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

KHALIL, K.; MARY, B.; RENAULT, P. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O<sub>2</sub> concentration. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 687-699, 2004.

KOLL, D. M.; DOLFING, J.; WRAGE N.; VAN GROENIGEN, J. W. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 174-178, 2011.

LIU, X. J.; MOSIER, A. R.; HALVORSON, A. D.; REULE, C. A.; ZHANG, F. S. Dinitrogen and N<sub>2</sub>O emissions in arable soil: Effect of tillage, N source and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2362-2370, 2007.

LUO, J.; TILLMAN, R.W.; BALL, P.R. Factors regulating denitrification in a soil under pasture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 913-927, 1999.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. R. Greenhouse gas emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, p. 582-564, 2008.

MATHIEU, O.; LÉVÊQUE, J.; HÉNAULT, C.; MILLOX, M. J.; BIZOUARD, F.; ANDREUX, F. Emission and spatial variability of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with <sup>15</sup>N isotopic techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 941-951, 2006.

MORSE, J. L.; BERNHARDT, E. S. Using <sup>15</sup>N tracers to estimate N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions from nitrification and denitrification in coastal plain wetlands under contrasting land-uses. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 57, p. 635-643, 2013.

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.

PAREDES, D. S.; LESSA, A. C. R.; SANT'ANNA, S. A. C.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 98, p. 41-55, 2014.

ROCHETTE, P.; ERIKSEN-HAMEL, N. S. Chamber Measurements of Soil Nitrous Oxide Flux: Are Absolute Values Reliable? **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 72, p. 331-342, 2008.

RUSER, R.; FLESSA, H.; RUSSOW, R.; SCHMIDT, G.; BUEGGER, F.; MUNCH, J. C. Emission of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> from soil fertilized with nitrate: effect of compaction, soil moisture and rewetting. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 263-274, 2006.

SCHIMIDT, E. Nitrification in soil. In: STEVENSON, F. J.; BREMNER, J. M.; HAUCK, R. D.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA, 1982. (Agronomy Series, 22).

SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P.; CONANT, R. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

SMITH, K. A.; BALL, T.; CONEN, F.; DOBBIE, K. E.; MASSHEDER, J.; REY, A. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 779-791, 2003.

STEVENS, R. J.; LAUGHLIN, R. J.; MALONE, J. P. Measuring the mole fraction and source of nitrous oxide in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 541-543, 1998.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas de nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 193-201, 2002.

VARGAS, V. P.; CANTARELLA, H.; MARTINS, A. A.; SOARES, J. R.; CARMO, J. B.; ANDRADE, C. A. Sugarcane crop residue increases N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> emissions under high soil moisture conditions. **Sugar Technology**, New Delhi, v. 16, n. 2, p. 174-179, 2014.

VITTI, A. C.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 3, p. 287-293, 2011.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; FRANCO, H. C. J.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 491-498, 2007.

#### 4 - EMISSÕES DE N<sub>2</sub> E N<sub>2</sub>O PELO MÉTODO DO TRAÇADOR <sup>15</sup>N E ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR

##### Resumo

As melhorias nas condições físicas e químicas do solo promovidas pela manutenção dos restos culturais e aplicação da vinhaça na cana-de-açúcar podem potencializar as perdas de N nas formas de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O. O objetivo deste trabalho foi quantificar as perdas de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O em área de cana-de-açúcar, utilizando o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> enriquecido em átomos de <sup>15</sup>N a 10,43% para as determinações de N<sub>2</sub>O e a 98% para as determinações de N<sub>2</sub>. Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 2<sup>3</sup>, correspondendo a duas doses de N na forma de nitrato de amônio duplamente marcado em <sup>15</sup>N (70 e 140 kg ha<sup>-1</sup>); duas doses de vinhaça *in natura* (75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>); com e sem a cobertura de palha (11Mg ha<sup>-1</sup>). Três câmaras de vidro de 5,9 cm de diâmetro foram instaladas sobre a linha de adubação de cada parcela. Cada uma das três câmaras (C1, C2 e C3) recebeu a mesma dose de fertilizante, porém com níveis de enriquecimento diferentes, sendo de 0,366, 10,43 e 98% em átomos de <sup>15</sup>N, para C1, C2 e C3, respectivamente. C1 foi utilizada para monitorar a temperatura do solo e do interior da câmara, C2 e C3 para amostragem do ar e determinação dos gases N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>, respectivamente. Amostras de solo foram coletadas ao longo do experimento para acompanhar as variações nos níveis de umidade e nos teores de nitrato, amônio e carbono lábil. As amostras de gás foram analisadas em espectrômetro de massas de razão isotópica, após concentração do N<sub>2</sub>O em linha de alto vácuo e transferência para ampolas de vidro. Não foram detectadas emissões de N<sub>2</sub>; a manutenção da palha intensificou as emissões de N<sub>2</sub>O proveniente do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; os atributos do solo não apresentaram correlações significativas com as emissões de N<sub>2</sub>O e o fator de emissão nos diferentes tratamentos foram inferiores a 0,2%.

**Palavras-chave:** IRMS. Nitrificação. Desnitrificação. EPPA. Nitrato. Carbono lábil.

## Abstract

The maintenance of crop residues and the application of vinasse in sugarcane plantations improve the physical and chemical conditions of soil, but may also potentiate N losses in the forms of  $N_2$  and  $N_2O$ . The aim of this study was to quantify the loss of  $N_2$  and  $N_2O$  in sugarcane, using  $NH_4NO_3$  enriched with  $^{15}N$  at 10.43 atom % for determination of  $N_2O$  and 98 atom % for determination of  $N_2$ . The treatments were assigned in full factorial combination, corresponding two doses of N as  $^{15}NH_4^{15}NO_3$  (70 and 140 kg ha<sup>-1</sup>); two vinasse levels (75 and 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>); and addition (11 Mg ha<sup>-1</sup>) or absence of crop residues. Three glass chambers of 5.9 cm diameter were installed in the fertilization row of each plot. The three chambers (C1, C2, C3) received the same amount of fertilizer, but with different enrichments levels, being of 0.366, 10.43 and 98 atom%  $^{15}N$ , respectively. C1 was used to monitor the soil temperature and the interior temperature of the chamber. C2 and C3 were used to sample the  $N_2O$  and  $N_2$  concentrations, respectively. Soils samples were collected throughout the experiment to monitor changes of soil moisture and in nitrate, ammonium and labile carbon concentrations. The gases were analyzed by isotope ratio mass spectrometer, after concentrating  $N_2O$  in high-vacuum line and its subsequent transfer to glass ampoules. No emissions of  $N_2$  were detected; the maintenance of straw intensified  $N_2O$  emissions from  $NH_4NO_3$ ; soil attributes showed no significant correlations with  $N_2O$  emissions; emissions factors were less than 0.2% in all the different treatments.

**Keywords:** IRMS. Nitrification. Denitrification. WFPS. Nitrate. Labile carbon

#### 4.1 - Introdução

Desde a última década, o setor sucroenergético vem eliminando, gradativamente, a queima da palha da cana-de-açúcar. Em 2012, aproximadamente 74% da área plantada na região centro-sul, que é responsável por mais de 90% da produção no país, foi colhida sem despalha a fogo (NIKO et al., 2013). Esse sistema de colheita permite acúmulo de massa seca sobre o solo que pode variar de 10 a 20 Mg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (VITTI et al., 2008; THORBURN et al., 2012).

A manutenção dos resíduos da colheita promove melhoria nas condições químicas e físicas do solo, como o aumento dos estoques de C e N e maior retenção de umidade (GALDOS et al., 2010; VITTI et al., 2011). Entretanto, assim como a cobertura morta mantida sobre o solo beneficia o sistema solo-planta, ela também propicia o desenvolvimento de microrganismos nitrificadores e desnitrificadores, aumentando o risco de perdas de N nas formas de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O. Carmo et al. (2013) constataram incremento nas emissões de N<sub>2</sub>O com o aumento da quantidade de palha de cana-de-açúcar deixada sobre o solo. Vargas et al. (2014) verificaram que a importância dos restos culturais para os processos de geração de N<sub>2</sub>O vai além da manutenção da umidade do solo, já que solos mantidos com a mesma umidade apresentaram o dobro das emissões de N<sub>2</sub>O, na presença de palha.

Práticas agrícolas adotadas no cultivo da cana-de-açúcar, como a manutenção da palha sobre o solo e o uso da vinhaça como fertilizante orgânico, potencializam as perdas de N na forma de N<sub>2</sub>O (CARMO et al., 2013; PAREDES et al., 2014) e, possivelmente, na forma de N<sub>2</sub>. Embora os trabalhos realizados em diferentes regiões do país e condições de manejo, estejam permitindo a criação de um banco de dados sobre as emissões de N<sub>2</sub>O na cultura da cana-de-açúcar, ainda não existem informações sobre as emissões de N<sub>2</sub>, possivelmente pela dificuldade de medição desse gás. Quantificar ambos os gases é importante, pois o N<sub>2</sub>O é um dos principais gases causadores do efeito estufa, e a sua emissão, juntamente com a emissão de N<sub>2</sub>, provoca prejuízos econômicos por diminuir a eficiência da adubação nitrogenada (BAILY et al., 2012).

O N<sub>2</sub> é gerado no solo a partir da redução do N<sub>2</sub>O durante a última etapa da desnitrificação. Outros processos biológicos, como a codesnitrificação e a oxidação anaeróbia da amônia, podem gerar o N<sub>2</sub>, mas a desnitrificação é considerada o principal processo (HAYATSU; TAGO; SAITO, 2008). Fatores físicos, químicos e biológicos influenciam tanto

a produção de  $N_2$  e  $N_2O$  quanto a razão  $N_2O:N_2$ , incluindo a umidade do solo (MORSE; BERNHARDT, 2013), o pH (CUHEL et al., 2010; BAGGS; SAMLES; BATEMAN, 2010), a temperatura (BAILY et al., 2012), o suprimento de C (MORLEY; BAGGS, 2010), o potencial redox (KHALIL; MARY; RENAULT, 2004) e o manejo do solo (JANTALIA et al., 2008).

A razão  $N_2O:N_2$  aumenta com o aumento da concentração de  $NO_3^-$  e diminui com o aumento da disponibilidade de C orgânico, com o aumento do conteúdo de água e com a elevação do pH do solo (STEVENS; LAUGLHIN, 1998; SAGGAR et al., 2013). Como a nitrificação e a desnitrificação podem ocorrer simultaneamente, devido à heterogeneidade dos solos com relação à quantidade de microssítios aeróbios e anaeróbios, a razão  $N_2O:N_2$  tende a ser menor quando as condições para a ocorrência da desnitrificação são mais favoráveis, e isto inclui um maior conteúdo de água e uma maior concentração de C disponível.

Entretanto, mesmo em condições favoráveis, a desnitrificação pode ocorrer de forma incompleta, aumentando a razão  $N_2O:N_2$ . A redução do  $N_2O$  a  $N_2$  é dependente da atividade da enzima redutase do óxido nitroso. A atividade aumenta com o aumento do pH, com o aumento da disponibilidade de C lábil, com a diminuição da concentração de  $NO_3^-$  e com o decréscimo da pressão parcial de oxigênio (CHAPUIS-LARDY et al., 2007; DANNENMANN et al., 2008; CUHEL et al., 2010; MORLEY; BAGGS, 2010).

O óxido nitroso pode ser lançado na atmosfera pela incompleta desnitrificação, devido a fatores reguladores da atividade das enzimas envolvidas no processo ou devido à ausência da redutase do óxido nitroso (CUHEL et al., 2010). O sistema de desnitrificação da maioria dos fungos (KOBAYASHI et al., 1996) e de aproximadamente um terço das bactérias desnitrificadoras sequenciadas (PHILIPPOT et al., 2011) são desprovidos da enzima redutase do  $N_2O$ , tornando o  $N_2O$  o produto final da desnitrificação.

A razão  $N_2O:N_2$  ou a fração molar do  $N_2O$  ( $N_2O/(N_2O+N_2)$ ) tem sido discutida nos trabalhos de quantificação dos gases (SCHEER et al., 2009; CUHEL et al., 2010; MORLEY; BAGGS, 2010; BAILY et al., 2012). Na maioria desses estudos, a quantificação objetiva avaliar os fatores envolvidos nos processos de geração e emissão dos gases, a fim de elaborar propostas de manejo que minimizem as perdas. A ocorrência das emissões é praticamente inevitável, uma vez que as condições ideais para que elas aconteçam se assemelham às condições ideais de produção da maioria das culturas. Diante da inevitável emissão, é desejável que esta ocorra na forma de  $N_2$ , que é um gás inerte (SAGGAR et al., 2013).

As dificuldades encontradas para a medição acurada de  $N_2$  em uma atmosfera rica neste gás têm sido o gargalo no entendimento dos fatores que regulam a razão  $N_2O:N_2$  (SAGGAR et al., 2013). O uso do método do traçador  $^{15}N$  tem ajudado na quantificação simultânea desses gases. Utilizando a espectrometria de massas de razão isotópica pode-se determinar a quantidade de  $N_2O$  proveniente do fertilizante aplicado, tanto pela variação da concentração do gás em ambiente confinado, quanto pela variação da composição isotópica. Em virtude da alta concentração do  $N_2$  na atmosfera, a emissão deste gás só pode ser determinada pela variação da composição isotópica do ar confinado, pois a ínfima variação da concentração, devida à emissão proveniente do fertilizante, não é suficiente para ser percebida, a menos que a atmosfera do ambiente confinado esteja livre de  $N_2$  (SCHEER et al., 2009; YANG; SILVER, 2011).

O enriquecimento da fonte nitrogenada e o cuidado exigido na preparação das amostras para admissão no espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS – *isotope ratio mass spectrometer*) são aspectos relevantes que influenciam a adoção do método do traçador  $^{15}N$ . O alto enriquecimento em  $^{15}N$  do fertilizante é condição exigida para a marcação do  $N_2$  da atmosfera confinada. Nos trabalhos que utilizaram o método do traçador  $^{15}N$ , a marcação da fonte nitrogenada variou de 20 a 99% (STEVENS; LAUGHLIN, 1998; BAILY et al., 2012; HIGGINS; LAUGHLIN; WATSON, 2013; MORSE; BERNHARDT, 2013), sendo que quanto maior o enriquecimento, maior o custo da fonte nitrogenada.

Com relação ao  $N_2O$ , a dificuldade para determinar a sua concentração e a sua abundância em  $^{15}N$  é atribuída ao alto limite de detecção dos espectrômetros de massa de razão isotópica. Esse problema pode ser resolvido realizando uma pré-concentração do  $N_2O$  das amostras. A pré-concentração pode ser realizada em sistemas acoplados ao IRMS ou em linhas de alto vácuo contendo armadilhas criogênicas.

No experimento abordado no capítulo anterior levantou-se a hipótese que o enriquecimento isotópico dos fertilizantes foi insuficiente para marcar o  $N_2$  do interior das câmaras de coleta. O estudo relatado neste capítulo objetivou quantificar as perdas de  $N_2$  e  $N_2O$  em área de cana-de-açúcar, utilizando o  $NH_4NO_3$  enriquecido em átomos de  $^{15}N$  a 10,43% para as determinações de  $N_2O$  e a 98% para as determinações de  $N_2$ .

## 4.2 - Material e Métodos

O experimento foi realizado no mês de dezembro de 2013, em área pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA Centro Sul), no município de Piracicaba, Estado de São Paulo. As coordenadas geográficas da área (22° 41' 11" S e 47° 38' 39" O) indicam a sua proximidade com a área do experimento realizado em janeiro do mesmo ano. As emissões de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O foram medidas numa segunda soqueira de cana-de-açúcar, variedade RB86-7515, colhida sem despalha a fogo, mas que sofreu uma queima acidental quando estava no ciclo de cana planta. Dentro da área experimental, a cobertura de palha foi amostrada, seca e pesada, sendo a massa calculada em 11 Mg ha<sup>-1</sup>.

### 4.2.1 - Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em um Latossolo Vermelho (EMBRAPA, 2006). A análise química e granulométrica revelou os seguintes valores: pH 5,6 (CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>); 10,0 g kg<sup>-1</sup> de C (combustão seca); 1,0 g kg<sup>-1</sup> de N (combustão seca) e 617 g kg<sup>-1</sup> de argila. Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 2<sup>3</sup>, correspondendo a duas doses de N na forma de nitrato de amônio (70 e 140 kg ha<sup>-1</sup>); duas doses de vinhaça *in natura* (75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>); com e sem a cobertura de palha (11Mg ha<sup>-1</sup>). O experimento foi conduzido sob delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela foi constituída de uma área de 2,0 x 1,0 m com um segmento de linha adubada ao centro, distante 0,2 m da linha de plantio. As parcelas foram separadas, na mesma linha, por um segmento não adubado de 1,0 m e, lateralmente, por uma linha de plantio não adubada. As parcelas foram delimitadas com fitilho e estacas de madeira.

Três câmaras de vidro de 5,9 cm de diâmetro tiveram suas bases inseridas no solo, a 3 cm de profundidade, sobre a linha de adubação de cada parcela. A distância entre as câmaras foi de 15 cm. A instalação das câmaras ocorreu três dias antes da aplicação da vinhaça e do fertilizante. No momento da instalação, a palha foi retirada totalmente da parcela (tratamentos sem palha) ou foi ligeiramente afastada (tratamentos com palha), para melhor fixação das câmaras. Logo após a fixação, procedeu-se a distribuição da palha dentro das câmaras. A palha seca, utilizada para estimar a massa de cobertura morta, foi cortada em pedaços de, aproximadamente, três centímetros e colocada dentro de cada câmara das parcelas com palha.

Cada câmara recebeu 3 g de palha, equivalentes a 11 Mg ha<sup>-1</sup>, preenchendo cerca de 50 mL do volume da câmara. Este volume foi considerado no cálculo das emissões.

No momento da aplicação da vinhaça e do fertilizante, na área das parcelas, as câmaras foram cobertas com sacos plásticos (Figura 1a). Nas parcelas que receberam a dose de 75 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça foram aplicados, previamente, 75m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de água, a fim de igualar a umidade à dose mais elevada de vinhaça. A vinhaça utilizada apresentou as seguintes características químicas: pH 4,10; 4,31 g L<sup>-1</sup> de carbono total; 0,31 g L<sup>-1</sup> de nitrogênio total e 2,50 g L<sup>-1</sup> de potássio (K<sub>2</sub>O).

O fertilizante aplicado externamente às câmaras foi o nitrato de amônio com abundância natural de N (0,366% em átomos de <sup>15</sup>N). A aplicação foi realizada em filete contínuo, a 0,2 m da linha da cana-de-açúcar (Figura 1b). Depois da aplicação externa, os sacos plásticos foram retirados e procedeu-se à aplicação de água, vinhaça e fertilizante dentro das câmaras. A água e a vinhaça foram aplicadas na dose equivalente a área da base e o fertilizante na dose equivalente ao diâmetro da base.

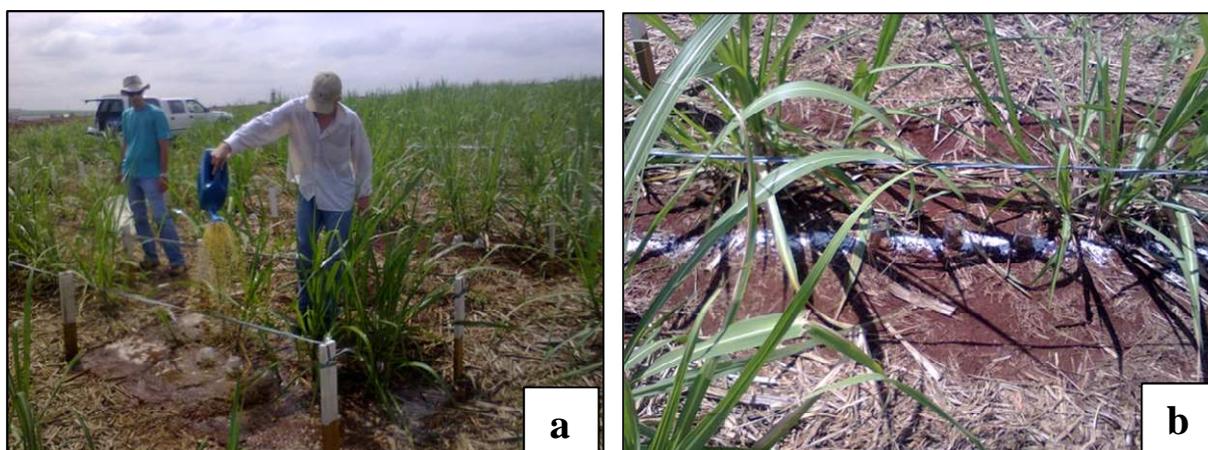


Figura 1 – Aplicação da vinhaça *in natura* na área da parcela (a); nitrato de amônio aplicado em filete contínuo, externamente às câmaras de coleta dos gases (b).

Cada câmara, dentro de cada parcela, recebeu a mesma dose de fertilizante, porém com níveis de enriquecimento (<sup>15</sup>N) diferentes. Na câmara da extremidade esquerda (C1), cujo objetivo foi o monitoramento das temperaturas do solo (5 cm de profundidade) e da atmosfera interna, foi utilizado o nitrato de amônio (NA) com abundância natural; na câmara do meio (C2), destinada as medições de N<sub>2</sub>O, foi utilizado o NA enriquecido a 10,43% em átomos de <sup>15</sup>N; e na câmara da extremidade direita (C3), destinada as avaliações das emissões

de  $N_2$ , foi utilizado o NA com 98% em átomos de  $^{15}N$ . O nitrato de amônio foi marcado no  $NO_3^-$  e no  $NH_4^+$ . A utilização de dois níveis de enriquecimento foi necessária devido aos diferentes níveis de diluição isotópica sofrida pelos gases. O  $N_2$  proveniente do fertilizante sofre uma diluição isotópica muito grande em função das concentrações atmosféricas e, por este motivo, a marcação do substrato tem que ser elevada. Por outro lado, a diluição isotópica do  $N_2O$  é pequena. Então, se o substrato estiver muito enriquecido em  $^{15}N$ , o  $N_2O$  a ser analisado também será altamente enriquecido e poderá contaminar as amostras seguintes da sequência analítica.

#### 4.2.2 - Amostragem dos gases

Foram utilizadas câmaras de volume reduzido que consistiram em frascos de vidro de 5,9 cm de diâmetro, sem fundo e com tampa metálica contendo vedante interno para o fechamento hermético. As tampas possuíam um septo de borracha de bromobutil para a amostragem dos gases. As tampas das câmaras destinadas às medidas de temperatura não possuíam septos, sendo os orifícios fechados com fita adesiva removível para a inserção do termopar (Figura 2a).

A necessidade de confinar o gás no interior de câmaras, para o procedimento de amostragem, altera as condições naturais de ocorrência dos processos biológicos envolvidos na geração dos gases. Mudanças na temperatura do solo podem afetar a produção de  $N_2$  e  $N_2O$ , enquanto as mudanças na temperatura do ar do interior da câmara podem influenciar a concentração do gás, por meio da variação da pressão (ROCHETTE; ERIKSEN-HAMEL, 2008). Para minimizar as variações de temperatura durante o tempo de fechamento, a porção exposta das câmaras foi mantida isolada termicamente, com auxílio de isopor e manta térmica (Figura 2b).



Figura 2 – Medição da temperatura do solo e do interior da câmara, realizada com auxílio de termopar (a); câmaras cobertas com isolante térmico e seringas utilizadas para coleta de  $N_2$  (seringa de insulina) e  $N_2O$  (seringa de 60 mL com válvula de três vias acoplada) (b).

A amostragem dos gases teve início 24 h após a aplicação dos tratamentos e aconteceu no período compreendido entre os dias 3 e 17 de dezembro de 2013. Do dia 3 ao dia 9, as amostragens foram diárias. A partir do dia 9, os gases foram amostrados nos dias 11, 12, 13, 15 e 17 de dezembro. Todas as amostragens foram realizadas entre 10 e 11 h da manhã (horário de verão) após 3 h de fechamento das câmaras. O tempo de fechamento foi definido em teste preliminar, onde foi constatada a linearidade no acúmulo do  $N_2O$ .

Para a determinação de  $N_2$ , foram coletados 0,3 mL de ar com auxílio de seringas de insulina (Figura 2b). As amostras foram injetadas em Exetainers de 12 mL contendo He 6.0 (99,9999% de pureza), imediatamente após serem coletadas. Para a quantificação de  $N_2O$  foram amostrados 60 mL de ar. As seringas utilizadas para  $N_2O$  foram acopladas a uma válvula de três vias e uma agulha hipodérmica (0,7 x 0,3 mm) (Figura 2b). A válvula serviu para aprisionar o gás até a sua concentração na linha de alto vácuo. Durante a amostragem e transporte, as seringas foram mantidas em caixas térmicas. Ao final de cada coleta, as câmaras foram abertas, sendo fechadas apenas na manhã do dia seguinte. A etapa de concentração e transferência do  $N_2O$  foi realizada diariamente, no período da tarde, nas instalações do LIE/CENA/USP.

### 4.2.3 - Preparo das amostras para análise de N<sub>2</sub>O no IRMS

A concentração de N<sub>2</sub>O nas amostras de gás foi realizada conforme descrito no item 3.2.4. Porém, duas modificações importantes foram realizadas na LAV, sendo uma na extremidade de injeção da amostra e a outra na extremidade final da linha.

Para sanar o problema causado pelo fechamento do Exetainer desacoplado à LAV, que permitia a entrada de ar, provocando a sobreposição dos picos de emissão de N<sub>2</sub> atmosférico e N<sub>2</sub>O da amostra, foi confeccionada uma ampola de vidro para receber o N<sub>2</sub>O concentrado (Figura 3a). A ampola de vidro, com a extremidade aberta acoplada à LAV e a extremidade inferior mergulhada na armadilha de N<sub>2</sub> líquido, após receber o N<sub>2</sub>O, foi fechada com auxílio de um maçarico (Figura 3b).

A ampola de vidro foi projetada para ser quebrada dentro do Exetainer, que é o recipiente apropriado ao amostrador automático do IRMS. Dessa forma, não foram necessárias adaptações ao sistema de injeção de amostra gasosa.

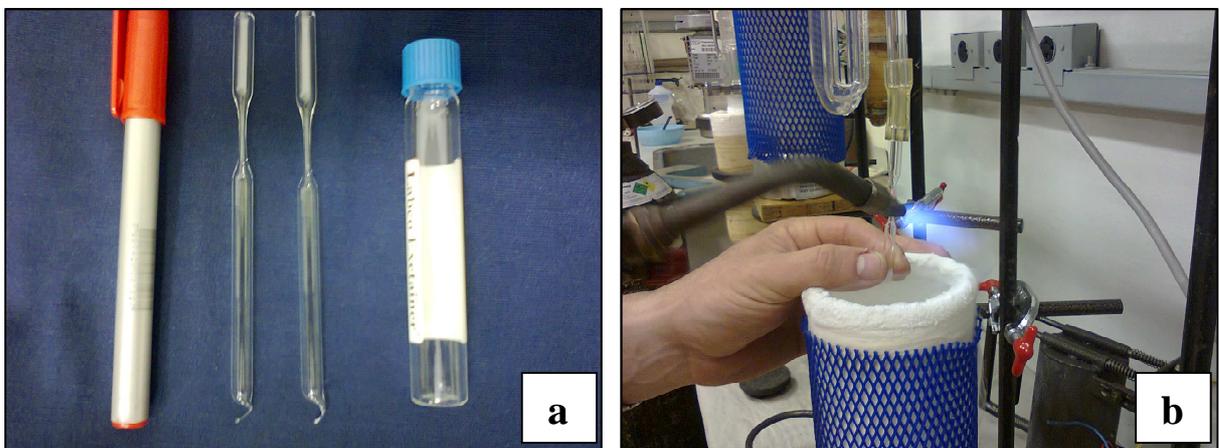


Figura 3 – Ampolas ao lado do Exetainer: base moldada para ser o ponto de ruptura (a); fechamento da ampola, com a parte superior acoplada a LAV e a parte inferior mergulhada na armadilha de N<sub>2</sub> líquido (b).

As ampolas fechadas foram introduzidas em Exetainers, após atingirem o equilíbrio com a temperatura ambiente. Os Exetainers foram fechados com tampa própria (rosqueável e com septo de bromobutil) e foram levados para o amostrador automático do IRMS. Com o auxílio da agulha de duplo orifício do amostrador, foi realizada a substituição do ar do interior

do Exetainer por He 6.0. Após a substituição dos gases, o Exetainer foi agitado bruscamente até a quebra da ampola, liberando o gás para ser analisado.

A expansão do gás contido na ampola, para o ambiente preenchido com He, provocou a explosão de quatro Exetainers. A alta concentração de CO<sub>2</sub> nas amostras foi a possível causa das explosões. A instalação de uma coluna de borossilicato preenchida com Carbosorb, logo após o septo de introdução da amostra na LAV, resolveu o problema (Figura 4). O Carbosorb tem a capacidade de absorver o CO<sub>2</sub>, diminuindo a pressão exercida pelos gases no restante da linha e, conseqüentemente, na ampola.

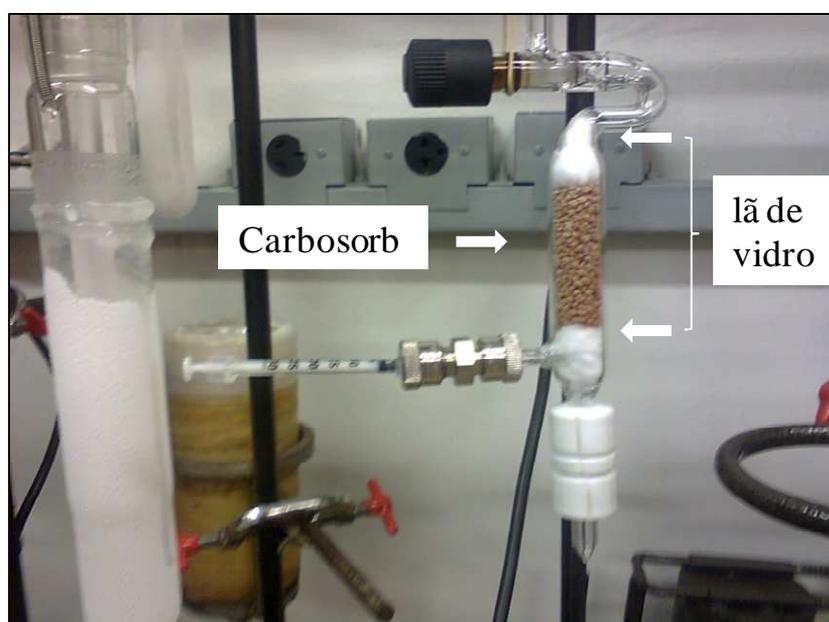


Figura 4 – Injeção de um padrão de N<sub>2</sub>O na LAV. Detalhe da coluna contendo Carbosorb entre camadas de lã de vidro.

Foram adicionados às amostras contidas nos Exetainers, 50 µL de N<sub>2</sub>O extraídos de um cilindro contendo o gás (99,9% de pureza). Considerando a densidade do N<sub>2</sub>O igual a 1,80 µg µL<sup>-1</sup>, foram adicionados 57 µg de N-N<sub>2</sub>O, em cada amostra. A adição de N<sub>2</sub>O objetivou aumentar o número de análises válidas de N<sub>2</sub>O, já que amostras com menos de 10 µg de N-N<sub>2</sub>O apresentam uma baixa intensidade de emissão que compromete a análise isotópica. A adição do N<sub>2</sub>O às amostras não altera o resultado da quantidade de N-N<sub>2</sub>O proveniente do fertilizante, já que o cálculo é baseado na abundância de <sup>15</sup>N do produto da mistura dos gases, natural e enriquecido.

Para avaliar a eficiência da transferência do N<sub>2</sub>O através da LAV, foi realizado um teste comparativo entre dois procedimentos: transferência para Exetainer com pressão equilibrada com He e fechamento desacoplado a LAV (TE); e transferência para ampola de vidro (TA). Em cada procedimento de transferência foram injetados, na LAV, 100 µL de N<sub>2</sub>O (114,55 µg de N-N<sub>2</sub>O). Como procedimento controle (C), 100 µL de N<sub>2</sub>O foram injetados diretamente em Exetainers contendo apenas He. Foram realizadas cinco injeções por procedimento e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,01).

#### 4.2.4 - Análise dos gases

Os gases contidos nos Exetainers foram analisados em um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS), modelo Hydra 20-20 (SerCon Co., UK), interfaceado com um analisador automático de N e C (ANCA-GSL, SerCon Co., UK) e acoplado a um amostrador automático (222 XL Liquid Handler, Gilson). Dois padrões de referência contendo uma mistura de N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O (97,6 µg de N-ar e 114,55 µg de N-N<sub>2</sub>O) foram analisados a cada 16 amostras.

As emissões de N-gás foram calculadas utilizando-se a seguinte equação:

$$Ne = \frac{Na \times Vlc \times Lad}{Va \times \emptyset c \times t}$$

onde:

*Ne*: N emitido na forma de N<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O (g ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>);

*Na*: massa de N na amostra de gás (g);

*Va*: volume da amostra de gás coletada no campo (mL);

*t*: tempo de fechamento da câmara (d);

*Vlc*: volume livre da câmara (mL) (150 mL para os tratamentos com palha e 200 mL para os tratamentos sem palha);

*Lad*: metros de linha adubada por hectare (6.667 metros, considerando o espaçamento de 1,5 m entre linhas);

*∅c*: diâmetro da câmara (m).

Para calcular a emissão de N-N<sub>2</sub> ou N-N<sub>2</sub>O proveniente do fertilizante marcado com <sup>15</sup>N, foi utilizada a equação:

$$Nepf = \frac{(\%^{15}Na - \%^{15}Nar)}{(\%^{15}Nf - \%^{15}Nar)} \times Ne$$

onde:

*Nepf*: N emitido na forma de N<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O proveniente do fertilizante (g ha<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>);

*%<sup>15</sup>Na*: % de <sup>15</sup>N na amostra de gás;

*%<sup>15</sup>Nar*: % de <sup>15</sup>N no ar atmosférico (0,3663 %);

*%<sup>15</sup>Nf*: % de <sup>15</sup>N no fertilizante marcado (10,43% para análise de N<sub>2</sub>O e 98% para análise de N<sub>2</sub>);

- *Ne*: N emitido na forma de N<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O (g ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

A emissão acumulada de N (N<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O) proveniente do fertilizante foi calculada somando-se os valores diários de *Nepf*, medidos e interpolados durante o período de condução do experimento.

#### **4.2.5 - Análise das variáveis relacionadas (precipitação, temperatura do ar e do solo, umidade do solo e teores de nitrato, amônio e carbono lábil do solo)**

A precipitação e a temperatura do ar foram monitoradas durante todo o período de condução do experimento. Os dados foram gerados pelo posto meteorológico de Piracicaba, localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, cujas coordenadas geográficas são: 22° 42’ 30” S e 47° 38’ 00” O.

A temperatura do solo foi medida a 5 cm de profundidade, dentro das câmaras C1. A temperatura da atmosfera interna da câmara foi medida na porção média do espaço livre. As temperaturas foram medidas no momento da coleta dos gases e foi utilizado um termômetro termopar tipo K (modelo HI 935005N, Hanna Instruments). As medições foram realizadas no período de 4 a 9 de dezembro e no dia 11 de dezembro de 2013.

No mesmo período, dentro de cada parcela, foram retiradas amostras de solo de 0 a 10 cm de profundidade para determinação da umidade gravimétrica do solo (diferença

entre o peso fresco e o peso seco do solo, após ter permanecido em estufa a 105 °C até peso constante). Os valores da umidade gravimétrica foram convertidos em espaço poroso preenchido por água (EPPA) utilizando-se a fórmula:

$$EPPA(\%) = \frac{\text{umidade gravimétrica} (\%) \times \text{densidade do solo}}{1 - \frac{\text{densidade do solo}}{\text{densidade de partículas}}}$$

onde a densidade do solo (1,42 g cm<sup>-3</sup>) foi calculada pelo método do anel volumétrico (EMBRAPA, 1997) e a densidade de partículas (2,71 g cm<sup>-3</sup>), pelo método do balão volumétrico (EMBRAPA, 1997).

Nos dias 4, 6, 9 e 17 de dezembro, foram realizadas amostragens de solo (0 a 10 cm) para análise de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e C lábil. As amostras foram coletadas na linha de adubação de cada parcela. Em cada amostragem, foram retiradas duas amostras simples para a formação de uma amostra composta. Logo após a homogeneização das amostras simples, a amostra composta foi acondicionada em saco plástico e depois em recipiente térmico contendo gelo. As amostras foram mantidas a -15°C até a realização das análises.

Para extrair as formas inorgânicas de N, foi utilizado o extrator KCl 2 mol L<sup>-1</sup>, em uma relação solo:extrator igual a 1:5. A mistura solo e extrator foi agitada por uma hora em agitador horizontal e, em seguida, foi filtrada em papel filtro quantitativo (faixa azul). Os extratos obtidos foram analisados por meio de sistema de análise por injeção em fluxo (FIA – *flow injection analysis*). O N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado pelo método espectrofotométrico, conforme descrito por Giné et al. (1980), e o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por condutividade, após a formação da amônia em meio alcalino, conforme descrito por Reis, Vieira e Krug (1997). No momento da extração, subamostras foram secas a 105 °C até peso constante, sendo os resultados de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> expressos com base na massa de solo seco.

Para as determinações de C lábil, as amostras foram retiradas do freezer a -15 °C e foram secas ao ar. Após a secagem, subamostras foram finamente moídas em moinho de bola (menor que 150 µm). As amostras moídas foram pesadas (2,5 g) e colocadas em tubos de centrífuga de 50 mL. Aos tubos contendo o solo foram adicionados 2mL da solução de KMnO<sub>4</sub> (0,2 mol L<sup>-1</sup>) e 18 mL de água desionizada. Os tubos foram agitados por 2 min a 240 oscilações por min. Após agitação, os tubos foram abertos e deixados em ambiente escuro por 10 min. Passados os 10 min, 0,5 mL foram retirados do sobrenadante e colocados em

outro tubo de centrífuga contendo 49,5 mL de água desionizada. Os tubos foram fechados e invertidos para homogeneizar a solução que foi levada ao espectrofotômetro de absorção molecular para serem lidas no comprimento de onda de 550 nm, conforme Weil et al. (2003).

Os dados das emissões acumuladas foram testados quanto à normalidade e, por não seguirem uma distribuição normal, foram transformados, utilizando o método de transformação Box-Cox (SAS, versão 9.2). Após as transformações, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **4.3 - Resultados e Discussão**

#### **4.3.1 - Eficiência da transferência de N<sub>2</sub>O através da linha de alto vácuo**

Embora a transferência das amostras de N<sub>2</sub>O da LAV para as ampolas de vidro (TA) tenha sido mais trabalhosa, o procedimento foi mais eficiente, não diferindo do procedimento controle (C), que consistiu da injeção da mesma quantidade de N-N<sub>2</sub>O diretamente nos Exetainers (Tabela 1). O maior tempo demandado para a transferência do gás da LAV para a ampola, comparado à transferência para o Exetainer (TE), foi compensado pela ausência da necessidade de corrigir, a cada análise, a janela de integração dos picos, pois na TA não houve sobreposição de N-N<sub>2</sub> e N-N<sub>2</sub>O (Figura 5). A sobreposição dos picos observada em TE (Figura 5c) foi devida à entrada de ar durante o fechamento do Exetainer, que necessita ser desacoplado da LAV para receber a tampa.

Tabela 1 - Média e coeficiente de variação da massa de N-N<sub>2</sub>O determinada em espectrômetro de massas de razão isotópica, após transferência da amostra de gás em linha de alto vácuo, utilizando diferentes procedimentos<sup>(1)</sup>.

Procedimento	Média <sup>(2)</sup>	C.V.
	µg	%
Controle (C): injeção direta de N <sub>2</sub> O no Exetainer	116,32 a	2,54
Transferência para ampola de vidro (TA)	110,21 a	3,16
Transferência para Exetainer (TE)	80,62 b	7,23

<sup>(1)</sup> Massa de N-N<sub>2</sub>O injetada na linha de alto vácuo ou diretamente no Exetainer: 114,55 µg. <sup>(2)</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferiram pelo teste de Tukey (p < 0,01). (n = 5).

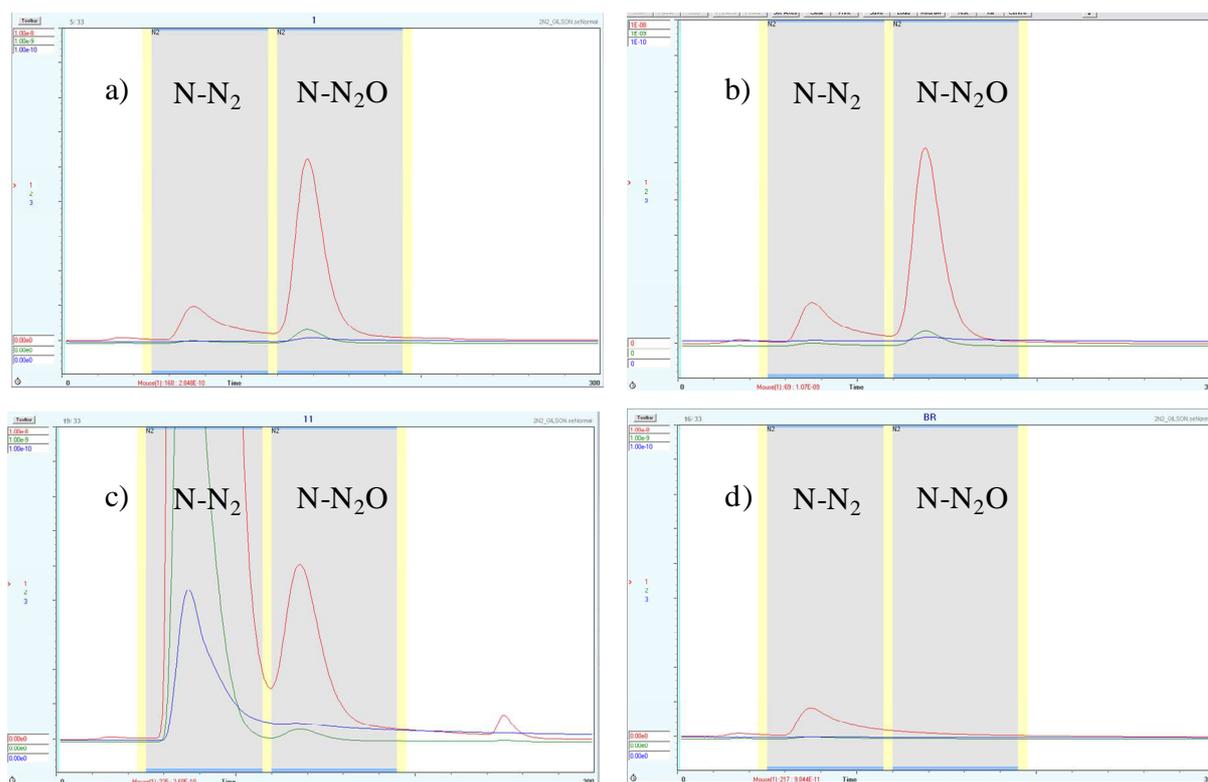


Figura 5 - Diagrama de exibição da tela do espectrômetro de massas de razão isotópica. Linha vermelha (escala  $1,0 \times 10^{-8}$ ): intensidade de emissão dos íons de m/z 28; linha verde (escala  $1,0 \times 10^{-9}$ ): intensidade de emissão dos íons de m/z 29; linha azul (escala  $1 \times 10^{-10}$ ): intensidade de emissão dos íons de m/z 30. a) Controle – amostra injetada diretamente no Exetainer; b) TA: amostra injetada na linha de alto vácuo com transferência para ampola de vidro; c) TE: amostra injetada na linha de alto vácuo com transferência para Exetainer; d) teste em branco

### 4.3.2 - Variáveis relacionadas

Entre os dias 2 e 17 de dezembro, período entre a aplicação dos tratamentos e o último dia de coleta das amostras de gás, ocorreram quatro eventos de precipitação, tendo a máxima de 44,3 mm, ocorrida no terceiro dia após a aplicação dos tratamentos (Figura 6). Durante o período de condução do experimento choveu 66,8 mm, que corresponderam a 55,2% do volume chovido no mês de dezembro. A precipitação ocorrida no mês foi menor que a precipitação média medida desde 1917, que é de 199,6 mm (dados obtidos do Posto Meteorológico de Piracicaba, SP). Apesar disso, o volume de chuva, juntamente com o volume de água e vinhaça aplicado no experimento, permitiu a manutenção da umidade do solo na faixa de 60 a 80% do espaço poroso preenchido por água (EPPA), nos tratamentos sem palha e 70 a 80% nos tratamentos com palha (Figura 7).

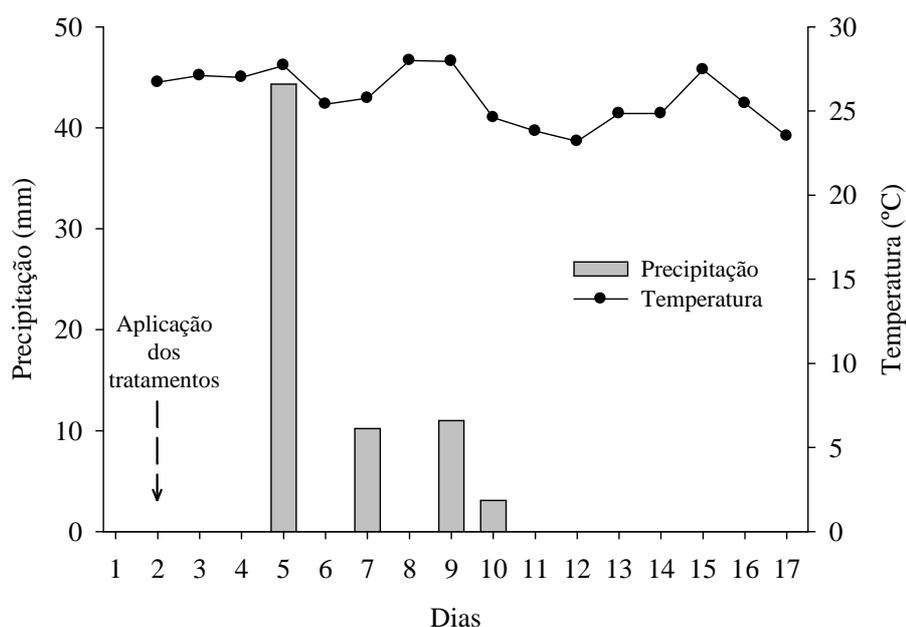


Figura 6 - Precipitação e temperatura média do ar na região de condução do experimento (período de 2 a 17 de dezembro de 2013).

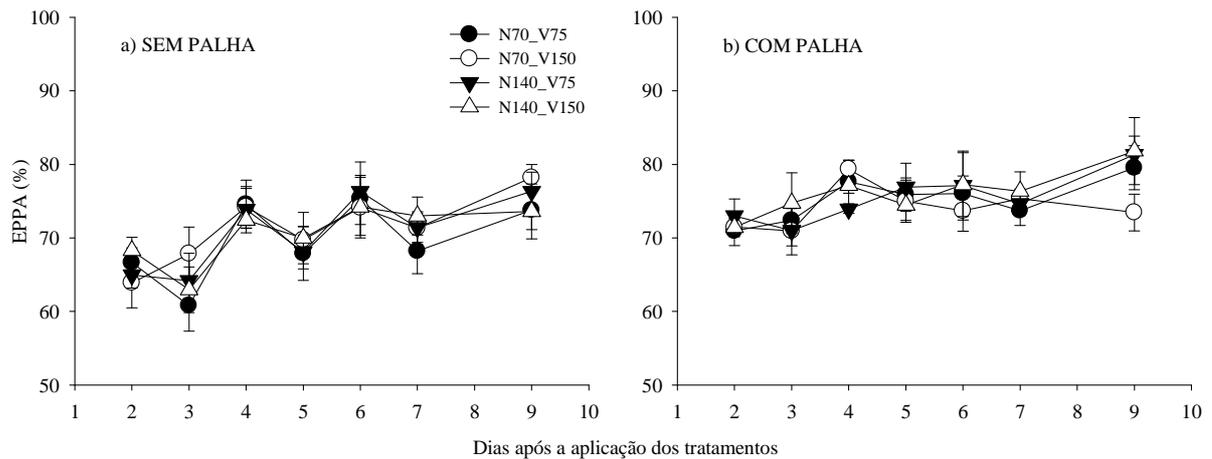


Figura 7 - Espaço poroso preenchido por água (EPPA) na profundidade de 0-10 cm, em solo sem palha (a) e com palha de cana-de-açúcar (b). N70 e N140: doses de 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; V75 e V150: doses de 75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=4).

A temperatura do ar variou de 23,2 a 28 °C, sendo 25,8 °C a média do período (Figura 6). Dessa forma, tanto a temperatura do ar quanto a precipitação ocorrida no mês de dezembro mantiveram o solo da área experimental em condições de temperatura e umidade favoráveis aos processos de nitrificação e desnitrificação (GRANLI; BOCKMAN, 1994; DALAL et al., 2003).

A utilização de câmaras confeccionadas em vidro e com volume reduzido poderia ter criado um ambiente com temperaturas muito mais elevadas que as do meio externo. Entretanto, as temperaturas medidas no interior das câmaras variaram conforme as variações diárias das temperaturas externas (Figuras 8 e 9). A temperatura do ar no interior das câmaras foi, em média, 2° C acima da temperatura do solo, também medida no interior das câmaras a 5 cm de profundidade. Esses resultados mostram que o recobrimento das câmaras com o isolante térmico foi efetivo, não comprometendo os processos de nitrificação e desnitrificação.

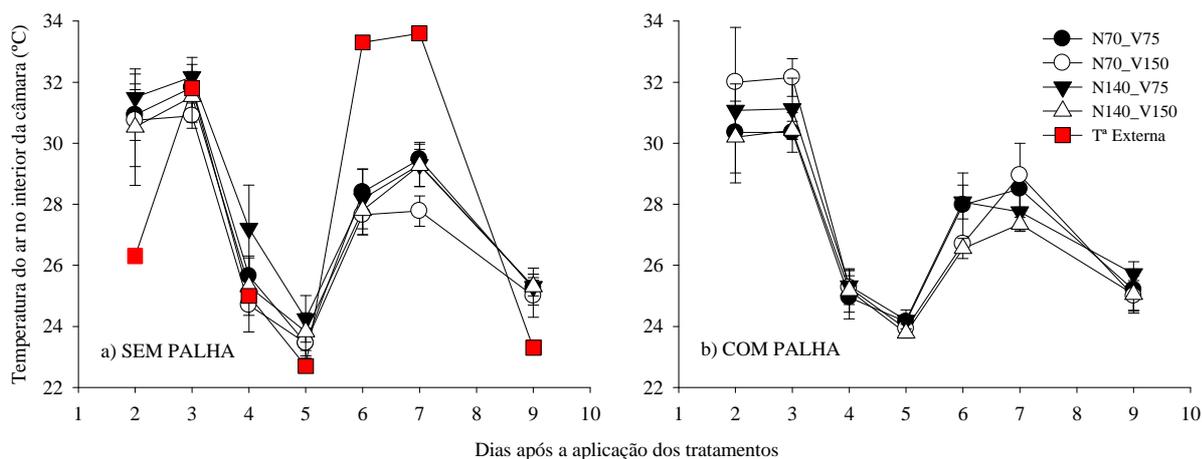


Figura 8 - Temperatura do ar no interior da câmara para solo sem palha (a) e com palha de cana-de-açúcar (b). N70 e N140: doses de 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; V75 e V150: doses de 75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça; Tª Externa: temperatura do ar medida fora da câmara no momento da coleta dos gases. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

A temperatura do ar no interior das câmaras foi semelhante em todos os tratamentos, indicando que a cobertura do solo com palha não influenciou a temperatura da atmosfera interna das câmaras (Figura 8). Com relação à temperatura do solo, as variações térmicas foram menores nos tratamentos com palha, embora não muito expressivas (Figura 9).

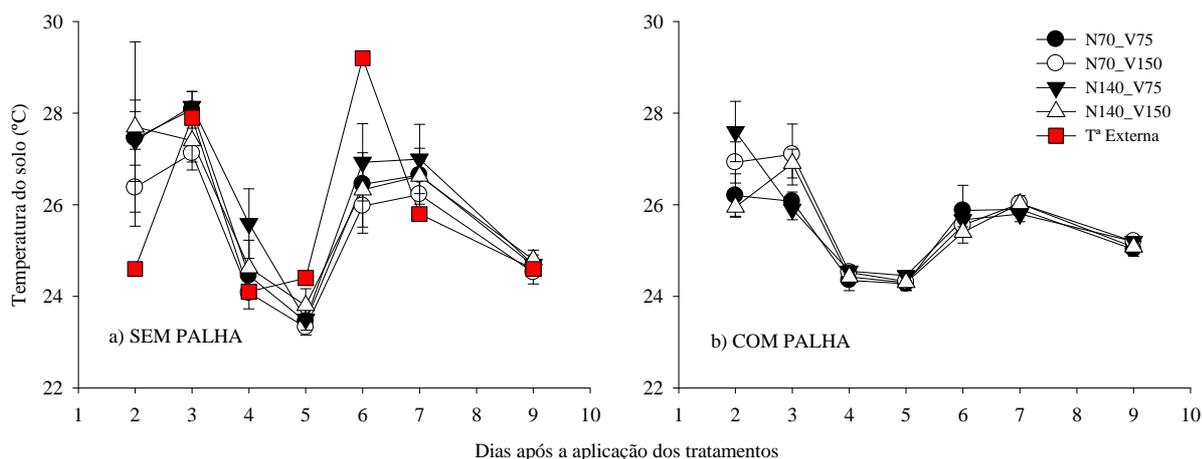


Figura 9 - Temperatura do solo no interior da câmara, medida a 5 cm de profundidade, para solo sem palha (a) e com palha de cana-de-açúcar (b). N70 e N140: doses de 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; V75 e V150: doses de 75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça; Tª Externa: temperatura do solo externo à câmara medida a 5 cm de profundidade em área sem palha. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

Os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 10) e  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 11) foram avaliados ao longo do experimento e apresentaram variação mais acentuada da segunda para a terceira amostragem, possivelmente devida à precipitação ocorrida entre os dias de amostragem. Além da chuva, que pode ter provocado a lixiviação do  $\text{NO}_3^-$ , os processos de nitrificação e desnitrificação geralmente são mais intensos nos primeiros dias após a aplicação da fonte nitrogenada e podem ter transformado o N mineral em formas gasosas. Como não foi observado o aumento no teor de nitrato com a diminuição do teor de amônio, pode-se supor que a desnitrificação somada à lixiviação do  $\text{NO}_3^-$  foram superiores à nitrificação.

Os teores de N mineral nos tratamentos com palha foram, de maneira geral, menores que nos tratamentos sem palha. A palha pode ter atuado como uma barreira física, impedindo o contato do fertilizante com o solo. A partir da terceira amostragem, realizada sete dias após a aplicação dos tratamentos, os teores de N mineral mantiveram-se praticamente constantes.

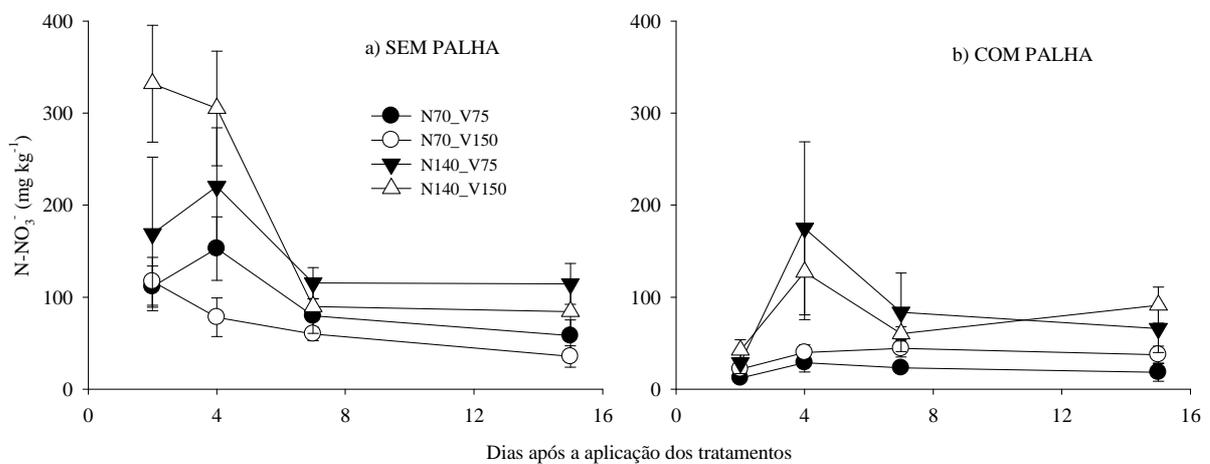


Figura 10 – Teor de  $\text{N-NO}_3^-$  do solo amostrado na linha de adubação (0 a 10 cm) para solo sem palha (a) e com palha de cana-de-açúcar (b). N70 e N140: doses de 70 e 140  $\text{kg ha}^{-1}$  de N na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; V75 e V150: doses de 75 e 150  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de vinhaça. Barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 4$ ).

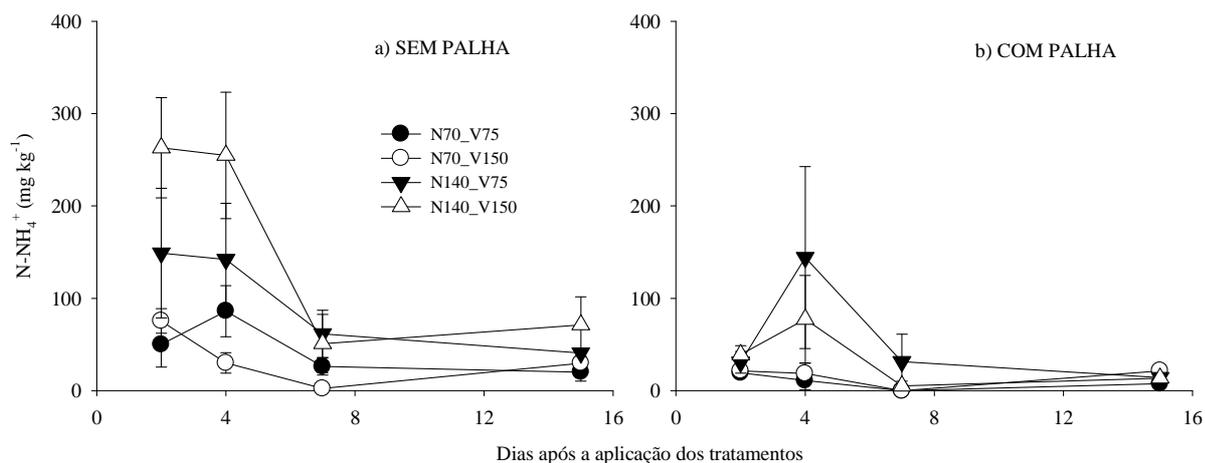


Figura 11 - Teor de  $N-NH_4^+$  do solo amostrado na linha de adubação (0 a 10 cm) para solo sem palha (a) e com palha de cana-de-açúcar (b). N70 e N140: doses de 70 e 140  $kg\ ha^{-1}$  de N na forma de  $NH_4NO_3$ ; V75 e V150: doses de 75 e 150  $m^3\ ha^{-1}$  de vinhaça. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

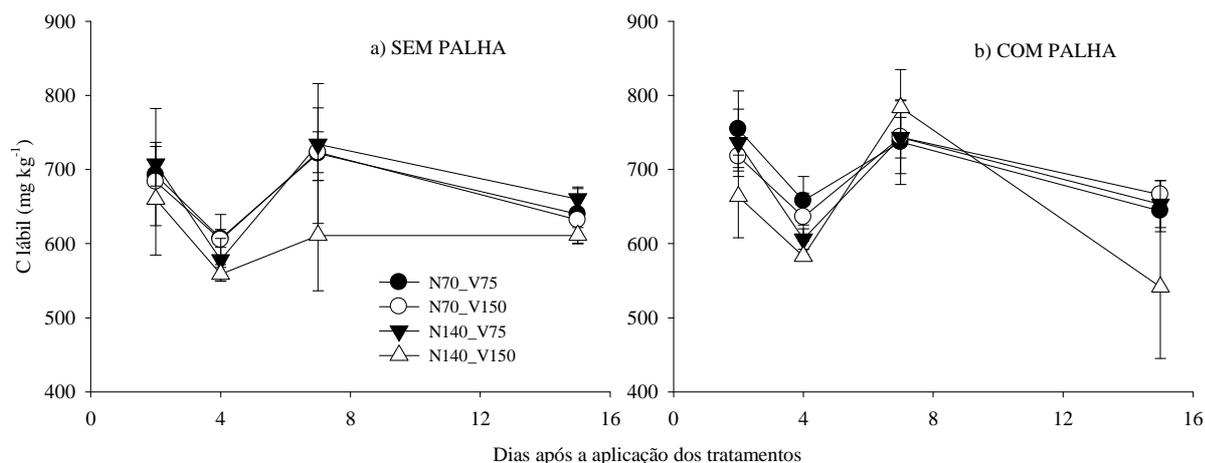


Figura 12 - Teor de C lábil do solo amostrado na linha de adubação (0 a 10 cm), para solo sem palha (a) e com palha de cana-de-açúcar (b). N70 e N140: doses de 70 e 140  $kg\ ha^{-1}$  de N na forma de  $NH_4NO_3$ ; V75 e V150: doses de 75 e 150  $m^3\ ha^{-1}$  de vinhaça. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

A dinâmica do C lábil ao longo do experimento foi semelhante entre os tratamentos sem e com palha, possivelmente pelo curto período entre a remoção da palha e as amostragens. Os teores de C lábil obtidos pelo método do  $KMnO_4$  (WEIL et al., 2003) mostraram pequenas variações entre os tratamentos. Esperava-se que os tratamentos que receberam a maior dose de vinhaça (V150), apresentassem maior teor de C lábil, mas isso não foi constatado.

Shang e Tiessen (1997) propuseram a concentração de  $0,033 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KMnO}_4$  para oxidar o C lábil em Latossolos. A adoção do método de oxidação do C com uma solução de  $\text{KMnO}_4$  menos concentrada ( $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ) objetivou aumentar a sensibilidade para quantificar o C prontamente assimilável para os microrganismos e, assim, detectar a diferença entre os teores de C lábil dos tratamentos com as doses  $75$  e  $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de vinhaça. A estratégia parece não ter surtido efeito, pois a maior entrada de C no solo pela maior dose de vinhaça não foi constatada.

Apesar das variações nos teores de N mineral e C lábil, os mesmos se mantiveram em níveis suficientes aos processos de nitrificação e desnitrificação, principalmente nos primeiros dias após a aplicação dos tratamentos (DRURY; MCKENNEY; FINDLAY, 1991; LIU et al., 2007; SMITH et al., 2012). A presença ou não de palha e a variação nas doses de vinhaça não aumentaram a disponibilidade de N mineral e nem de C lábil, conforme a estratégia de amostragem e a análise dessas variáveis.

### **4.3.3 - Emissões**

#### **4.3.3.1 - Emissões de $\text{N}_2$ proveniente do fertilizante**

Os fatores climáticos, as características do solo e a população de microrganismos envolvidos nos processos de geração dos gases  $\text{N}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$  provocam uma grande variabilidade espacial e temporal nas emissões (MATHIEU et al., 2006). Neste experimento, os fatores climáticos e as condições do solo (umidade, temperatura, teores de N e C lábil) da pequena área experimental ( $297 \text{ m}^2$ ) foram propícios a ocorrência dos processos de nitrificação e desnitrificação. Dessa forma, com o auxílio da espectrometria de massas de razão isotópica, esperava-se detectar tanto as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  quanto as de  $\text{N}_2$  e, assim, de maneira direta, com o uso do método do traçador  $^{15}\text{N}$ , contabilizar as perdas de N- $\text{N}_2$  e N- $\text{N}_2\text{O}$  provenientes do  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  enriquecido com  $^{15}\text{N}$ . Durante os 17 dias seguintes à aplicação do fertilizante nitrogenado e da vinhaça, nenhuma emissão de  $\text{N}_2$  foi detectada, mesmo tendo sido aplicado um fertilizante com 98% em átomos de  $^{15}\text{N}$ .

No experimento conduzido em janeiro do mesmo ano e descrito no capítulo anterior, também não foram detectadas emissões de  $N_2$ . Como a não detecção do gás foi recorrente, é seguro afirmar que os microrganismos desnitrificadores não reduziram o  $N_2O$  a  $N_2$ , provavelmente pela ausência da enzima redutase do óxido nitroso e não pela falta de condições ambientais para a ativação da mesma. Os fungos desnitrificadores e cerca de um terço das bactérias desnitrificadoras já sequenciadas não sintetizam a enzima redutase do óxido nitroso, o que torna o  $N_2O$  o produto final da desnitrificação em muitos ecossistemas (KOBAYASHI et al., 1996; PHILIPPOT et al., 2011).

#### 4.3.3.2 - Emissões de $N_2O$ proveniente do fertilizante

As emissões acumuladas de  $N_2O$  não apresentaram distribuição normal e foram transformadas ( $\ln(N_2O)$ ) antes da aplicação do teste de Tukey. De acordo com a análise de variância (ANOVA), não foram observadas interações entre os fatores e, apenas o fator isolado palha (P) apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo as emissões dos tratamentos com palha (P11), superiores as dos tratamentos sem palha (P0) (Figura 13).

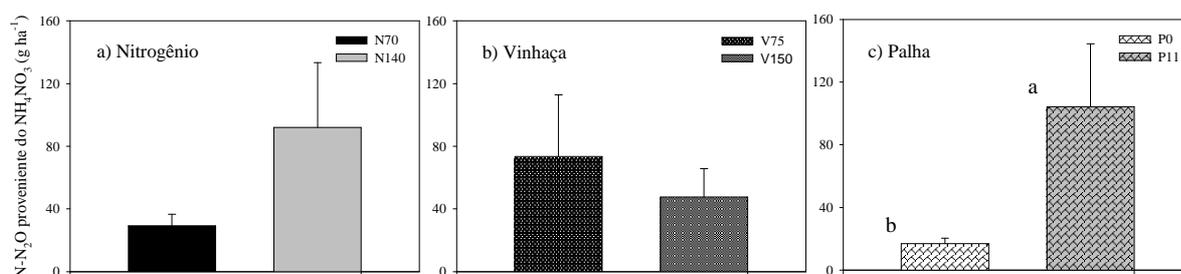


Figura 13 –Emissões acumuladas de  $N-N_2O$  proveniente do  $NH_4NO_3$  duplamente marcado com 10,43% em átomos de  $^{15}N$ . (a) N70 e N140: doses de 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> de N; (b) V75 e V150: doses de 75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça; (c) P0 e P11: solo sem palha e coberto com 11 Mg ha<sup>-1</sup> de palha. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os níveis dos fatores ( $p < 0,05$ ).

É possível que a cobertura morta tenha diminuído as variações na temperatura e na umidade do solo ao longo do dia, principalmente na camada superficial, propiciando um ambiente mais favorável ao desenvolvimento das populações de microrganismos geradores de  $N_2O$ . Como as medições de temperatura e umidade foram realizadas somente uma vez por dia, essas variações não foram percebidas. Vargas et al. (2014) também encontraram maiores emissões em solo incubado com palha de cana-de-açúcar ( $16 \text{ Mg ha}^{-1}$ ) a mesma capacidade de retenção de água dos tratamentos sem palha, e atribuíram o resultado à mineralização do N e à labilidade do C da palha. No presente estudo, as análises de N mineral e de C lábil não indicaram diferenças entre os tratamentos que pudessem ser responsabilizadas pela maior emissão de  $N_2O$  nos tratamentos com palha.

As maiores emissões de  $N_2O$  aconteceram no quarto dia após a aplicação dos tratamentos, exceto no tratamento com palha N140\_V75, cuja máxima foi observada no quinto dia (Figura 14). Normalmente, as emissões máximas ocorrem nos primeiros dias após a aplicação da fonte nitrogenada, estando o solo com as demais condições propícias à ocorrência dos processos geradores dos gases (LIU et al., 2007). A nitrificação é um processo de ocorrência comum no solo e inicia-se logo após a aplicação da fonte nitrogenada. A desnitrificação, por sua vez, necessita de condições anaeróbias para ativar as quatro enzimas responsáveis pela redução do  $NO_3^-$  a  $N_2$ . As enzimas, redutase do nitrato (Nar), redutase do nitrito (Nir), redutase do óxido nítrico (Nor) e redutase do óxido nitroso (Nos), são ativadas em sequência, sendo a Nar ativada entre 2 e 3 h, a Nir entre 2 e 12 h e a Nor entre 24 e 48 h (HOLTAN-HARTWIG; DÖRSH; BAKKEN, 2000). O tempo necessário para a ativação das enzimas ajuda a explicar o intervalo existente entre a aplicação da fonte nitrogenada e as emissões de  $N_2O$  (Figura 14).

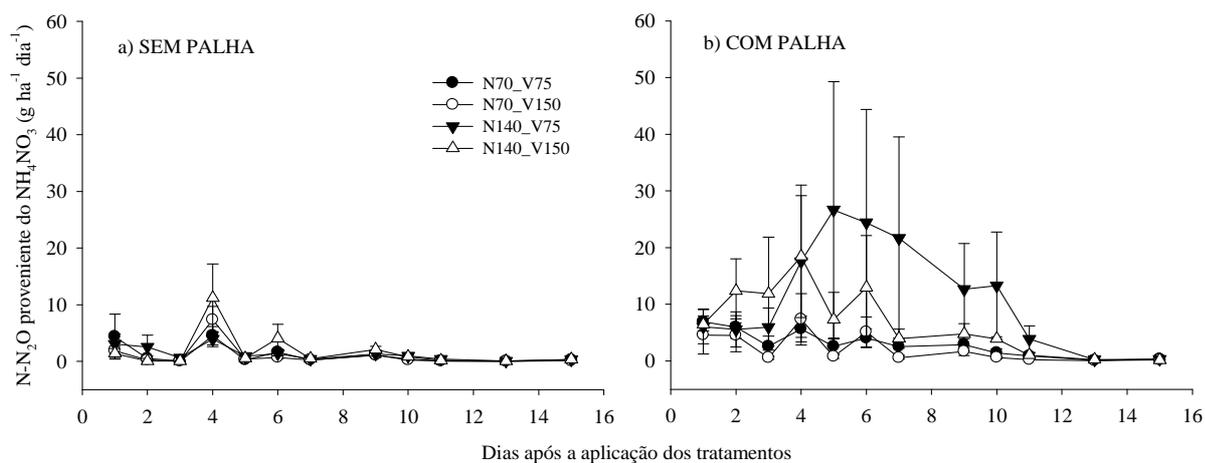


Figura 14 - Emissões de N-N<sub>2</sub>O derivado do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> duplamente marcado com 10,43% em átomos de <sup>15</sup>N. N70 e N140: 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> de N; V75 e V150: 75 e 150 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça; sem (a) e com palha (b). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 4).

O elevado desvio padrão da média das emissões diárias (Figura 14) indica uma grande variabilidade espacial que, segundo Mathieu et al. (2006), é comum nos estudos de emissão de gases a partir dos solos. A complexidade das interações dos fatores envolvidos nos processos geradores dos gases torna difícil o entendimento das condições ideais para a ocorrência das emissões. No presente estudo, nenhum fator relacionado às emissões apresentou correlação significativa com a emissão de N<sub>2</sub>O (Figuras 15 e 16). Isso pode ser explicado pelo fato dos níveis dos fatores estudados terem sido propícios aos processos de nitrificação e desnitrificação, durante todo o período de amostragem.

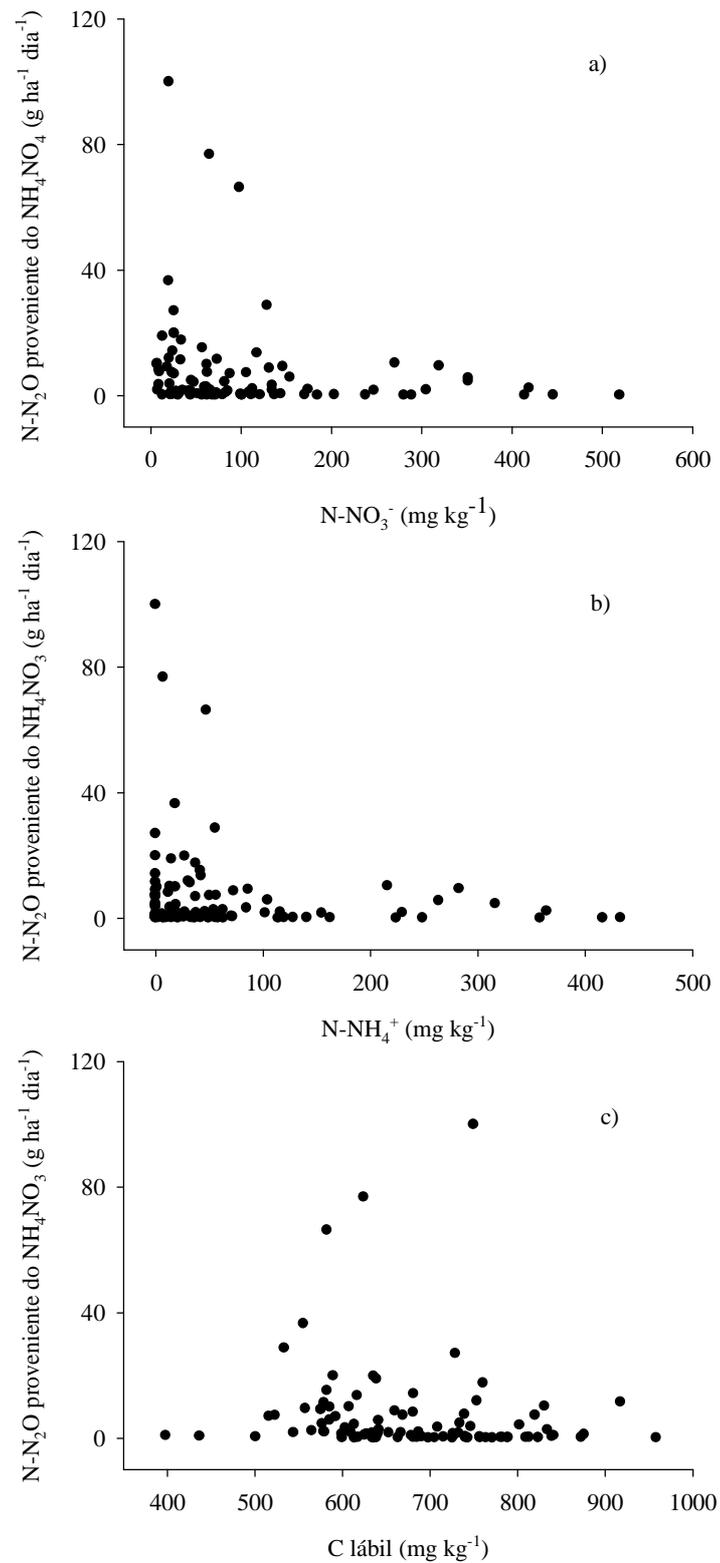


Figura 15 – Relações entre os teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (b) e C lábil (c) e as quantidades emitidas de N-N<sub>2</sub>O proveniente do fertilizante, observadas nos diferentes tratamentos e dias de amostragens.

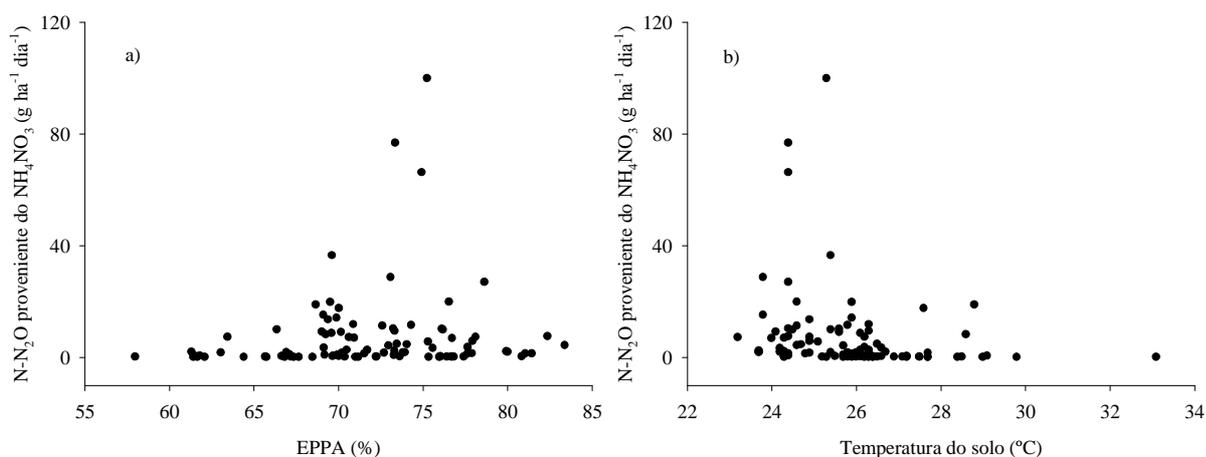


Figura 16 - Relações entre a porcentagem de espaço poroso preenchido com água (EPPA) (a) e temperatura do solo (b) e as quantidades emitidas de  $N-N_2O$  proveniente do fertilizante, observadas nos diferentes tratamentos e dias de amostragens.

#### 4.3.3.3 - Fator de Emissão

O fator de emissão (FE) calculado para os tratamentos com diferentes níveis de nitrogênio, vinhaça e palha ficaram bem abaixo do valor sugerido pelo IPCC (2006) para estimar as perdas de  $N-N_2O$  proveniente do fertilizante (Tabela 2). O IPCC sugere que 1% do N-fertilizante é perdido como  $N-N_2O$ . Este valor tem sido muito contestado, pois não leva em consideração a complexidade dos fatores envolvidos nos processo geradores do  $N_2O$ .

Os baixos valores encontrados neste estudo ratificaram os valores encontrados no estudo realizado no mês de janeiro de 2013, em área vizinha. Embora tenham sido testadas outras fontes de variação e outros níveis, este estudo também apresentou valores de FE inferiores aos trabalhos realizados com cana-de-açúcar no Brasil, mas que utilizaram a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons para estimar as perdas de  $N-N_2O$  (CARMO et al., 2013; SIGNOR; CERRI; CONANT, 2013; PAREDES et al., 2014).

O isolamento térmico das câmaras de vidro de volume reduzido; os diferentes níveis de enriquecimento da fonte nitrogenada para a análise, concomitante, de  $N_2O$  e  $N_2$ ; o sistema de transferência das amostras concentradas em  $N_2O$ , da LAV para as ampolas de vidro e a adição de padrão nas amostras de  $N_2O$  foram modificações importantes que melhoraram o protocolo de coleta e mensuração dos gases. Entretanto, o alto limite de detecção do IRMS

para as análises de  $N_2O$  sugere que, em condições de campo, o método do traçador  $^{15}N$  seja utilizado em períodos de maior probabilidade de ocorrência das emissões, ou seja, logo após a aplicação das fontes nitrogenadas e dos eventos de precipitação.

Tabela 2 – Fator de emissão de  $N_2O$  (FE), na cultura da cana-de-açúcar (ciclo cana soca) de acordo com as doses de N e vinhaça e a presença ou não de cobertura com palha, na localidade de Piracicaba, SP.

Nitrogênio <sup>(1)</sup>	Vinhaça	Palha	FE
kg ha <sup>-1</sup>	m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>	Mg ha <sup>-1</sup>	(%)
70	75	0	0,02
70	75	11	0,07
70	150	0	0,02
70	150	11	0,05
140	75	0	0,01
140	75	11	0,15
140	150	0	0,02
140	150	11	0,08

<sup>(1)</sup> N na forma de  $NH_4NO_3$  duplamente marcado com 10,43% de átomos de  $^{15}N$ .

#### 4.4 – Conclusões

1. Não foram detectadas emissões de  $N_2$  provenientes do nitrato de amônio duplamente marcado com 98% em átomos de  $^{15}N$ ;
2. A manutenção da palha da cana-de-açúcar intensificou as emissões de  $N_2O$  proveniente do fertilizante;
3. A umidade e a temperatura do solo e os teores de nitrato, amônio e carbono lábil não apresentaram correlações significativas com as emissões de  $N_2O$ ;
4. Os fatores de emissão de  $N_2O$  nos diferentes tratamentos foram inferiores a 0,2%.

## Referências

- BAGGS, E. M.; SMALES, C. L.; BATEMAN, E. J. Changing pH shifts the microbial source as well as the magnitude of N<sub>2</sub>O emission from soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p.793-805, 2010.
- BAILY, A.; WATSON, C. J.; LAUGHLIN, R.; MATTHEWS, D.; McGEOUGH, K.; JORDAM, P. Use of the <sup>15</sup>N gas flux method to measure the source and level of N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions from grazed grassland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 94, n. 2-3, p. 287-298, 2012.
- CARMO, J. B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L. C.; SOUZA NETO, E. R.; PITOMBO, L. M.; 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, n. 3, p. 267-280, 2013.
- CHAPUIS-LARDY, L.; WRAGE, N.; METAY, A.; CHOTTE, J.; BERNOUX, M. Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. **Global Change Biology**, Oxford, v. 13, p. 1-17, 2007.
- CUHEL, J.; SIMEK, M.; LAUGHLIN, R. J.; BRU, D.; CHÈNEBY, D.; WATSON, C. J.; PHILIPPOT, L. Insights into the effect of soil pH on N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions and denitrifier community size and activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, n. 6, p. 1870-1878, 2010.
- DANNENMANN, M.; BUTTERBACH-BAHL, K.; GASHE, R.; WILLIBALD, G.; PAPEN, H. Dinitrogen emissions and the N<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>O emission ratio of Rendzic Leptosol as influenced by pH and forest thinning. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2317-2323, 2008.
- DALAL, R. C.; WANG, W.; ROBERTSON, G. P.; PARTON, W. J. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, p. 165-195, 2003.
- DRURY, C. F.; MCKENNEY, D. J.; FINDLAY, W. I. Relationships between denitrification microbial biomass and indigenous soil properties. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 751-755, 1991.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPS, 1997. 212 p.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.
- GALDOS, M. V.; CERRI, C. C.; LAL, R.; BERNOUX, M.; FEIGL, B.; CERRI, C. E. P. Net greenhouse gas fluxes in Brazilian ethanol production systems. **Global Change Biology Bioenergy**, Oxford, v. 2, p. 37-44, 2010. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01037.x.
- GRANLI, T.; BOCKMAN, O. C. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission from soils in warm climates. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 159-163, 1995.

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

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 54, p. 33-45, 2008.

HIGGINS, S.; LAUGHLIN, R. J.; WATSON, C. J. Antecedent effect of lime on nitrous oxide and dinitrogen emissions from grassland soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 95, p. 219-229, 2013.

HOLTAN-HARTWIG, L.; DÖRSH, P.; BAKKEN, L. R. Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{N}_2\text{O}$  reduction. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 833-843, 2000.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Guidelines for national greenhouse gas inventories: Agriculture, Forestry and Other Land Use**. Hayama: National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006. v. 4. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>>. Acesso em: 10 out. 2013.

JANTALIA, C. P.; DOS SANTOS, H. P.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 82, p. 161-173, 2008.

KHALIL, K.; MARY, B.; RENAULT, P. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by  $\text{O}_2$  concentration. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 687-699, 2004.

KOBAYASHI, M.; MATSUO, Y.; TAKIMOTO, A.; SUZUKI, S.; MARUO, F.; SHOUNS H. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 16263-16267, 1996.

LIU, X. J.; MOSIER, A. R.; HALVORSON, A. D.; REULE, C. A.; ZHANG, F. S. Dinitrogen and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in arable soil: Effect of tillage, N source and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2362-2370, 2007.

MATHIEU, O.; LÉVÊQUE, J.; HÉNAULT, C.; MILLOX, M.J.; BIZOUARD, F.; ANDREUX, F. Emission and spatial variability of  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with  $^{15}\text{N}$  isotopic techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 941-951, 2006.

MORLEY, N.; BAGGS, E. M. Carbon and oxygen controls on  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  production during nitrate reduction. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1864-1871, 2010.

MORSE, J. L.; BERNHARDT, E. S. Using  $^{15}\text{N}$  tracers to estimate  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emissions from nitrification and denitrification in coastal plain wetlands under contrasting land-uses. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 57, p. 635-643, 2013.

NYKO, D.; VALENTE, M. S.; MILANEZ, A. Y.; TANAKA, A. K. R.; RODRIGUES, A. V. P. A evolução das tecnologias agrícolas do setor sucroenergético: estagnação passageira ou crise estrutural? **BNDES Setorial. Bioenergia**, Rio de Janeiro, n. 37, p. 399-442, 2013.

PAREDES, D. S.; LESSA, A. C. R.; SANT'ANNA, S. A. C.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 98, p. 41-55, 2014.

PHILIPPOT, L.; ANDERT, J.; JONES, C. M.; BRU, D.; HALLIN, S. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. **Global Change Biology**, Oxford, v. 17, p. 1497-1504, 2011.

REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; KRUG, F. J. Development of a flow injection system with two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.8, n. 5, p. 523-528, 1997.

ROCHETTE, P.; ERIKSEN-HAMEL, N. S. Chamber measurements of soil nitrous oxide flux: are absolute values reliable? **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 72, p. 331-342, 2008.

SAGGAR, S.; JHA, N.; DESLIPPE, J.; BOLAN, N. S.; LUO, J.; GILTRAP, D. L.; KIM, D. G.; ZAMAN, M.; TILLMAN, R. W. Denitrification and N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: Process, measurements, modeling and mitigating negative impacts. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 465, p. 173-195, 2013.

SCHEER, C.; WASSMANN, R.; BUTTERBACH-BAHL, K.; LAMERS, J. P. A.; MARTIUS, C. The relationship between N<sub>2</sub>O, NO, and N<sub>2</sub> fluxes from fertilized and irrigated dryland soils of the Aral Sea Basin, Uzbekistan. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 314, p. 273-283, 2009.

SHANG, C.; TIESSEN, H. Organic matter lability in a tropical Oxisol: evidence from shifting cultivation, chemical oxidation, particle size, density, and magnetic fractionations. **Soil Science**, New Brunswick, v. 162, p. 795-807, 1997.

SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P.; CONANT, R. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

SMITH, K. A.; DOBBIE, K. E.; THORMAN, R.; WATSON, C. J.; CHADWICK, D. R.; YAMULKI, S.; BALL, B. C. The effect of N fertilizer forms on nitrous oxide emissions from UK arable land and grassland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 93, p. 127-149, 2012.

STEVENS, R.J.; LAUGHLIN, R.J.; MALONE, J.P. Measuring the mole fraction and source of nitrous oxide in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 541-543, 1998.

THORBURN, P. J.; MEIER, E. A.; COLLINS, K.; ROBERTSON, F. A. Changes in soil carbon sequestration, fractionation, and soil fertility in response to sugarcane residues retention are site specific. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 120, p. 99-111, 2012.

VARGAS, V. P.; CANTARELLA, H.; MARTINS, A. A.; SOARES, J. R.; CARMO, J. B.; ANDRADE, C. A. Sugarcane crop residue increases N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> emissions under high soil moisture conditions. **Sugar Technology**, New Delhi, v. 16, n. 2, p. 174-179, 2014.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; CANTARELLA, H.; FRANCO, H. C. J.; FARONI, C. E.; OTTO, R.; TRIVELIN, M. O.; TOVAJAR, J. G. Mineralização da palhada e crescimento de raízes de cana-de-açúcar relacionados com a adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2757-2762, 2008.

VITTI, A. C.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 3, p. 287-293, 2011.

WEIL, R. R.; ISLAM, K. R.; STINE, M. A.; GRUVER, J. B.; SAMSON-LIEBIG, S. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. **American Journal of Alternative Agriculture**, Greenbelt, v. 18, n. 1, p. 3-17, 2003.

YANG, W.H.; SILVER, W.L. Application of the N<sub>2</sub>/Ar technique to measuring soil-atmosphere N<sub>2</sub> fluxes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v.26, p. 449-459, 2012.