

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRÔNOMIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DO N DO SOLO *in situ*

BRUNO JOSÉ RODRIGUES ALVES

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1992

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DO N DO SOLO *in situ*

BRUNO JOSÉ RODRIGUES ALVES

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

SEGUNDO SACRAMENTO URQUIAGA-CABALLERO

ROBERT MICHAEL BODDEY

EDUARDO LIMA

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do
grau de *Master Scientiae* em
Agronomia, área de concentração
em Ciência do Solo.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1992

TÍTULO DA TESE
AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DO N DO SOLO *in situ*

AUTOR
BRUNO JOSÉ RODRIGUES ALVES

APROVADO EM 14/04/1992

BANCA EXAMINADORA:

SEGUNDO S. URQUIAGA-CABALLERO

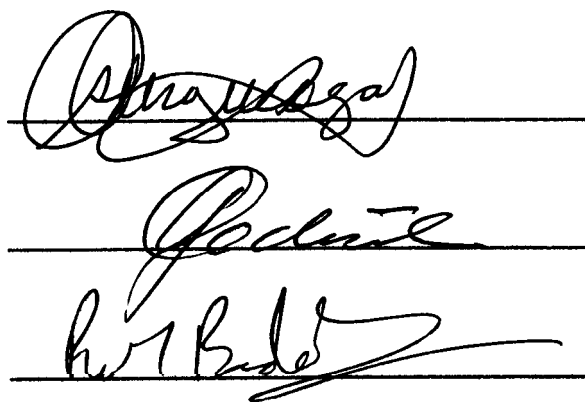
EMBRAPA-CNPBS

GEORG CADISCH

WYE COLLEGE-UNIV. LONDRES

ROBERT MICHAEL BODDEY

EMBRAPA-CNPBS



The image shows three handwritten signatures, each on a horizontal line. The first signature is for Segundo S. Urquiaga-Caballero, the second for Georg Cadisch, and the third for Robert Michael Boddey. The signatures are written in dark ink and are somewhat stylized.

*À minha família e amigos,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelos ensinamentos e oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e à Comunidade Econômica Européia (EEC) pela infraestrutura fornecida para a realização deste estudo.

Aos pesquisadores Segundo Urquiaga, Robert Michael Boddey e Eduardo Lima, pelo incentivo, orientação e amizade durante a realização de todo o curso.

Aos pesquisadores do Centro nacional de Pesquisa de Biologia do Solo (CNPBS), pelo convívio e atenção dispensada a todo o momento.

Ao pesquisador Georg Cadisch por valiosas sugestões na elaboração desta Tese.

Aos professores do Departamento de Solos da UFRRJ pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos Carlos Souto, Octávio, Elvino, Romano, Fábio Olivares, Roberto Gregio, Wagner, Herval, Marconatto, um especial agradecimento pela grande ajuda na realização dos experimentos. Sou-lhes muito grato.

Aos funcionários do CNPBS-EMBRAPA e também aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Bruno José Rodrigues Alves nasceu a 14 de setembro de 1966 no Rio de Janeiro. Realizou os cursos primário e ginásial na Escola Municipal Almirante Saldanha da Gama em Campo Grande, RJ, e o curso científico no Colégio Belisário dos Santos, também em Campo Grande, formando-se como auxiliar técnico de laboratório. Em 1984 iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), vindo a graduar-se no ano de 1987. Durante o curso de graduação, estagiou na EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (CNPBS), como bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq, conduzindo experimentos na área de fixação biológica do nitrogênio (1986-1987). Em 1988, iniciou o curso de Mestrado em "Ciência do Solo", conduzindo o trabalho de tese na EMBRAPA-CNPBS, Itaguaí, Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	xviii
GENERAL ABSTRACT	xxi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I. Uma Metodologia colorimétrica para a determinação do N-NH_4^+ em extrato de solo com KCl 2M, usando um sistema de fluxo contínuo (FIA)	7
Introdução	8
Revisão Bibliográfica	10
Experimento 1. Avaliação da sensibilidade de três metodologias de determinação de NH_4^+ em extratos do solo com KCl 2M	16
Objetivo	17
Materiais e Métodos	17
- Destilação a vapor	19

- Colorimetria do Indofenol	21
- Colorimetria do Salicilato	22
Resultados e Discussão	24
Experimento 2. Determinação direta do NH_4^+ e NO_3^- em extrato de solo em KCl 2M, utilizando o sistema de fluxo contínuo (FIA)	30
Objetivo	31
Materiais e Métodos	31
Resultados e Discussão	41
CAPÍTULO II. Avaliação do N do solo potencialmente disponível para a planta com base em dois métodos de incubação	56
Introdução	57
Revisão Bibliográfica	60
- As reservas de Nitrogênio no solo	60
. NH_4^+ fixado às argilas	61
. A reserva orgânica de N	62
- Fontes externas de N	64
. Adição de N via precipitação	64
. Adição via FBN	65
- Transformações do N no solo	66
. Mineralização/imobilização do N do solo	66
.. Processo de mineralização ou	

amonificação	66
.. Mineralização x imobilização	68
.. Fatores que afetam a mineralização	
/imobilização do N do solo	72
... Temperatura	72
... Umidade/pO ₂	74
... Efeito do pH	76
... Estrutura e textura	78
... Presença da planta	79
. Destino do N Mineralizado no solo	81
- Métodos de estudo da disponibilidade de	
N no solo	82
. Enriquecimento de ¹⁵ N	82
. Índices de disponibilidade	84
.. Métodos químicos	87
.. Métodos biológicos	90
.. Outros métodos	96
. N disponível para a planta: Incubação	
<i>in situ</i>	97
Experimento 1. Efeito do tempo de incubação	
sobre a mineralização do N do solo em	
amostras intactas	104
Introdução	105
Objetivo	106
Materiais e Métodos	106

Resultados e Discussão	109
Experimento 2. Comparação das estimativas da mineralização do N do solo pelo método de incubação aeróbica e pela metodologia de amostragem <i>in situ</i> , em perfil de solo uniforme, com o N acumulado por <i>Panicum maximum</i>	112
Objetium	113
Materiais e Métodos	113
- Incubação aeróbica	115
- Metodologia de avaliação <i>in situ</i> . . .	117
Resultados e Discussão	120
Experimento 3. Estimativas da mineralização do N do solo pelo método de amostragem <i>in situ</i>	139
Objetivo	140
Materiais e Métodos	140
Resultados e Discussão	145
CONCLUSÕES GERAIS	152
BIBLIOGRAFIA CITADA	154

ÍNDICE DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I.

Tabela 1. Resultados da análise química dos diferentes solos utilizados na comparação das metodologias colorimétricas e de destilação a vapor	18
Tabela 2. Comparação das três metodologias avaliadas em relação à sensibilidade a diferentes níveis de padrão de N-NH_4^+ em solução de KCl 2M	25
Tabela 3. Teor de N-NH_4^+ nos diferentes solos em estudo obtido através de três diferentes metodologias. Valores médios de 5 repetições	25

Tabela 4. Resultados da análise química dos diferentes solos utilizados na comparação da metodologia de fluxo contínuo (FIA) e destilação a vapor	33
---	----

Tabela 5. Efeito de diferentes vazões do reagente tampão/citrato sobre o pH final na análise colorimétrica de NH_4^+ através do sistema FIA-Salicilato	47
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resultados da análise química dos diferentes solos utilizados no estudo do efeito do tempo de incubação sobre a mineralização de N do solo	107
--	-----

Tabela 2. Análise dos constituintes orgânicos e inorgânicos do solo Itaguaí utilizado nos estudos de disponibilidade de N	114
---	-----

Tabela 3. Estimativas do N mineralizado calculado com base na coluna aberta e na fechada assim como a do N extraído pela planta calculada pela coluna aberta e acumulado na planta. Valores médios de 4 repetições	132
--	-----

Tabela 4. Conteúdo inicial de N no solo e alguns dados de fertilidade das diferentes profundidades estudadas no experimento de colunas em	
---	--

perfil natural	141
Tabela 5. Estimativas do N mineralizado do solo nas 4 profundidades sob <i>Panicum maximum</i> e <i>Brachiaria arrecta</i> usando a técnica de colunas. Médias de 3 repetições (3 pares de couna por repetição)	148
Tabela 6. N extraído por <i>Panicum maximum</i> e <i>Brachiaria arrecta</i> conforme estimativa da técnica de colunas. Médias de 3 repetições	150

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I.	Página
Figura 1. Correlação entre os padrões baixos de NH_4^+ (ugN/ml) em KCl 2M e as respectivas leituras de absorbância(nm) pelo método do Salicilato (comp. onda 647nm)	26
Figura 2. Correlação entre os resultados da análise de 6 diferentes solos através da destilação a vapor e da metodologia do Indofenol. Média de 5 repetições	28
Figura 3. Correlação entre os resultados da análise de 6 diferentes solos através da destilação a vapor e da metodologia do Salicilato. Média de 5 repetições	29
Figura 4. Esquema de funcionamento do sistema FIA-NO_3^- para análise em extratos de solo em KCl 2M .	36

Figura 5. Esquema de funcionamento do sistema FIA-NH ₄ ⁺ para análise em extratos de solo em KCl 2M .	40
Figura 6. Efeito da temperatura sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml	43
Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml	44
Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de salicilato de sódio sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml	45
Figura 9. Efeito da vazão do reagente tampão-citrato no desenvolvimento da reação em duas concentrações de salicilato de sódio representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml	48
Figura 10. Efeito do comprimento do "loop" (volume da amostra) sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml, na vazão de 0.58ml/min do reagente tampão/citrato	50

Figura 11. Comportamento do comprimento do pico de leitura de absorbância através do sistema FIA- NO_3^- de várias padrões em KCl 2M	52
Figura 12. Comportamento do comprimento do pico de leitura de absorbância através do sistema FIA- NH_4^+ de várias padrões em KCl 2M	53
Figura 13. Correlação entre os resultados da análise de 10 diferentes solos através da destilação a vapor e da metodologia FIA-salicilato. Média de 5 repetições	54

Capítulo II

Figura 1. N mineralizado em três diferentes solos acumulado durante 5 semanas de incubação, em condições controladas	110
Figura 2. Curvas de N mineralizado acumulado vs. tempo de incubação para obtenção do N_0 e da constante k , considerando o período de 0-17 semanas para a obtenção da curva 1 e 2-17 semanas para a curva 2. As estimativas foram obtidas da curva $N_{\text{mint}} = N_0 \times (1 - \exp(kt))$. .	121
Figura 3. Comportamento da temperatura e da umidade do solo considerados para as estimativas dos mesmos para as 7 profundidades do solo	127

Figura 4. Comportamento do N mineralizado, estimado pelo modelo em relação às oscilações de temperatura e umidade	129
Figura 5. Comportamento do N mineralizado, estimado pela metodologia das colunas em relação às oscilações de temperatura e umidade	130
Figura 6. Comparação do N mineralizado estimado pelo modelo e estimado pela metodologia de colunas nas diferentes profundidades do solo	134
Figura 7. N mineralizado acumulado estimado pela metodologia de colunas, e distribuição de raízes de <i>Panicum maximum</i> nas diferentes profundidades do solo Itaguaí	136
Figura 8. Comparação do N mineralizado estimado pelo modelo e estimado pela metodologia de colunas	137
Figura 9. Dados de temperatura máxima e mínima, e de precipitação referentes ao período de 63 dias de experimento de campo em perfil natural	144
Figura 10. Concentração de NH_4^+ e NO_3^- em relação a umidade do solo em 5 tempos de amostragem. Médias de 4 profundidades e 3 repetições (3 colunas por repetição)	127

RESUMO GERAL

A principal reserva potencialmente disponível de N nos solos é a matéria orgânica, que libera este nutriente para as plantas através do processo biológico de mineralização. Contudo, face a taxa de mineralização de N ser diretamente dependente de uma série de fatores edafoclimáticos, este nutriente pode ser limitante também em solos com razoável nível de matéria orgânica. A susceptibilidade do N orgânico a ação destes fatores, torna muito difícil a previsão de sua disponibilidade para a planta.

Muitas metodologias tem sido propostas para avaliar a capacidade dos solos em suprir N para as plantas, sendo os métodos biológicos os mais promissores. A utilização de metodologias de incubação *in situ*, mostra-se mais realística nas estimativas de disponibilidade de N, pelo fato da

avaliação ser feita com mínima interferência nos fatores que governam a mineralização do N. Por outro lado, para o trabalho de rotina, as avaliações *in situ* são muito laboriosas e limitadas para apenas alguns solos. Para tornar mais real as estimativas de laboratório, aplicam-se a elas modelos matemáticos que consideram os efeitos climáticos sobre a disponibilidade do N.

Como a quantidade de N liberada no período usado nas metodologias de incubação são, na maioria das vezes, muito pequenas, a redução do erro nas estimativas é conseguida com a utilização de métodos suficientemente sensíveis para determinar o N mineralizado. Também é desejável que o método de determinação seja rápido para evitar o prolongado armazenamento das amostras. A determinação de mínimas quantidades da forma nítrica foi conseguida com sucesso por colorimetria do nitrito, porém para a forma amoniacal, ainda não existia uma metodologia que se enquadrasse nas necessidades deste trabalho.

Neste sentido, objetivou-se neste trabalho avaliar a disponibilidade de N do solo através de um método de incubação *in vitro* e de princípio biológico, cujas estimativas foram feitas a partir de um modelo matemático, e de um método de incubação *in situ*, os quais foram avaliados pela cooperação com o N extraído por uma gramínea. Também

desenvolveu-se uma metodologia para determinação de amônio através da técnica de fluxo contínuo (FIA).

A determinação de N em extratos do solo com KCl 2M foi melhor obtida pela metodologia colorimétrica do Salicilato, com sensibilidade para 0.05 ugN/ml de extrato e com precisão e exatidão tão boas quanto as obtidas pelo método de destilação a vapor.

Na avaliação da disponibilidade de N, quando comparadas a quantidade de N extraída por *Panicum maximum*, os resultados obtidos pelo modelo foram sensivelmente superestimados, provavelmente pelo pouco peso dado aos coeficientes das equações que descrevem o comportamento da mineralização do N em relação as oscilações de temperatura e umidade. De forma contrária, a metodologia de avaliação *in situ* proporcionou uma estimativa de N extraído pela planta muito semelhante ao quantificado na própria planta. Este resultado demonstrou que esta metodologia é bastante promissora para o estudo da disponibilidade do N, podendo ser utilizada como padrão de comparação para metodologias de laboratório. Contudo, os resultados de campo demonstraram que ainda é necessário que mais estudos sejam feitos para melhor avaliar os efeitos do tempo de incubação e das dimensões das colunas usadas no método, sobre a estimativa da disponibilidade de N obtida.

GENERAL ABSTRACT

The principal reserve of potentially available nitrogen in soil is the organic matter, which liberates this nutrient for plant growth via the biological process of mineralization. As the rate of N mineralization is directly controlled by a series of edaphoclimatic factors, this nutrient can be limiting for plant growth even in soils with reasonable contents of organic matter. The susceptibility of organic N to these factors makes the prediction of the availability of N to plants very difficult.

Many methods have been proposed to evaluate the capacity of soils to provide N for plants, and amongst them the biological techniques appear to be the most promising. In situ incubation techniques yield the most realistic estimates of the availability of soil mineral N, as the evaluation is made with a minimum interference with the factors that govern

N mineralization. On the other hand, for routine work the In situ techniques are very laborious and limited for use in only some soils. To adjust laboratory estimates to give more realistic results, mathematical models can be applied which take into consideration climatic effects on soil N availability.

As in the majority of cases the quantity of mineral N that is liberated from incubation studies is very small, the reduction of errors in these estimates is achieved by using techniques of sufficient sensitivity to determine the mineralized N. It is desirable also that the technique is rapid so that samples do not have to be stored for a long time. The determination of very low concentrations of nitrate can be achieved by reduction to nitrite with subsequent quantification by colorimetry. However, for low ammonium concentrations no suitable technique was available.

The objectives of this study were to evaluate the availability of soil N utilizing a laboratory method of incubation of soils packed in columns and an in situ incubation technique, and compare the estimates of mineralized N with the uptake of N by a grass. A flow injection analysis (FIA) technique for the determination of ammonium in soil extracts.

The determination of mineral N in KCl soil extracts using the FIA techniques was faster and more sensitive than the

traditional colorimetric techniques. The FIA technique developed for the quantification of ammonium had a sensitivity of down to 0.05 ug N/ml with a precision and accuracy as good as the steam distillation technique.

The results obtained from the laboratory assay adjusted, using a mathematical model, gave higher values than the quantity of N actually accumulated by *Panicum maximum*, probably because the influence of oscillations of temperature and soil moisture on N mineralization was overestimated. On the other hand, the *In situ* incubation assays gave estimates of N extracted by the plants very similar to the actual plant N accumulation. These results showed that this methodology is very promising for the study of soil N availability and can be used as a standard to for laboratory techniques. The results from the field indicate that more studies are required to better evaluate the effects incubation time and dimensions of the soil cores utilized for this *in situ* technique on the estimates of available soil N.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos solos tropicais, o nitrogênio é um dos elementos que mais limitam o desenvolvimento das plantas. A sua baixa disponibilidade para as plantas, está diretamente relacionada aos vários processos envolvidos em seu ciclo no sistema solo-planta-atmosfera.

O nitrogênio orgânico do solo e de fragmentos vegetais que a ele se incorporam, juntamente ao nitrogênio fixado biologicamente, representam as principais fontes naturais de N para as culturas. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo de grande importância para as leguminosas e algumas gramíneas (Sprent & Sprent, 1990; Döbereiner, 1990), já o N das reservas orgânicas fica disponível a todas as plantas pelo processo biológico de mineralização. Processos como a imobilização na biomassa do solo, nitrificação, desnitrificação, lixiviação e volatilização de amônia e fixação nas argilas 2:1 reduzem as

concentrações das formas minerais de N na solução do solo (Urquiaga et al, 1990).

A utilização de adubos para complementação nutricional de N para as plantas, é, frequentemente, necessária para se conseguir maior produção de alimentos. Contudo, mesmo em culturas adubadas, o N-mineral do solo assume grande importância na nutrição das plantas, pois se observa que, geralmente, a maior parte do N acumulado por elas provém da fração mineral nativa do solo (Braun, 1990). A baixa eficiência e o aumento dos custos dos fertilizantes comerciais, associados aos efeitos poluentes provocados pelo excesso de N no ambiente, reforçam a necessidade do entendimento do ciclo do N e da disponibilidade deste elemento no solo (Keeney, 1982a).

Em áreas de solos pobres em N como nas pastagens, onde o uso de fertilizantes nitrogenados é inviável, praticamente todo o nitrogênio mineralizado é absorvido pelas plantas, pois, mesmo em condições ambientais que estimulam a mineralização do nitrogênio, tem-se, também, maior extração pelos vegetais face ao maior desenvolvimento radicular. Todavia, em regime de pastejo, as perdas geradas pelas excretas localizadas dos animais representam importantes drenos de N nas pastagens, principalmente em épocas de chuva e alta temperatura (Ball & Ryden, 1984). A princípio, uma possível solução para a baixa disponibilidade de N nas

pastagens de gramíneas puras é o estabelecimento de consórcio com leguminosas forrageiras, que transferem para as gramíneas parte do N obtido da FBN através da mineralização de sua biomassa ou por simples exudação de NH_4^+ (Ta & Faris, 1986). Porém, frente a inúmeras interações a que o N está sujeito nos diversos sistemas solo-planta, fica muito difícil prever destes sistemas, a resposta em termos de produção, resultante da introdução de variedades altamente produtivas, culturas em consórcio, adubação etc, sem que se saiba o efeito sobre a disponibilidade do N.

Vários autores propõem métodos que fornecem índices de disponibilidade de N para as plantas (Keeney, 1982b; Stanford, 1982). Estes métodos, divididos em químicos e biológicos, fundamentam-se na quantificação do N-liberado ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) de amostras de solo ou incubadas por períodos que variam de 1 a 30 semanas sob condições de aerobiose ou anaerobiose (métodos biológicos) ou por tratamento com substâncias químicas aliadas a variações de temperatura e pressão (métodos químicos). As estimativas de disponibilidade de N fornecidas por estes métodos não têm sido muito animadoras pois poucos trabalhos tem demonstrado resultados positivos e consistentes entre estas estimativas e o N acumulado pela planta (Keeney, 1982b; Stanford, 1982). Acredita-se que a pouca representabilidade das condições

reais de campo seja responsável por resultados muitas vezes negativos (Keeney, 1980; Binkley & Hart, 1989).

Stanford et al (1973a) e Stanford & Epstein (1974), através de experimentos de incubação *in vitro*, demonstraram como a umidade e a temperatura agem sobre a mineralização do N orgânico do solo. Estes dois fatores podem ser considerados como responsáveis pela diferença entre a condição de campo e de laboratório durante a incubação das amostras. Através de transformações feitas com base nos modelos, propostos pelos autores anteriormente citados, sobre a taxa de mineralização de N e a reserva de N potencialmente disponível, acredita-se que as estimativas obtidas *in vitro* sejam uma razoável aproximação do processo de mineralização *in situ* (Stanford et al, 1973b; Smith et al, 1977; Hadas et al, 1989).

Como sugerido por Kenney (1980), um passo importante para os estudos de disponibilidade é a intensificação de estudos que utilizem metodologias de incubação *in situ*, que mesmo consumindo muito tempo e sendo limitante para análises de rotina, seriam muito importantes como padrões para desenvolvimento de métodos de laboratório, mais práticos e rápidos.

As técnicas de avaliação *in situ* para o estudo da mineralização do N tem sido obtidos principalmente em sistemas florestais (Adams & Attiwill, 1986; Raison et al,

1987; Edmonds & McColl, 1989), porém, especial atenção deve ser dada a metodologia descrita por Raison et al, 1987 que também estima a quantidade de N extraído pela planta durante o período de incubação. Uma avaliação da qualidade das estimativas deste método poderia ser obtida pela comparação com o N-extraído pela planta no mesmo período de incubação. Tais comparações são extremamente difíceis quando feitas em sistemas florestais, onde seria necessário quantificar pequenas mudanças no total de N acumulado nas árvores. Apenas Smethurst & Nambiar (1989) publicaram trabalho neste sentido obtendo resultados satisfatórios nas comparações feitas. A respeito desta metodologia, ainda existem algumas dúvidas quanto a efeitos do tempo de incubação das colunas utilizadas no método.

Neste sentido, objetivou-se neste trabalho, testar a metodologia de Raison et al (1987) em gramíneas forrageiras, o que torna mais fácil a comparação entre o N extraído pela planta e o estimado pelo método, assim como avaliar os resultados obtidos através da aplicação dos modelos propostos por Stanford et al (1973a) e Stanford & Epstein (1974) a partir dos resultados de disponibilidade potencial de N (Stanford & Smith, 1972).

Por outro lado, as concentrações de N-mineral nos solos tropicais são frequentemente muito baixas, principalmente em solos sob gramíneas forrageiras (cerca de

1ppm), e considerando-se que em estudos de mineralização devem-se utilizar várias repetições para minimizar a variação espacial, é necessário se ter em mãos um método que, além de preciso, seja rápido e bastante sensível. A destilação a vapor (Keeney & Nelson, 1982), embora seja considerada mundialmente como uma metodologia padrão para estas determinações, não é apropriada quando se exige muita sensibilidade e rapidez. Alternativamente, pode se utilizar as metodologias colorimétricas, que adaptadas para analisadores em fluxo contínuo (FIA) (Zagatto et al, 1981), aumentam sua eficiência tornando-se satisfatórias para o tipo de estudo em questão. O sistema FIA para determinação de NO_3^- (Giné et al, 1980) já vem sendo utilizado com sucesso, porém, no caso do NH_4^+ , as determinações em extratos de KCl do solo são feitas manualmente pelo método do Indofenol (Dorich & Nelson, 1983) ou Salicilato (Kempers & Zweers, 1986). Com isso, também ficou a cargo deste trabalho, comparar ambas as metodologias colorimétricas para NH_4^+ com a de destilação a vapor e adaptar a mais sensível para o sistema FIA.

CAPÍTULO I

**UMA METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO
DO N-NH_4^+ EM EXTRATO DE SOLO COM KCL 2M, USANDO UM SISTEMA
DE FLUXO CONTÍNUO (FIA).**

INTRODUÇÃO

No estudo da dinâmica do N nos solos, principalmente em áreas de pastagens, é bastante desejável uma metodologia que seja capaz de quantificar mínimas concentrações de N mineral e que seja rápida o suficiente para reduzir ao máximo o tempo de armazenamento das amostras.

A extração das formas minerais de N é um procedimento indispensável para a utilização das diversas metodologias de quantificação. Segundo Bremner (1965), a extração através da agitação com KCl 2M mostra-se como a mais eficiente na recuperação do N-mineral. Sendo um reagente de baixo custo e fácil utilização, vários métodos tem sido testados para quantificação do N-mineral nos extratos de solo usando KCl (Banwart et al, 1972; Dorich & Nelson, 1983; Kempers & Zweers, 1986).

A metodologia de destilação a vapor com posterior titulação ácida, tem sido largamente utilizada nas análises

de NH_4^+ e NO_3^- , sendo escolhida para quantificar o N mineralizado nos experimentos desta tese. Contudo, esta técnica mostrou-se pouco sensível e lenta (3.5 min/cada íon/amostra) para quantificar o N mineral nos extratos de solo obtidos imediatamente após amostragem. Dessa forma, tornou-se necessária a obtenção de uma metodologia mais rápida e mais sensível para o prosseguimento dos estudos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A quantificação das formas minerais de N no solo tem sido feita a partir da extração em solução de KCl 2M. A metodologia de quantificação baseada na destilação à vapor foi considerada padrão para análise de solos pela Sociedade International de Ciência do Solo por sofrer mínimas interferências de substâncias orgânicas e de ser aplicável a qualquer tipo de solo (Keeney & Nelson, 1982). Segundo esta metodologia, a destilação do extrato do solo em KCl 2M na presença de MgO faz com que somente o NH_4^+ trocável seja extraído (NH_3) em ambiente alcalino junto ao vapor d'água que, uma vez condensado, é coletado em solução de H_3BO_3 /indicador. A análise do NO_3^- é feita em seguida com adição de liga de Devarda (reduz NO_3^- à NH_4^+) à mesma amostra. Através da titulação do coletado com H_2SO_4 padronizado, tem-se as quantidades das formas minerais. Para solos pobres em N ($< \text{lugN/g}$) é necessário que uma maior

quantidade de solo seja utilizada, o que exige maior tempo em cada determinação. O problema no aumento do tempo de destilação (>5min aprox.) está na interferência das substâncias orgânicas, que podem se hidrolizar e liberar NH_4^+ , superestimando os resultados (Keeney & Nelson, 1982).

A utilização de eletrodos específicos para cada forma mineral tem sido empregada na análise de solo. O eletrodo utilizado na análise de NH_4^+ responde a atividade de NH_3 em soluções preparadas para $\text{pH} > 11$ para converter NH_4^+ em NH_3 . Banwart et al (1972) encontraram boa concordância entre os resultados obtidos pelo eletrodo de NH_4^+ e o método de destilação a vapor, conseguindo sensibilidade numa faixa de 0.05ug N/ml de solução. As interferências são mínimas neste método, sendo problema apenas a presença de Hg em solução e aminas voláteis. De forma contrária, os eletrodos utilizados para determinação de NO_3^- sofrem grande interferência de íons Cl^- necessitando de extração diferenciada em relação ao NH_4^+ . A sensibilidade dos eletrodos de NO_3^- é problemática para análise de solos pobres estando na faixa de 1.4 ug/ml (Keeney & Nelson, 1982).

Uma análise de N mineral, exigindo mínima quantidade de extrato (geralmente menos do que 1ml) pode ser feita através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Contudo, como na destilação a vapor, o tempo consumido em cada determinação (em geral > 2 min) pode ser

limitante para o uso desta metodologia. Na determinação por HPLC, o NH_4^+ é medido fluorimetricamente após derivatização em coluna com o-ftalaldeído. Esta metodologia apresenta alta correlação com a metodologia de destilação a vapor, podendo sofrer interferências de cátions e substâncias orgânicas que contaminam a coluna trocadora (Abshahi et al, 1988). Para a análise do NO_3^- utiliza-se uma coluna de fase reversa usando uma fase móvel de 1:1 metanol-água a pH 3.0. A recuperação de N por esta metodologia ficou em média de 100% do N- NO_3^- adicionado em vários solos contrastantes quimicamente, sendo superior às metodologias colorimétricas do ácido fenoldissulfônico e do sulfato de hidrazina, porém com Concentrações em torno de 1 ugN/ml (Kuchnicki & Webster, 1986).

Os métodos colorimétricos tem sido usados, geralmente, em determinações de N em águas naturais, águas residuais e em solos. Com o objetivo de aumentar a velocidade nas determinações de diversos elementos, Ruzicka & Hansen (1975) desenvolveram um sistema de análise em fluxo contínuo (FIA) que possibilita a adaptação dos métodos colorimétricos. A adaptação de métodos manuais ao FIA resulta em maior eficiência nas análises, ou seja maior velocidade e repetibilidade. Em análises de N-mineral em extratos de solo com KCl, Giné et al (1980) adaptaram para FIA, o método para análise de NO_3^- e NO_2^- baseado na reação de Griss-Xlosvay

(colorimetria do NO_2^-) utilizando coluna de Cádmio para redução do NO_3^- . Menezes Santos Fa et al (1991) descreveram um método adaptado à FIA para determinação de NH_4^+ em águas naturais pelo procedimento de Nessler. Porém, como discutido por Keeney & Nelson (1982), a metodologia de Nessler, apresenta baixa repetibilidade quando utilizada para medir baixos níveis de NH_4^+ em extratos de solo.

Entre vários métodos colorimétricos, os métodos baseados na reação de Bertholet são os normalmente usados na determinação de NH_4^+ em extratos de solo, devido a sua alta resolução e reprodutibilidade. Destes métodos, o mais comum consiste basicamente na reação de uma amostra contendo NH_4^+ com um reagente a base de fenol e nitroprussiato de sódio na presença de íons Cl^- em solução com alto pH o que resulta no desenvolvimento de cor azul. Este método conhecido como método do Indofenol pode ser aplicado diretamente em determinações de NH_4^+ em extratos de solo com KCl (Dorich & Nelson, 1983). Kempers & Zweers (1986) mostraram bons resultados na determinação de NH_4^+ em extratos de solo utilizando salicilato de sódio em substituição ao fenol (Crooke & Simpson, 1971), reduzindo bastante o trabalho com compostos tóxicos. Estes dois métodos foram adaptados à analisadores automáticos que são bastante conhecidos por sua praticidade e eficácia, porém a sua utilização é limitada pelo seu alto custo de aquisição. Ainda, Burton et al (1989)

demonstraram que aminoácidos podem superestimar os resultados obtidos através do método do Indofenol adaptado ao auto-analizador Technicon e de acordo com Searle (1990) isto se deve aos efeitos de pH e temperatura de trabalho, propícios à hidrólise de compostos nitrogenados orgânicos. O trabalho de Searle (1990) refere-se aos resultados encontrados por Burton et al (1989), que trabalharam com soluções de aminoácidos à 20 ppm de N, encontrando apenas efeito de alguns aminoácidos. No solo, a concentração desses ácidos é bem pequena, e possivelmente nem todos estão presentes em solução a ponto de serem um problema para as análises de N-NH_4^+ , face aos excelentes resultados obtidos por alguns trabalhos (Gentry & Willis, 1988; Scott et al, 1989).

Os sistemas FIA podem ser tão eficientes quanto os auto-analisadores, e ao contrário destes, podem ser obtidos a um custo bem mais baixo. Um sistema FIA pode ser construído com equipamentos comumente encontrados em laboratórios que analisam solo rotineiramente, sendo somente necessária a aquisição de um injetor-comutador para completar o sistema.

De modo geral, face a alta sensibilidade, os métodos colorimétricos existentes são bastante úteis em análises de amostras com mínimas quantidades de N e se o sistema for automatizado ou adaptado à FIA, será de grande utilidade quando o tempo é fator importante para as análises.

Neste sentido, face aos excelentes resultados obtidos para NO_3^- determinado através de FIA em KCl 2M, que oferece excelente sensibilidade e rapidez (0.02 ug/ml e 100 amostras/hora), optou-se neste trabalho pela utilização deste sistema para a análise do N-mineral. Contudo, para a análise de NH_4^+ em extrato de KCl 2M, foi necessário determinar o método colorimétrico mais sensível e adaptá-lo ao sistema FIA a fim de aumentar a eficiência das análises.

EXPERIMENTO I

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE TRÊS METODOLOGIAS DE
DETERMINAÇÃO DE NH_4^+ EM EXTRATOS DO SOLO COM KCl 2M.

OBJETIVO

Identificar um método colorimétrico mais sensível do que a metodologia padrão de destilação a vapor, sem que se perca a exatidão e a precisão da metodologia padrão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram feitos padrões de N-NH_4^+ em extrato de KCl 2M nas quantidades de 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0 $\mu\text{gN/ml}$, afim de se verificar a recuperação do N-NH_4^+ pelos três métodos. Em seguida, foram feitas análises de N-NH_4^+ em seis solos de diferentes características químicas a saber: Podzólico vermelho distrófico, latossolo roxo, latossolo vermelho-escuro, areia quartzosa e dois planossolos (Tabela 1). As amostras de solo dos primeiros 20cm foram secas ao ar e passadas em peneiras de 2mm. A extração do N-

Tabela 1. Resultados da análise química dos diferentes solos utilizados na comparação das metodologias colorimétricas e de destilação à vapor.

Solos	pH	C%	N%	Ca+Mg -mEq/100g-	Al	P - ppm	K -
LE	4.6	1.11	0.21	1.0	0.8	5.0	77
PlanossoloA	4.6	0.48	0.09	0.8	0.3	3.8	60
PlanossoloB	4.6	0.18	0.02	0.4	0.3	1.4	41
PVd	5.8	0.66	0.17	4.5	0.0	4.8	55
AQ	5.2	0.48	0.10	1.0	0.1	5.2	66
LR	4.6	1.92	0.34	2.7	0.8	4.0	98

LE - Latossolo vermelho-escuro
 A - Camada de 0-10cm
 B - Camada de 30-40cm
 PVd - Podzólico vermelho distrófico
 AQ - Areia quartzosa
 LR - Latossolo roxo

NH_4^+ foi feita em 140g de solo com extrator KCl 2M na proporção de 5:1 do solo sofrendo agitação por 1 hora a 210 rpm. Após decantação (24h) retiraram-se alíquotas para as análises. Os métodos comparados foram: Destilação à vapor (Keeney & Nelson, 1982), colorimetria do Indofenol (Dorich & Nelson, 1983) e colorimetria do Salicilato (Kempers & Zweers, 1986).

Procedimento e reagentes utilizados nas análises:

- Destilação à vapor (Keeney & Nelson, 1982)

Utilizou-se um sistema basicamente composto por uma manta aquecedora com balão de fundo redondo com água para produção de vapor; um condensador; um balão para amostra; todos conectados a um corpo de vidro central, conforme esquematizado por Bremner (1965). Para a análise retirou-se uma alíquota de 80 ml do extrato de KCl, na qual adicionaram-se 300 mg de MgO calcinado (aquecido à 600°C por aprox. 6 horas) para a extração da fração amoniacal através da destilação. O condensado foi coletado em 10ml de uma solução 2% de H_3BO_3 /indicador (para 10 litros de solução adicionar 200g de H_3BO_3 e 150 mg de verde de bromocresol/60 mg de vermelho de metila pré-dissolvidos em 100ml de etanol). Considerou-se extraído o NH_4^+ quando se conseguiu cerca de 65 ml do condensado. Em seguida, para a extração da fração nítrica, adicionaram-se 300mg de Liga de Devarda

(ref.14903 Riedel-deHaën) para redução do $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ à NH_4^+ , seguindo-se, daí, o mesmo procedimento para NH_4^+ . Para quantificação das frações minerais, titulou-se o coletado em ácido bórico contra ácido sulfúrico 0.005N padronizado.

cálculos:

Volume (V) de ácido gasto na titulação (ml) x Normalidade do ácido (Na) = mEq (mili-equivalente) de ácido gasto na titulação.

Como as substâncias reagem equivalente a equivalente, mEq de ácido gasto = mEq da forma de N mineral titulada, logo:

mg de N- $(\text{NH}_4^+ \text{ ou } \text{NO}_3^-)$ = equivalente-miligrama do N (14,007) x mEq de ácido gasto, ou

$$\text{N-NH}_4^+ \text{ ou N-NO}_3^- \text{ (mg)} = 14,007 \times \text{Na} \times \text{V} \quad (1)$$

Para se obter a concentração de N-mineral no extrato, basta dividir o resultado obtido em (1) pelo volume da alíquota (VA), ou

$$\text{N-NH}_4^+ \text{ ou N-NO}_3^- \text{ (mg/ml)} = (14,007 \times \text{Na} \times \text{V}) / \text{VA} \quad (2)$$

Contudo, o objetivo principal na análise do solo é saber o teor de N no solo, para isso, basta multiplicar a equação (2) pelo volume total de extrator utilizado na

extração (VT) e dividir o resultado pelo peso do solo seco (P) em Kg (obtendo-se mgN/Kg de solo), ou

$$N-NH_4^+ \text{ ou } N-NO_3^- = (14,007 \times Na \times V) \times VT / (VA \times P) \quad (3)$$

- Colorimetria do Indofenol (Dorich & Nelson, 1983)

Para esta análise utiliza-se uma alíquota de 5ml do extrato de solo em KCl 2M em um balão volumétrico de 25 ml. A esta alíquota adiciona-se 1ml de uma solução de EDTA-Na (6g de EDTA-Na/100ml H₂O) ajustada a pH 7.0. O EDTA haze como quelante de cátions (divalentes > K⁺ > NH₄⁺) que podem interferir na reação colorimétrica. Em seguida adicionam-se 2ml de uma solução contendo 7g de fenol e 34mg de nitroprussiato de sódio dissolvidos em água destilada a um volume final de 100ml e 4ml de uma solução tampão/hipoclorito (1,48g de NaOH em 70ml H₂O onde se adicionam 4,98g Na₂HPO₄ e 20ml de NaClO com 5% de Cl⁻, então checando o pH para que esteja entre 11,4 e 12,0, finalmente completando o volume com H₂O para 100ml). Completa-se o volume do balão para 25ml com água destilada. Os balões devem ser deixados em banho-maria à 40°C por 30 min para a formação da cor. A leitura de absorbância é feita a 636nm contra branco e padrões tratados igualmente.

Cálculos:

Fazendo-se uma regressão linear entre as concentrações dos padrões e as respectivas leituras de absorbância, encontra-se um fator de transformação da leitura das amostras em concentração (geralmente em $\mu\text{gN/ml}$).

Para obtenção da concentração em relação ao solo multiplica-se a concentração de N obtida acima pelo volume total de KCl utilizado na extração de N da amostra e divide-se pelo peso da amostra de solo seco em Kg. Obtém-se então mg N/Kg de solo.

- Colorimetria do Salicilato (Kempers & Zweers, 1986)

Para o sucesso desta análise, deve-se trabalhar com frascos escuros pois a luz interfere no desenvolvimento da cor.

Pipeta-se uma alíquota de 4ml do extrato em um frasco escuro. Um reagente combinado é preparado misturando-se uma parte de uma solução contendo 33g de salicilato de sódio e 20mg de nitroprussiato de sódio em um volume final de 100ml com água destilada, e duas partes de uma solução tampão (9,33g de citrato de sódio. $2\text{H}_2\text{O}$ e 4g de NaOH em água destilada num volume final de 100ml). Adiciona-se 0.9ml desta mistura no frasco contendo a amostra e agita-se imediatamente. Adicionar 0.1ml de hipoclorito (5% de Cl^-) diluído em água destilada numa proporção de 1:5, e agitar

novamente. Deixar os frascos em sala escura por cerca de 2 horas para completo desenvolvimento da cor. A leitura de absorbância é feita a 647nm contra branco e padrões igualmente tratados.

Cálculos:

Os cálculos seguem exatamente o descrito para análise do Indofenol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se a análise das soluções padrão de N-NH_4^+ em KCl 2M, observa-se (Tabela 2), que os três métodos mostraram boa sensibilidade na recuperação de até 0.1 ugN/ml. Para teores menores (até 0.01 ugN/ml), somente o método do Salicilato obteve boa eficiência (Figura 1). Contudo notou-se que com o aumento do percentual de matéria orgânica do solo (Tabela 1) houve uma diminuição da precisão das determinações, mostrada pelo aumento do desvio padrão (Tabela 3), provavelmente provocada pelo aumento de colóides orgânicos em suspensão que prejudicam a leitura das amostras (Scott et al, 1989). Este efeito foi bem mais pronunciado na metodologia do Indofenol (Figura 2).

Para testar a exatidão de cada um dos métodos colorimétricos, compararam-se os resultados da análise de N-NH_4^+ do extrato de KCl 2M de 6 diferentes solos com os obtidos através da metodologia padrão de destilação a vapor.

Tabela 2. Comparação das três metodologias avaliadas em relação à sensibilidade a diferentes níveis de padrão de N-NH_4^+ em solução de KCl 2M.

Concentração de N-NH_4^+ (ug/ml)	Métodos		Dest. Vapor	
	Salicilato*	Indofenol	Dest.	Vapor
	----- nm -----	-----	--- ug/ml ---	--
1.00	0.931(0.001)	0.187(0.001)	1.02	(0.01)
0.70	0.655(0.001)	0.127(0.001)	0.69	(0.01)
0.50	0.473(0.002)	0.094(0.002)	0.51	(0.02)
0.20	0.185(0.002)	0.033(0.003)	0.18	(0.04)
0.10	0.094(0.002)	0.018(0.005)	0.09	(0.03)
0.05	0.048(0.003)	0.015(0.009)	0.08	(0.07)

* Para os métodos colorimétricos, são dados os valores de absorbância.
Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão.

Tabela 3. Teor de N-NH_4^+ nos diferentes solos em estudo obtido através de três diferentes metodologias. Valores médios de 5 repetições.

Solos	Dest. Vapor	Indofenol	Salicilato
	-----	ugN/ml	-----
LE	3.42(0.07)*	3.92(0.42)	3.36(0.12)
PlanossoloA	0.87(0.02)	1.10(0.13)	0.80(0.02)
PlanossoloB	0.36(0.03)	0.52(0.05)	0.40(0.02)
PVd	0.78(0.02)	0.81(0.10)	0.79(0.02)
AQ	0.66(0.04)	0.76(0.05)	0.62(0.01)
LR	6.85(0.07)	6.68(1.23)	6.72(0.26)

* Os valores entre parenteses representam o erro-padrão.

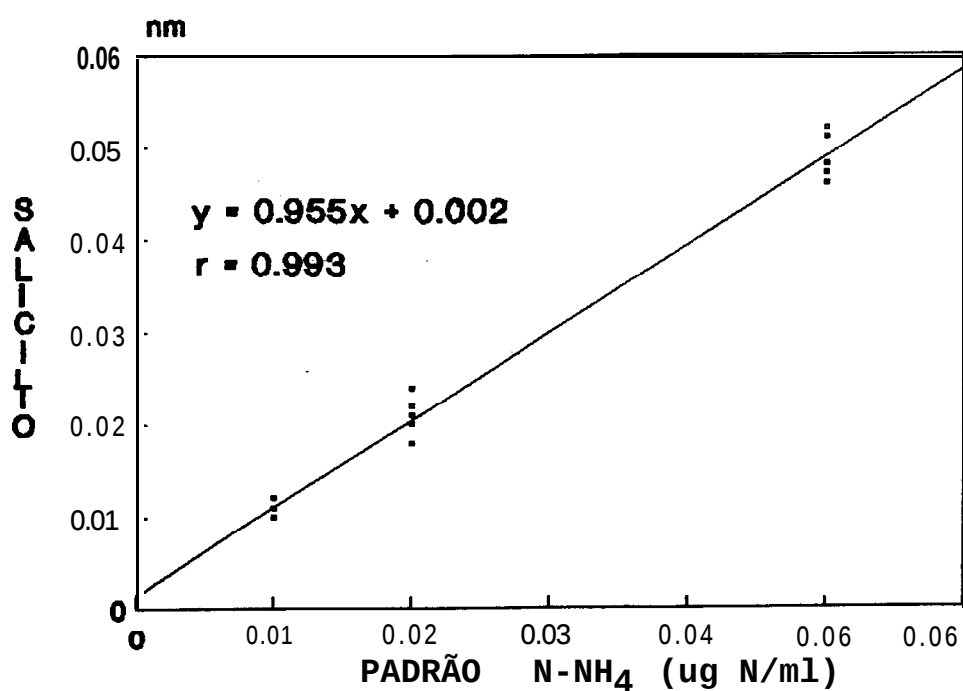


Figura 1. Correlação entre os padrões baixos de NH_4^+ ($\mu\text{gN/ml}$) em KCl 2M e as respectivas leituras de absorbância(nm) pelo método do Salicilato (comp. onda 647nm)

Observando-se as Figuras 2 e 3, verifica-se que ambas as metodologias colorimétricas correlacionaram-se muito bem com a metodologia padrão, porém o método do Salicilato, além de mostrar melhor correlação, mostrou-se tão preciso quanto a metodologia de destilação a vapor (Tabela 3). Os dados obtidos pela metodologia do Indofenol além de serem mais variáveis foram cerca de 9% maiores.

Os dados obtidos demonstraram que a metodologia do Salicilato é mais sensível, precisa e exata do que a metodologia do Indofenol, além da vantagem de se dispensar a presença de substâncias voláteis tóxicas como o fenol.

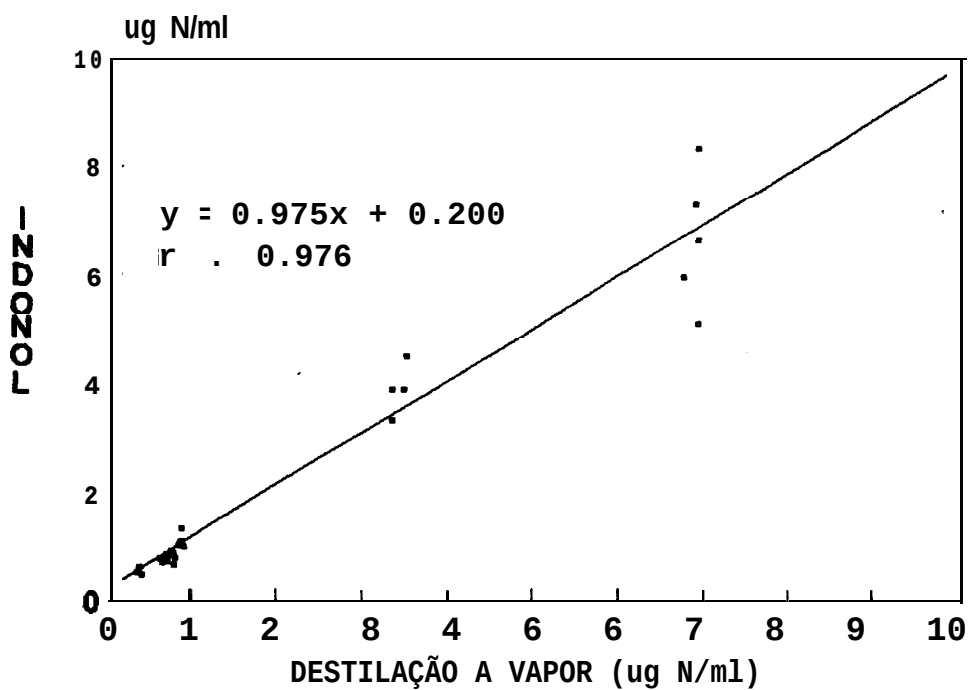


Figura 2. Correlação entre os resultados da análise de 6 diferentes solos através da destilação a vapor e da metodologia do Indofenol. Média de 5 repetições.

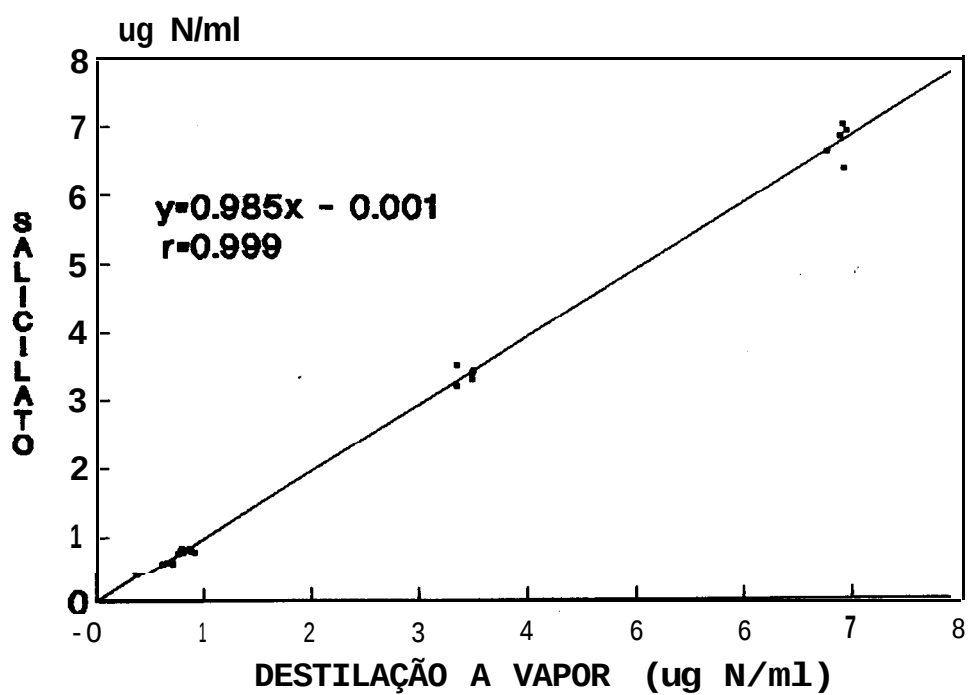


Figura 3. Correlação entre os resultados da análise de 6 diferentes solos através da destilação a vapor e da metodologia do Salicilato. Média de 5 repetições.

EXPERIMENTO 2

DETERMINAÇÃO DIRETA DO NH_4^+ E NO_3^- EM EXTRATO DE SOLO EM
KCl 2M UTILIZANDO O SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO (FIA)

OBJETIVO

Adaptar a metodologia colorimétrica mais sensível, obtida no experimento anterior, de forma a se conseguir suficiente sensibilidade (para o interesse do trabalho, cerca de $0.05\mu\text{gN/ml}$) com o mínimo gasto de reagentes.

MATERIAS E MÉTODOS

No experimento 1, mostrou-se que a metodologia colorimétrica do Salicilato foi bem mais eficiente nas determinações do NH_4^+ em extratos de solo com KCl 2M do que a metodologia do Indofenol. Também, foi verificado que esta metodologia produziu resultados tão exatos e precisos quanto a metodologia padrão de destilação a vapor, sendo contudo, muito mais sensível. Dessa forma, neste experimento, adaptou-se a metodologia do Salicilato ao sistema de fluxo contínuo

(FIA), visando-se maior velocidade na obtenção dos resultados, e a comparou, juntamente com um sistema FIA para NO_3^- (Giné et al, 1980), à metodologia de destilação a vapor baseando-se nos resultados obtidos na análise de padrões e de vários solos.

Material e reagentes utilizados:

Os padrões analisados foram feitos em KCl 2M, assim como a extração de N mineral dos solos, seguindo a proporção de 5 de KCl para 1 de solo. As concentrações dos padrões foram de 0.05; 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 1.0; 2.0 $\mu\text{gN/ml}$, tanto para NH_4^+ como para NO_3^- . Os solos utilizados tem suas características químicas demonstradas na Tabela 4.

O equipamento para o sistema de fluxo contínuo, consta de um espectrofotômetro digital (Micronal, mod. B342) equipado com célula para fluxo contínuo, uma bomba peristáltica com 6 canais (Micronal, mod. B332II) com tubos de tygon (as vazões estão especificadas para cada método), um comutador-injetor de amostras (fornecido pela Micronal) equipado com bobinas de reação, tubos capilares (0.5 mm de diâmetro) para as conexões e um registrador. Para a destilação a vapor utilizou-se o mesmo equipamento e reagentes descritos no experimento 1.

- Destilação a vapor:

Seguiu o mesmo procedimento do experimento 1.

Tabela 4 . Resultados da análise química dos diferentes solos utilizados na comparação da metodologia de fluxo contínuo (FIA) e destilação a vapor.

Solos	pH	C%	N%	Ca+Mg -meq/100g-	Al	P - ppm -	K -
LE	4.5	1.44	0.11	1.4	1.2	4.6	73
PlanossoloA	4.9	0.90	0.10	3.0	0.4	8.9	51
PlanossoloB	4.6	0.57	0.05	0.8	0.5	4.0	34
PVd	5.7	0.72	0.09	4.6	0.1	5.2	54
AQ (0-5cm)	5.0	0.51	0.05	1.5	0.3	3.3	42
AQ (60-100cm)	4.3	0.21	0.01	0.4	0.6	1.3	24
LA	4.6	1.26	0.07	0.4	0.7	1.2	19
LVA	4.7	0.87	0.07	1.0	0.4	1.6	38
LR	4.5	2.10	0.17	2.7	1.0	3.5	92
Turfa	4.0	7.26	0.54	11.4	3.4	62.5	210

LE - Latossolo vermelho-escuro

A - Camada de 0-10cm

B - Camada de 30-40cm

PVd - Podzólico vermelho distrófico

AQ - Areia quartzosa

LA - Latossolo amarelo

LVA - Latossolo vermelho amarelo

LR - Latossolo roxo

- Sistema FIA para NO_3^- :

Reagentes (massa dos solutos para 100ml de solução)

R₁ - 2g de sulfanilamida
 0.1g de N-naftiletilenodiamôniodicloreto
 10 ml de H_3FO_4 80%

R₂ - 10g de NH_4Cl
 2g de Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
 0.1g de EDTA-Na

Limalha de cádmio (20-40 mesh), CuSO_4 e HCl .

Vazão dos tubos de tygon da bomba peristáltica:

R₁ - 1.0 ml/min; R₂ - 0.6 ml/min; Carreador (água destilada) - 5.07 ml/min; amostra - 2.70 ml/min.

Procedimentos:

O sistema para NO_3^- foi montado por Giné et al (1980), onde adaptou-se a metodologia de colorimetria de NO_2^- que segue a reação de Griss-Ilosvay. Neste sistema incluiu-se uma coluna de Cádmio para redução do NO_3^- à NO_2^- . Este sistema já A bastante utilizado para análise desta forma mineral, não necessitando de qualquer comprovação. Contudo, o método foi descrito e comparado à destilação a vapor, confrontando-se as análises dos padrões, para complementação

do trabalho visando um efeito didático e como fonte de consulta.

A disposição dos componentes do sistema está mostrada na Figura 4. A quantidade da amostra a ser analisada é proporcional ao comprimento do "loop". Para análise de até 0.01 ugN/ml, usa-se um comprimento de 100cm. Contudo, neste trabalho, foram comuns concentrações de até 0.05 ug/ml, bastando um "loop" com comprimento de 50cm. A amostra é comutada para o carreador movimentando-se o corpo central do injetor-comutador através de uma alavanca. A amostra recebe o reagente 2 e então passa pela coluna de cádmio. Antes da análise, a coluna de cádmio deve ser cuperizada, o que é feito bombeando-se HCl 0.1M por 2 min., em seguida água destilada por 2 min., CuSO₄ 0.1M por 3 min. e finalmente água destilada até que não se observem vestígios da solução anterior. Após passar pela coluna de cádmio, a amostra recebe o reagente 1, seguindo até o espectrofotômetro após percorrer cerca de 80 cm de tubo capilar. A leitura de absorbância é feita a um comprimento de onda de 532nm.

cálculos:

Fazendo-se uma regressão linear entre as concentrações dos padrões e os respectivas comprimentos dos picos obtidos no registrador, encontra-se um fator de transformação da leitura das amostras em concentração (geralmente em ugN-NO₃⁻/ml).

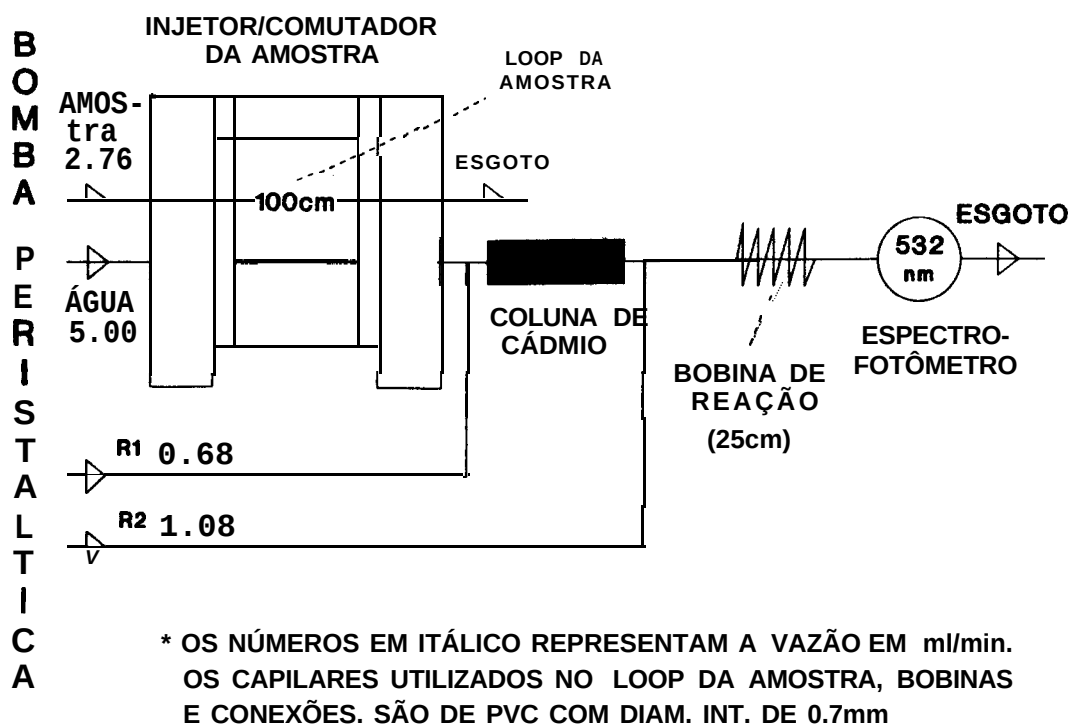


Figura 4. Esquema de funcionamento do sistema FIA-NO₃⁻ para análise em extratos de solo em KCl 2M.

Para obtenção da concentração em relação ao solo multiplica-se a concentração de N obtida acima pelo volume total de KCl utilizado na extração de N da amostra e divide-se pelo peso da amostra de solo seco em Kg. Obtém-se então mg $\text{N-NO}_3^-/\text{Kg}$ de solo.

- Sistema FIA para NH_4^+

Para uma primeira aproximação, utilizaram-se os reagentes relacionados no experimento 1 com as mesmas concentrações já relacionadas. Utilizou-se, como base para efetivação dos testes de melhoria do sistema, o padrão de $1.0 \text{ ugN-NH}_4^+/\text{ml}$ de solução em KCl 2M. As vazões utilizadas inicialmente, foram escolhidas com base apenas na experiência obtida da literatura que mostra a necessidade de se utilizar maior proporção do reagente em relação a amostra para acelerar o desenvolvimento da cor, sendo que a relação entre o reagente salicilato-nitroprussiato e o tampão-citrato ficou em 1:1 ao invés de 2:1 utilizada na metodologia manual. Para uma primeira aproximação, trabalhou-se com 2 bobinas de reação (cerca de 300 cm de tubo capilar, localizadas antes do espectrofotômetro, onde a reação se processa).

Várias testes foram feitos a partir desta configuração:

O primeiro teste foi em relação à temperatura, visto que à temperatura ambiente o desenvolvimento da cor

leva cerca de 2 horas (Kempers & Zweers, 1986). Foram testadas as temperaturas de 50, 60 e 70°C para verificar o desenvolvimento da cor. A temperatura deve ser constante, o que é conseguido pelo uso de um banho-maria com agitação e variação mínima de temperatura (0.5°C). Como o sistema teve que funcionar a alta temperatura, a água destilada, carreadora da amostra, teve que ser pré-aquecida até início de ebulição para diminuir a formação de bolhas na célula do espectrofotômetro. Para maior redução das interferências, a água pré-aquecida foi mantida dentro do banho-maria.

No segundo teste variou-se a concentração do nitroprussiato de sódio, catalizador da reação. Conforme Boaventura (USP-ESALQ, informação pessoal), o aumento da concentração deste reagente pode aumentar bastante a sensibilidade do método pelo aumento da velocidade da reação, visto que no sistema FIA, o desenvolvimento da cor não é completo devido ao pouco tempo de permanência da amostra no sistema (em média 30s). Foram testadas para 100ml de solução do reagente 1, 20mg; 25mg; 30mg; 40mg e 50mg de nitroprussiato.

Em seguida, como o salicilato de sódio é a substância responsável pelo aparecimento da cor, foram testadas para 100ml do reagente 1, 10g; 20g; 30g e 40g deste composto.

Foram testadas, também, várias Vazões para o reagente 2 (citrato de sódio) para se verificar o efeito de diluição do salicilato de sódio. As vazões consideradas foram: 2,0ml/min; 1.06ml/min; 0.8ml/min; 0.58ml/min e 0.18ml/min.

Quanto ao comprimento do "loop" (volume da amostra), partiu-se de um "loop" de 100cm e então foram testados os comprimentos de 75cm e 50cm.

Para todos os testes trabalhou-se com o reagente 3 (água sanitária com 5% de cloro ativo) na vazão de 1.06ml/min.

O objetivo de todos os testes foi o de minimizar os gastos com reagentes sem perda significativa de sensibilidade.

A disposição do sistema está mostrada na Figura 5. A amostra é comutada para o fluxo do carreador (água destilada), quando recebe uma mistura dos reagentes salicilato/nitroprussiato e tampão/citrato. Em seguida entra em contato com a fonte de Cl^- (água sanitária) e segue para as bobinas de reação imersas em banho-maria. Daí passam pelo espectrofotômetro onde tem sua leitura de absorbância feita a 647 mn.

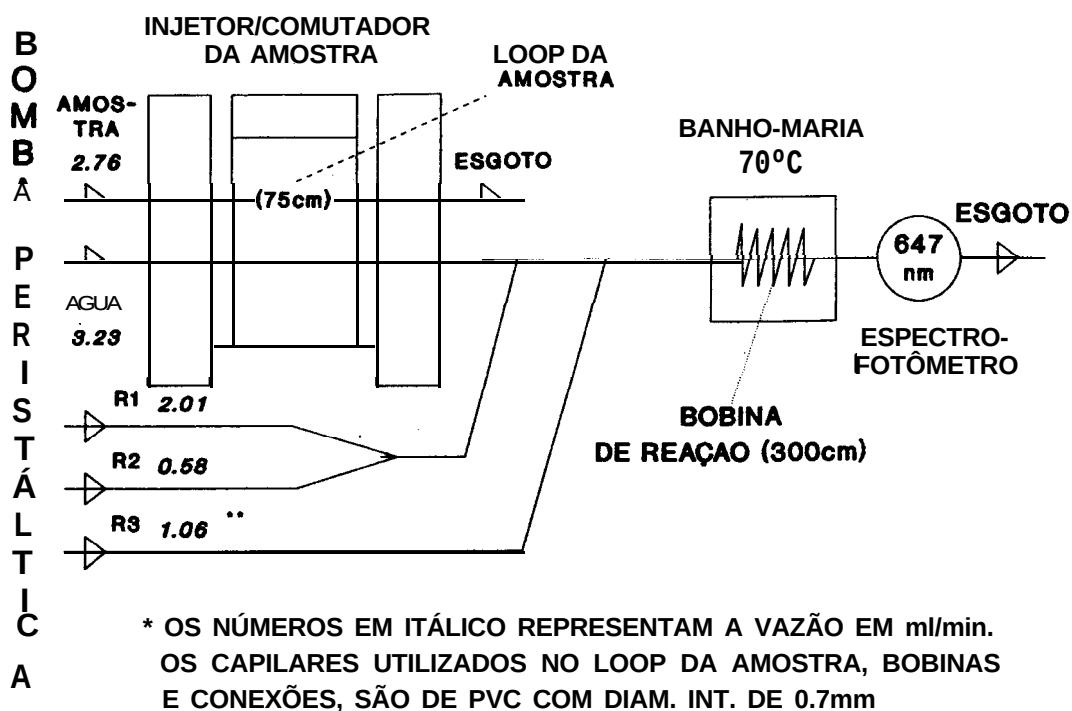


Figura 5. Esquema de funcionamento do sistema FIA- NH_4^+ para análise em extratos de solo em KCl 2M.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais vantagens da técnica de fluxo contínuo sobre a técnica manual (convencional) está na velocidade de quantificação de N nas amostras (cerca de 30 segundos/ por íon). Como na técnica de fluxo contínuo a reação não se completa, alguma perda de sensibilidade, necessariamente, vai ocorrer em comparação com a metodologia manual. Contudo foi possível medir concentrações de NH_4^+ em torno de 0.05ug/ml equivalente a uma concentração no solo de 0.25ug/g.

Na Figura 6, é mostrado o efeito da temperatura sobre a velocidade da reação colorimétrica. Aos 70°C, obteve-se o maior comprimento do pico correspondente ao padrão de 1.0 ugN/ml. Este resultado é esperado, uma vez que as reações químicas são aceleradas com o aumento da temperatura. Aumentando-se ainda mais a temperatura, certamente se conseguiria maior sensibilidade, refletindo no maior

comprimento do pico, contudo o funcionamento do sistema em temperaturas mais altas implicaria, segundo o fabricante, em um maior desgaste das tubulações plásticas (ateração das vazões), e a uma maior incidência de bolhas de ar dentro da célula de fluxo.

Nesta reação colorimétrica, o nitroprussiato entra como reagente catalítico. Aumentando-se as concentrações deste reagente, espera-se que a reação seja acelerada. Observa-se que na dose de 75mg de nitroprussiato por 100ml de solução (Figura 7), obteve-se um incremento bastante significativo na sensibilidade do método. Doses maiores de nitroprussiato provavelmente aumentariam ainda mais a sensibilidade, contudo quanto maior a concentração deste reagente, mais escura se tornaria a solução. O escurecimento da solução impede a correção do espectrofotômetro para o ponto zero de absorbância, o que é fator limitante para o sucesso das análises.

Um dos principais responsáveis pela formação da cor nestas reações, é o reagente salicilato de sódio. Testando-se vários níveis de concentração deste reagente, encontrou-se que a dose de 30g/100ml, associada à concentração ótima de nitroprussiato (75mg/100ml), foi a máxima possível para melhorar significativamente a sensibilidade do método e permitir perfeito funcionamento do aparelho (Figura 8). A partir de 40 g/100ml deste reagente

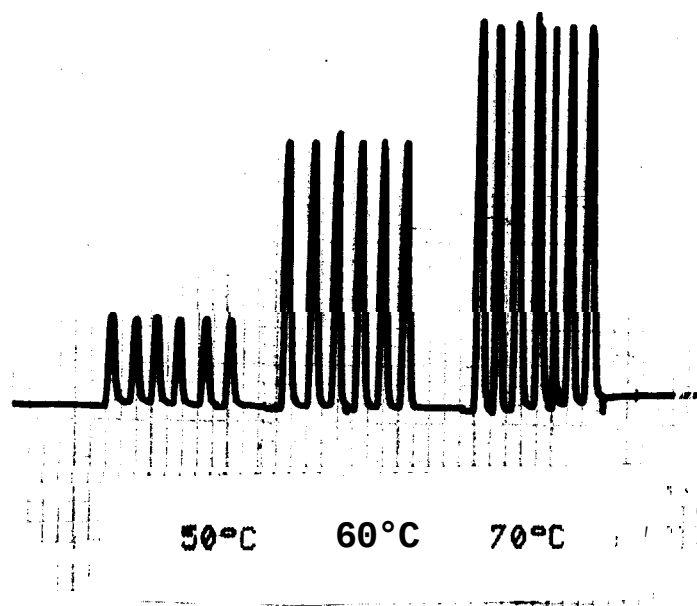


Figura 6. Efeito da temperatura sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml

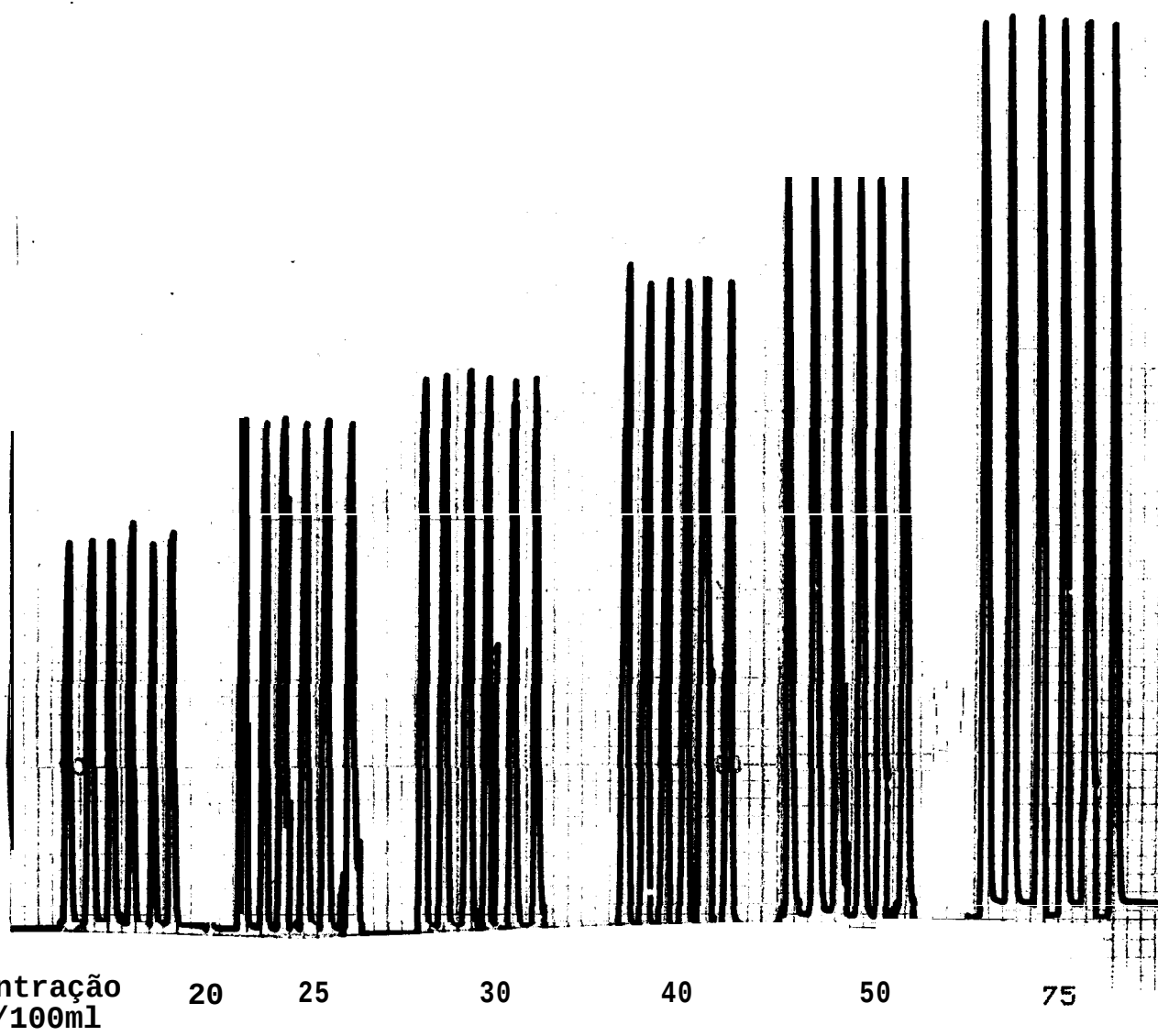


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml

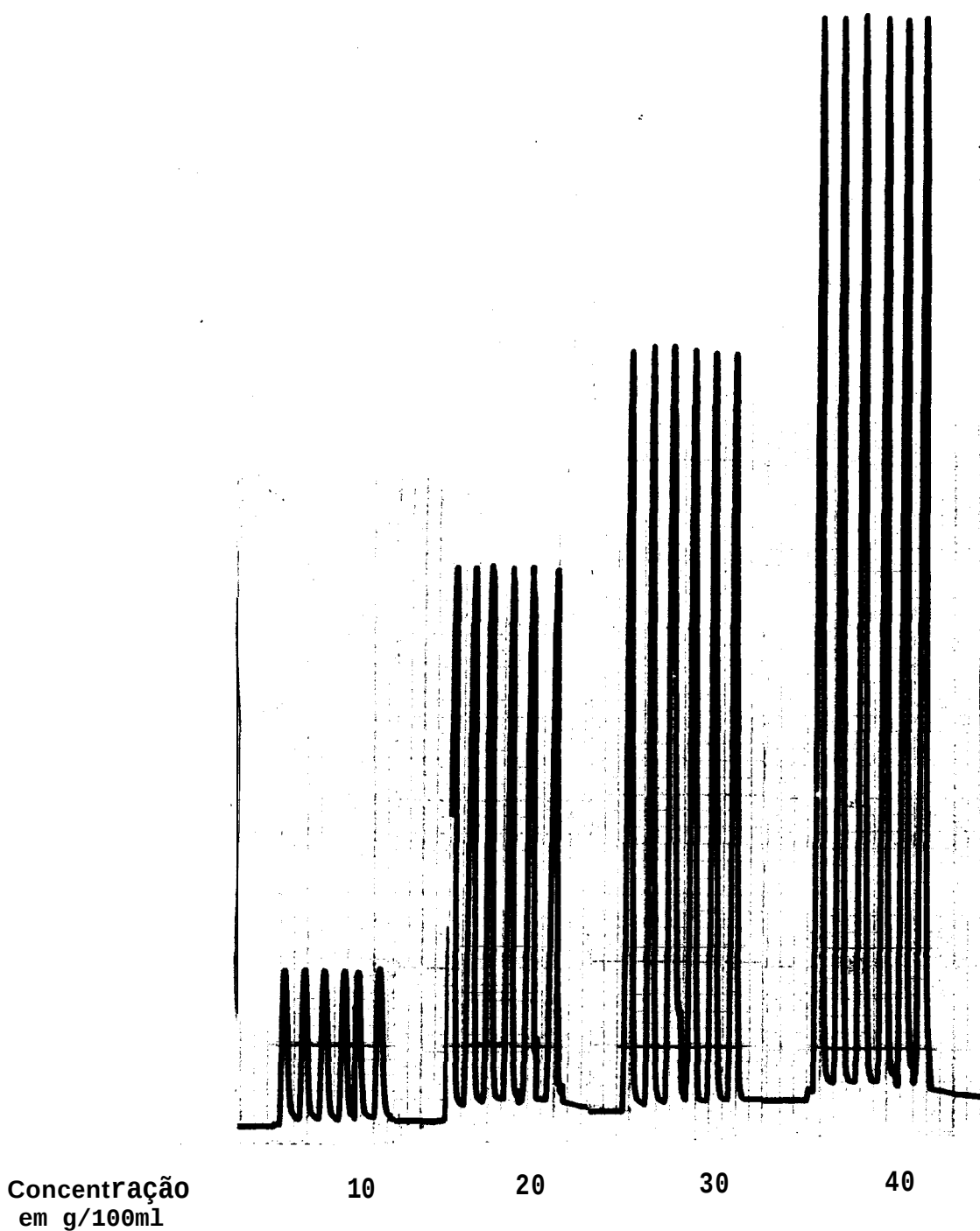


Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de salicilato de sódio sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml

ocorreu um aumento da absorbância na passagem do branco, produzindo o mesmo efeito negativo relatado para o teste com nitroprussiato.

A vazão do reagente tampão-citrato de 0.58 ml/min. produziu excelente resultado no aumento da sensibilidade do método (Figura 9). Tal fato é explicado pela menor diluição do reagente salicilato-nitroprussiato. A diminuição da vazão do reagente tampão-citrato não prejudicou o método pois a vazão de trabalho inicial (2.0 ml/min) estava muito acima da recomendada para a metodologia manual. Desta forma, a relação amostra/reagente tampão-citrato para o trabalho com FIA resultou-se na mesma utilizada para a metodologia manual. Com esta vazão, o efeito quelante do citrato é o mesmo recomendado por Kempers & Zweers (1986) e como demonstrado na Tabela 5, a redução na vazão do reagente tampão-citrato não proporcionou redução significativa do pH, que permaneceu ao redor de 12 para o desenvolvimento da reação de Bertholet (Dorich & Nelson, 1983). Por outro lado, como mostrado na Figura 9, a simples redução da vazão do tampão, proporcionou um grande aumento na sensibilidade do método, quando foram testadas duas concentrações de salicilato de sódio. Com isso, optou-se pela redução da concentração de salicilato para 20g/100ml, suficiente para uma boa sensibilidade (0.05ugN/ml) com grande redução de gasto do reagente.

Tabela 5. Efeito de diferentes vazões do reagente tampão/citrato sobre o pH final na análise colorimétrica de NH_4^+ através do sistema FIA-Salicilato.

Vazão (ml/min)	pH final da solução
2.01	12.63
1.06	12.48
0.80	12.46
0.58	12.30
0.18	12.21

 * Partiu-se de uma solução em KCl 2M com pH 3.24 para simular uma amostra ácida.

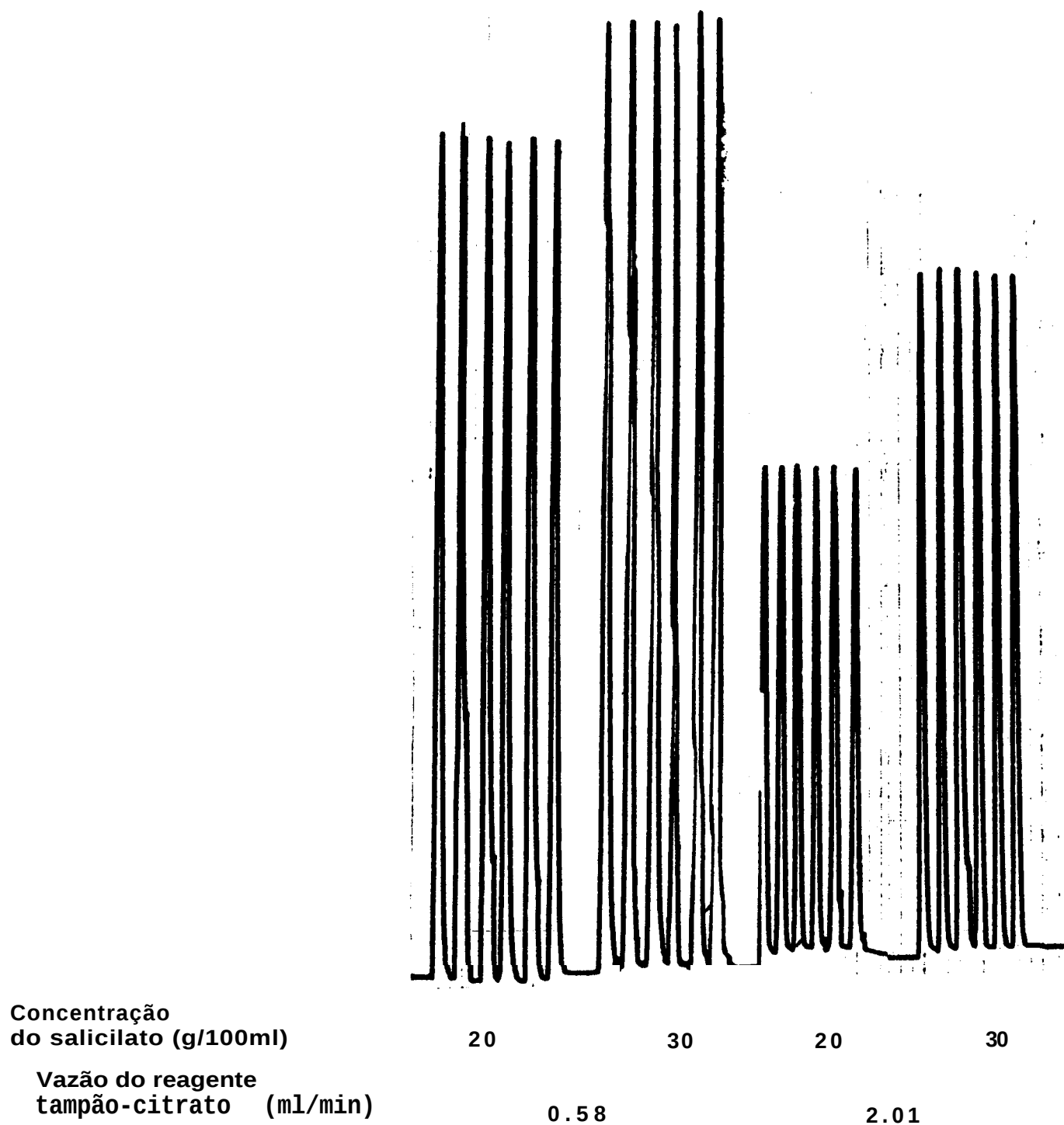


Figura 9. Efeito da vazão do reagente tampão-citrato no desenvolvimento da reação em duas concentrações de salicilato de sódio representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml

O volume da amostra, obtido no "loop" de 75cm, trouxe resultados muito semelhantes aos observados com o "loop" de 100cm, sendo que para o comprimento de 50cm, houve uma sensível queda no comprimento do pico (Figura 10).

A utilização de 2 bobinas de reação (total de 300 cm de capilar) proporcionou excelentes resultados para o método, permitindo a obtenção de excelentes picos com uma velocidade de análise em torno de 60 a 80 amostras por hora.

Como resultado final, as concentrações dos reagentes e as respectivas vazões ficaram assim definidas:

- amostra -vazão de 2.76ml/min
- carreador (água) - vazão de 3.23 ml/min
- reagente 1 - 20g/100ml de salicilato de sódio + 75mg/100ml de nitroprussiato de sódio - vazão de 2.01ml/min
- reagente 2 - 9g/100ml de citrato de sódio + 4g/100ml de hidróxido de sódio - vazão de 0.58ml/min
- reagente 3 - hipoclorito de sódio 5% - vazão de 1.06ml/min

A Figura 5 mostra o esquema detalhado de funcionamento do sistema FIA para análise de NH_4^+ .

Por outro lado, tanto a metodologia FIA para análise de NO_3^- (Giné et al, 1980), quanto para análise de NH_4^+ (desenvolvida neste trabalho) produzem picos proporcionais à concentração das respectivas formas minerais

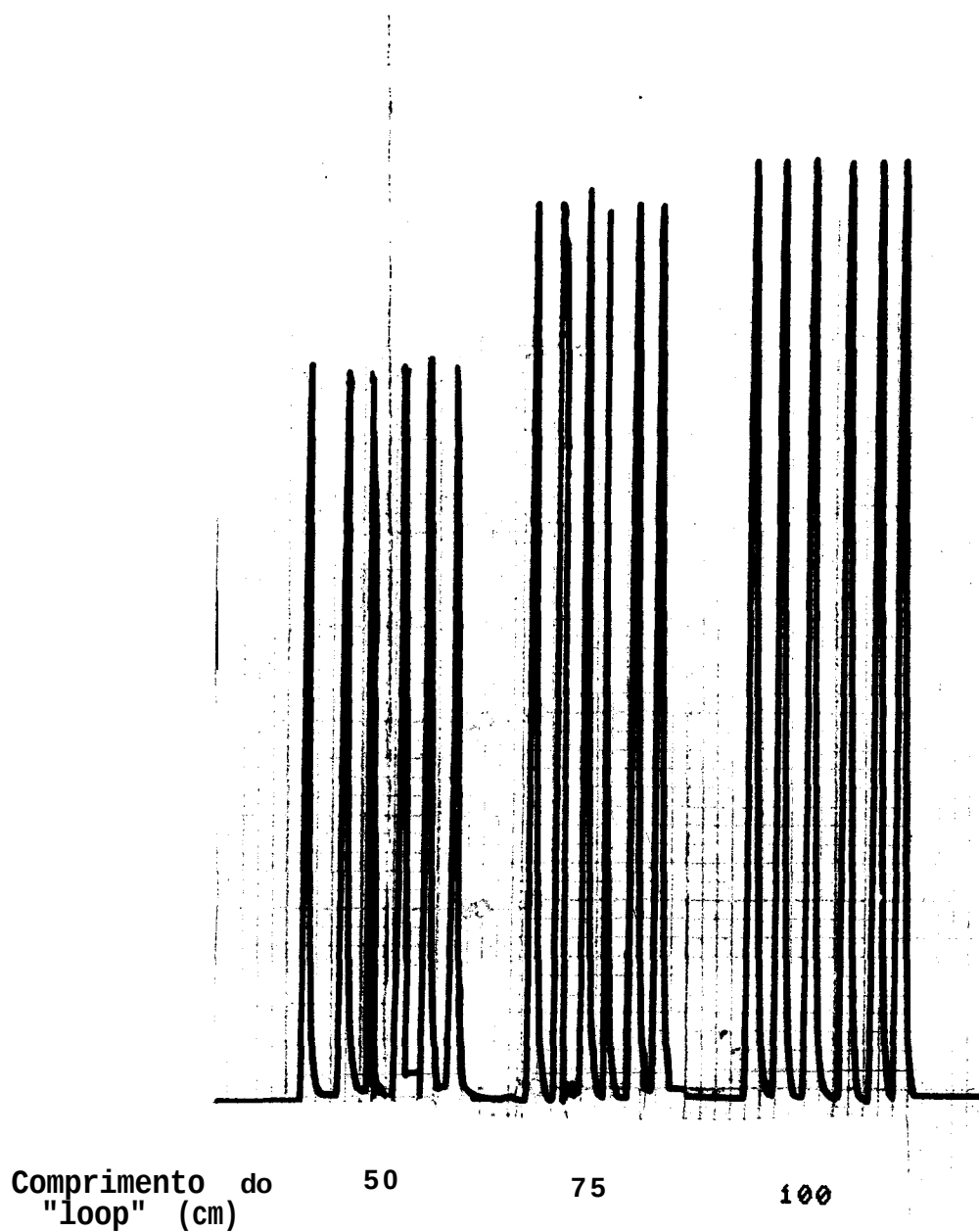


Figura 10. Efeito do comprimento do "loop" (volume da amostra) sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml, na vazão de 0.58ml/min do reagente tampão/citrato

(Figuras 11 e 12, respectivamente), viabilizando a sua aplicação a análise do N mineral extraído em KCl 2M.

Para análise de NO_3^- em amostras de solo, Giné et al (1980) discute detalhadamente o desempenho da metodologia FIA- NO_3^- .

A metodologia do Salicilato adaptada ao sistema de fluxo contínuo, funciona à condição de elevada temperatura e pH, muito semelhantes aos sistemas automatizados (auto-analizadores), o que pode induzir a hidrólise de aminoácidos presentes no extrato (Searle et al, 1990), superestimando a concentração de NH_4^+ no solo (Burton et al, 1989). Contudo, observando-se o excelente resultado da comparação entre as determinações da metodologia FIA com as obtidas pela destilação a vapor (padrão) (Figura 13) na análise de 10 solos quimicamente contrastantes, especialmente em C e N, conclui-se que para estes solos, ou a concentração de aminoácidos extraídos é bastante pequena ou esta metodologia não produz o mesmo efeito negativo observado nos auto-analizadores, possivelmente pelo menor tempo de permanência da amostra dentro do sistema FIA.

Com o uso desta técnica para NH_4^+ , com sensibilidade de 0.05 ugN/ml, e a técnica de Giné et al (1980) para NO_3^- , que é ainda mais sensível (0.02 ugN/ml), consegue-se analisar cerca de 60 amostras por hora para cada íon, facilitando muito a análise rápida de grande quantidade de

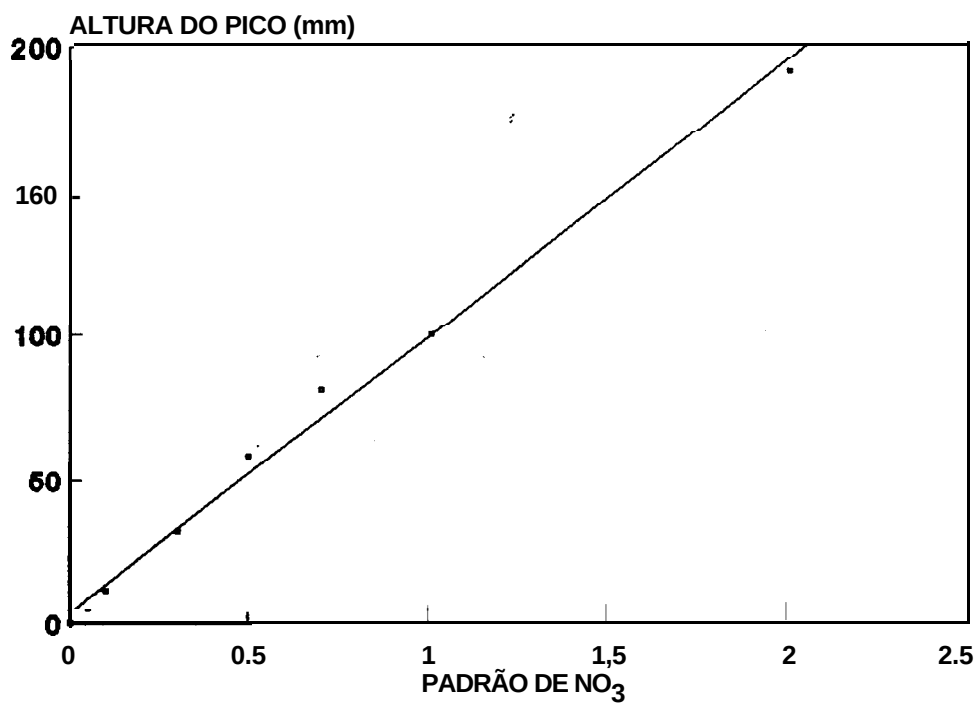


Figura 11. Comportamento do comprimento do pico de leitura de absorbância através do sistema FIA-NO₃⁻ de várias padrões em KCl 2M

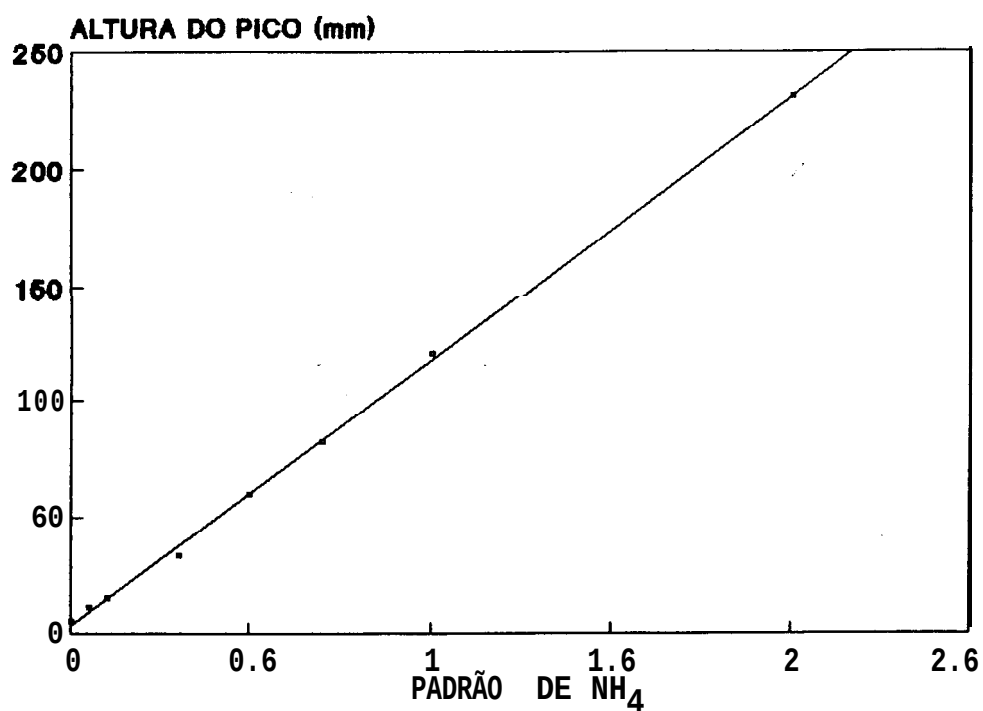


Figura 12. Comportamento do comprimento do pico de leitura de absorbância através do sistema FIA- NH_4^+ de várias padrões em KCl 2M

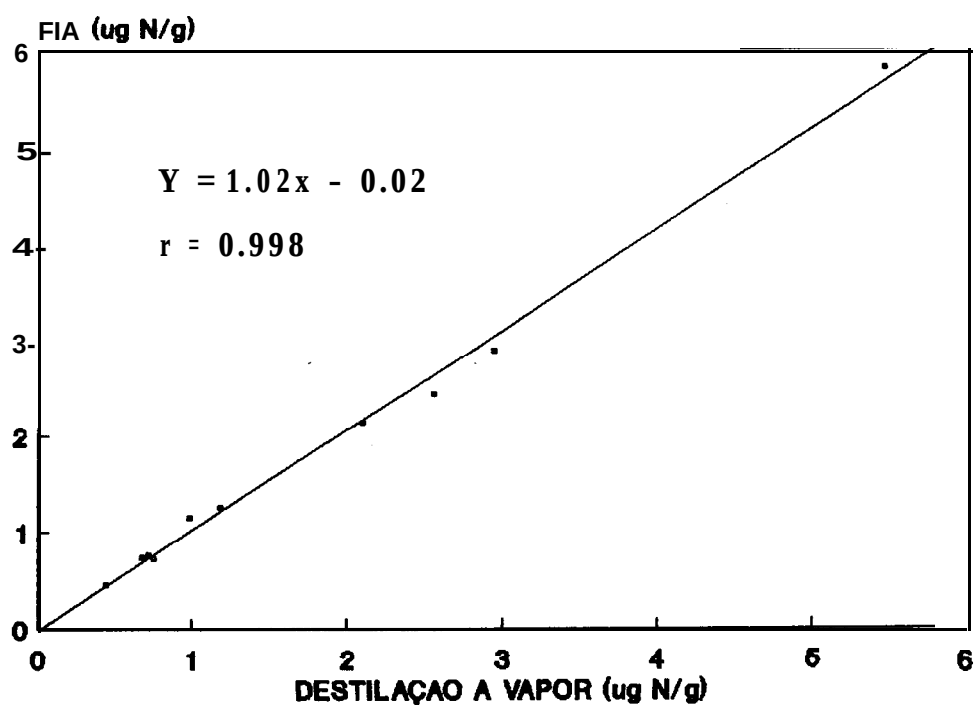


Figura 13. Correlação entre os resultados da análise de 10 diferentes solos através da destilação a vapor e da metodologia FIA-salicilato. Média de 5 repetições

amostras, como no caso dos estudos de mineralização de N *in situ*, que necessitam além da rapidez, alta sensibilidade nas determinações.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO N DO SOLO POTENCIALMENTE E DISPONÍVEL PARA A PLANTA COM BASE EM DOIS MÉTODOS DE INCUBAÇÃO

INTRODUÇÃO

Na área de fertilidade do solo, o N é um dos macronutrientes mais estudados, sendo, certamente, um dos quais a disponibilidade para as plantas é, na maioria dos casos, imprevisível através da análise rotineira.

O insucesso de muitas metodologias próprias para análises rotineiras está relacionado ao pouco conhecimento quanto às diversas fontes e drenos do N do solo, assim como a extrema dinâmica deste elemento alterada constantemente pelos inúmeros fatores que atuam sobre a sua forma mineral.

Entre os muitos métodos estudados, alguns apenas indicam uma certa concentração de N presente no solo que poderá estar disponível para a planta, apontando a necessidade ou não de adubação complementar (Magdoff et al, 1990, por exemplo). Outros métodos fornecem não só o N potencialmente disponível, como também a taxa de mineralização, dando uma melhor idéia a respeito da época e

da quantidade de adubo a ser aplicada (metodologias de incubação, Keeney, 1982). Contudo, o pré-tratamento das amostras de solo usadas nestas metodologias e a ausência dos efeitos climáticos (oscilações de temperatura e umidade que ocorrem no campo) afetam os resultados, superestimando ou subestimando a previsão da disponibilidade de N (Binkley & Hart, 1989). Face a estes problemas, as metodologias de avaliação *in situ* tem sido bastante utilizadas nos estudos envolvendo a dinâmica de N no solo, consideradas ideais para estimar os produtos dos vários processos que governam a disponibilidade de N. Entre elas destaca-se a metodologia de colunas proposta por Raison et al (1987), que também fornece uma estimativa do N extraído pela planta, possibilitando uma aferição através da comparação com o realmente acumulado pela planta.

A utilização de modelos matemáticos para descrever a mineralização do N considerando funções que representam o efeito dos fatores ambientais sobre a mineralização (Stanford et al, 1973a; Stanford & Epstein, 1974; MacDuff & White, 1985) tem sido utilizados com relativo sucesso, baseando-se na comparação com o desempenho das plantas (Stanford et al, 1973; Smith et al, 1977). Por outro lado, se as comparações fossem feitas baseando-se nas estimativas obtidas da incubação *in situ* (ex. Hadas et al, 1989), os modelos poderiam ser melhor avaliados, pois a

comparação seria em função da mineralização e não do N retirada pela planta.

Neste sentido, objetivou-se neste trabalho, comparar as estimativas da metodologia de Raison et al (1987), com o N extraído pela planta, assim como avaliar as estimativas da mineralização do N (Stanford & Smith, 1972) fornecidas por um modelo que considera os efeitos das variações climáticas conforme Stanford et al (1973a) e Stanford & Epstein (1974).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- As reservas de Nitrogênio no solo

De todo o N existente no planeta, a litosfera detém a maior parte (98%), estando o restante principalmente na atmosfera (1.98%) (Stevenson, 1982). Os 0.02% restantes, contidos na matéria orgânica do solo, fundo do mar, rios, lagos e organismos vivos, são os principais responsáveis pela manutenção da vida dos animais e vegetais do planeta (Wauck & Tanji, 1982).

No solo, apenas uma pequena percentagem do total de N está prontamente disponível para as plantas (Bremner, 1965; Young & Aldag, 1982). Agronomicamente, NO_2^- e NH_4^+ trocáveis são as formas de N mais importantes. Segundo Harmsen & Kolenbrander (1965), a concentração destas formas é bastante flutuante durante o ano, estando dependente do regime de chuvas e das oscilações de temperatura. A presença de raízes ativas também contribuem para a baixa

disponibilidade de N-mineral na solução do solo, como é observado nas pastagens do cerrado do Brasil, onde as concentrações amoniacais e nítricas são muito baixas (freqüentemente menores do que 2 ugN/ml).

Pode-se dizer que o solo apresenta duas importantes reservas de N para as plantas. Uma delas de grande potencial somente para alguns solos, correspondente à fixada nas argilas (Nommik & Vahtras, 1982), e a outra de grande valor para quase todos os solos, compreendendo à reserva orgânica (Stevenson, 1982c).

. NH_4^+ fixado às argilas

O processo de fixação está diretamente relacionado às argilas do tipo 2:1. Cada unidade celular destes minerais consiste de uma camada octaédrica de Al-O-OH localizada entre duas camadas de Si-O. Como resultado da substituição isomórfica dos íons Si^{+4} e Al^{+3} por cátions de mesmo tamanho e menor valência, a unidade estrutural adquire carga negativa que pode ser balanceada por cátions como o NH_4^+ (Bohn et al, 1985). A fixação caracteriza-se pelo balanceamento das cargas no espaço entre as camadas. Segundo Nommik & Vahtras (1982), a porção fixada encontra-se em equilíbrio com a porção em solução, onde a liberação do NH_4^+ fixado aumenta por qualquer diminuição do NH_4^+ em solução, sendo o contrário verdadeiro. Keerthisinghe et al (1985)

observaram um aumento nas quantidades de NH_4^+ fixado quando se adicionava fertilizante nitrogenado, e que a reserva de N fixada nas argilas contribuiu significativamente para a nutrição das plantas. Contudo, como comentado anteriormente, este mecanismo é exclusivo de argilas 2:1, sendo de pouca importância para a maioria dos solos tropicais úmidos, onde existe o predomínio de argilas do tipo 1:1, óxidos de Fe e Al, quartzo e materiais amorfos (Camargo e Falesi, 1974; Adámoli et al, 1986).

. A reserva orgânica de N

Mais de 90% do total de N dos solos, encontra-se combinado a esqueletos de carbono (Stevenson, 1982b). O N-orgânico dos solos tem sido parcialmente caracterizado, geralmente após hidrólise química, como aminoácidos, aminoaçúcares, bases purinicas e pirimidinicas (Stevenson, 1982b). Aminoácidos e aminoaçúcares, por serem mais abundantes e prontamente metabolizáveis por microrganismos, assumem importante papel no suprimento rápido de N-mineral. Nas regiões tropicais, aminoácidos e aminoaçúcares podem representar até 50% da fração orgânica dos solos (Sowden et al, 1977; Rowalenko, 1977; Dalal, 1978). Contudo, apenas uma pequena quantidade destes compostos nitrogenados se encontra disponível na solução do solo, cerca de 2 ug/g (Stevenson, 1982). O restante, por estar em interação com argilas e

substâncias aromáticas no solo, parece estar protegido da decomposição imediata (Smith, 1982). Mafavolta (1990), considerando os teores de N do solo em vários levantamentos pedológicos para fins de fertilidade de solos brasileiros, concluiu que os maiores teores de N estão relacionados à solos com textura média e argilosa e com a cobertura vegetal, o que faz crer que, a interação entre compostos orgânicos e minerais do solo deva ser um importante fator no controle da disponibilidade de N.

A matéria orgânica estável do solo (humus) é caracterizada pela sua solubilidade em tratamentos alcalinos e ácidos, sendo então dividida em três frações: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas. O processo de humificação pode ser definido, numa forma simplificada, como sendo um processo de polimerização de unidades estruturais, oriundas da decomposição de resíduos de animais plantas e microrganismos (Schnitzer, 1977) onde se incluem os aminoácidos e os aminoaçúcares. Dessa forma, o processo de humificação mostra-se como um dos principais responsáveis pela redução da disponibilidade de compostos nitrogenados no solo (Ländesmäk & Piispanem, 1989). A estabilidade da matéria orgânica do solo aumenta com o avanço da humificação, sendo este processo acelerado por altas temperaturas e umidade, situação característica das regiões tropicais. Nascimento et al (1988), fracionaram a matéria orgânica de um latossolo do

Cerrado, encontrando que 78% desta estava na forma de huminas, 18% como ácidos fúlvicos e apenas 4% como ácidos húmicos. Esta tendência também foi observada em solo podzólico (Demétrio, 1988). Com base nestes dados, em condições tropicais úmidas, observa-se que as reservas de N estão contidas em compostos orgânicos de grande estabilidade (as huminas representam a fração mais estável da matéria orgânica), o que reflete numa lenta liberação de N para as plantas. A terra roxa estruturada, por exemplo, possui cerca de 10000 kg N/ha (0-100cm), todavia, é comum se observar deficiência de N em plantas que nela se desenvolvem (Urquiaga et al, 1984).

- Fontes externas de N

A precipitação pluviométrica e a fixação biológica de N_2 atmosférico são os principais processos que adicionam N aos solos, sendo responsáveis pela manutenção do ciclo do N no planeta.

. Adição de N via precipitação

As principais formas de N adicionadas por este processo são NH_3 , óxidos de N e N-orgânico (Legg & Meisinger, 1982). As formas gasosas amoniacal e orgânica originam-se de fertilizantes e de materiais orgânicos em decomposição, das excretas de animais e das queimadas. Já os óxidos parecem ser

formados a partir do N_2 nas descargas elétricas durante as tempestades (Stevenson, 1982), e também na queima de combustíveis fósseis em indústrias (Chamberlain et al, 1985). Em média, nas regiões tropicais, a adição de N via precipitação próximo às zonas urbanas e industriais, chega a 8 kg/ha.ano (Urquiaga, 1982; Nadelhofer et al, 1985).

Adição via FBN

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo através do qual o N_2 atmosférico é reduzido a NH_3 por ação da enzima nitrogenase, presente em microrganismos diazotróficos (Alexander, 1977). A maior contribuição desta via está, hoje, relacionada às leguminosas, que apresentam simbiose com microrganismos específicos localizados em estruturas especiais que permite maior eficiência do processo redutor (Sprent & Sprent, 1990). Contudo, praticamente, quase todos os sistemas ganham N via FBN provenientes de microrganismos em associação ou de vida-livre, o que pode justificar a manutenção dos níveis de fertilidade de solos de ecossistemas naturais. Por outro lado, o desequilíbrio gerado em áreas onde se introduzem novas espécies vegetais não fixadoras de N, que embora sendo mais produtivas, são mais exigentes em N, como nas pastagens, tem levado a completa degradação dos solos.

Hidrolases, oxidases, deaminases etc, que agem sobre esses substratos, tem origem em várias fontes animais, vegetais e microbianas. Nos estágios iniciais de decomposição, a ação enzimática é extracelular, onde grandes moléculas são clivadas até unidades mais simples (Alexander, 1977).

A formação de NH_4^+ através da decomposição de proteínas, requer, primeiro que estas sejam hidrolisadas até aminoácidos, através das proteinases e peptidases. Os aminoácidos liberados e peptídeos, e algumas amidas, são posteriormente metabolizados, através de aminoácido-desidrogenases, aminoácido-oxidases e carbono nitrogênio-lisases, liberando NH_4^+ (Ladd & Jackson, 1982). Já os aminoaçúcares e aminopolissacarídeos, que ocorrem na forma de quitina, ácidos teitóicos e outros componentes das paredes celulares de bactérias, devem ser hidrolisados até aminomonossacarídeos para formação de NH_4^+ (Parsons, 1981). A uréia, produto da destruição de bases nitrogenadas contidas em ácidos nucleicos, e também de adubos e excretas animais, é rapidamente hidrolizada pela urease, enzima freqüentemente encontrada no solo oriunda de uma gama de microrganismos. A sua hidrólise, que produz uma elevação drástica do pH, faz com que ocorram grandes perdas de NH_3 do sistema. Tal efeito tem sido considerado como causa da queda de produtividade de pastagens sob atividade de pastejo (Cadisch et al, 1990).

Plantas que recebem alta contribuição de N proveniente da FBN, em especial as leguminosas, tem sido cultivadas em solos pobres em N a fim de aumentar as suas reservas através da incorporação da biomassa vegetal (Toledo, 1985; Duque et al, 1986), viabilizando economicamente a exploração agrícola. Alguns estudos onde gramíneas cresceram em consórcio com leguminosas, observou-se que as gramíneas acumularam significativas quantidades de N proveniente da FBN, através da decomposição de nódulos, raízes e liteira oriundos das leguminosas (Burity, 1985; Ta & Faris, 1987; Weaver, 1988).

- Transformações do N no solo

. Mineralização/imobilização do N do solo

Como citado anteriormente, a matéria orgânica detém a maior reserva de N do solo, que se torna disponível às plantas através da ação microbiológica. Este processo que transforma o N-orgânico em N-mineral é chamado mineralização. Por outro lado, a biossíntese de compostos orgânicos a partir do N mineralizado do solo é denominada imobilização.

.. Processo de mineralização ou amonificação

Materiais orgânicos de alto peso molecular recém adicionados ao solo são degradados por ação enzimática.

Segundo Alexander (1977), cerca de 105 a 107 organismos por grama de solo são amonificadores, porém é a natureza do substrato que irá caracterizar tais populações. Entre os inúmeros organismos estão bactérias aeróbicas, fungos e actinomicetos e, também certos organismos anaeróbicos. Em geral, as bactérias dominam ambientes neutros ou alcalinos, fungos ambientes ácidos, e bactérias anaeróbicas ambientes com baixo pO_2 (Alexander, 1977). A população de protozoários parece assumir um papel importante na disponibilidade de N, por atuar sobre as populações bacterianas, liberando mais rapidamente o N da biomassa para o solo (van Veen et al, 1985; Kuikman et al, 1991).

.. Mineralização x imobilização

Trabalhando em direções opostas, os dois processos destroem e constroem a matéria orgânica do solo. A diferença básica, esta no efeito líquida, a mineralização líquida ou imobilização líquida. A mineralização líquida, segundo Jansson & Pearsson (1982), é o efeito que normalmente prepondera nos solos, face a atividade básica dos organismos heterotróficos ser a dissipação da energia de ligação dos compostos orgânicos. De modo geral, cerca de 1 a 5% do N-orgânico do solo estabilizado é mineralizado anualmente (Campbell, 1977).

Sendo a mineralização ou imobilização um efeito do crescimento da biomassa microbiana do solo, a composição elementar do substrato orgânico em que os microrganismos se desenvolvem irá determinar o resultado líquida final. Se o substrato apresenta um teor de N baixo, a demanda microbiana por este elemento implicará numa redução de sua forma mineral presente na solução do solo, ocorrendo, então, imobilização. De forma contrária, altas concentrações de N no substrato implicarão em mineralização. Este efeito é bem demonstrado quando se adiciona glicose a uma solução com N, a princípio ocorre uma forte imobilização de N da solução e posteriormente, devido a oxidação do C, ocorre mineralização (Alexander, 1977). Baseando-se nestes princípios, a proporção C/N tem sido um parâmetro de grande valia para se avaliar a disponibilidade de N no solo. Materiais vegetais da maioria das culturas apresentam relações C/N que podem variar de 20 a 100, onde, uma vez sujeitos a degradação microbiana, irão promover a liberação de NH_4^+ , caso das leguminosas, ou forte imobilização, caso das gramíneas. Normalmente, a relação C/N dos solos, com matéria orgânica estabilizada, está em torno de 10, valor próximo à relação C/N da biomassa microbiana do solo (Alexander, 1977). Contudo, se tem notado que, mesmo estabilizado, a adição de material orgânico rapidamente metabolizável altera a taxa de mineralização do N nativo do solo através do estímulo à biomassa microbiana, sendo este

efeito identificado como "primming effect" (Boadbent & Nakashima, 1971; Westerman & Tucker, 1974). Face a identificação deste efeito ter sido conseguida a partir do uso de técnicas que utilizam isótopos radioativos em estudos de mineralização, Laura (1980), sugere que o aumento do N mineralizado nativo do solo tem origem proteolítica, onde os sais do fertilizante marcado proporcionam o rompimento das ligações dos grupamentos amino liberando-os em solução na forma de NH_4^+ . Não obstante se saiba da existência do "primming effect", por origem biológica ou química, muitas vezes um efeito aparente, de origem metodológica, pode ocorrer pela interação do fertilizante marcado com o N nativo do solo, gerando um "primming effect" virtual, como revisado por Boddey et al (1990).

Para explicar os efeitos das adições de C-orgânico e N no solo, Bosatta & Berendse (1984), propuseram um modelo que descreve a ciclagem do N em solo de floresta. Eles definiram um sistema deficiente em C como possuidor de substrato com relação C/N menor do que uma relação C/N crítica. Esta relação crítica, refere-se a razão entre a relação C/N dos microrganismos e a sua eficiência de assimilação de C. A partir do exposto por Bosatta & Berendse (1984), assumindo-se uma eficiência de assimilação em torno de 0.35 para biomassa do solo (Alexander, 1977) e uma relação C/N para esta mesma população em torno de 8.0, chega-se a uma

relação C/N crítica igual a 22.8. A adição de materiais orgânicos com relação C/N superiores a 22.8 proporcionarão imobilização temporária de N (Cadisch et al, 1992). De fato, considera-se para efeito prático, uma relação C/N igual a 22, a qual corresponde a um percentual de N no substrato da planta em torno de 1.8% (Urguiaga, informação pessoal), acima do qual haverá mineralização líquida de N. Deve-se salientar que o exposto não serve de regra para prever o destino do N no solo. Young & Aldag (1982), mostram que a presença de NH_4^+ fixado às argilas pode dificultar a interpretação da relação C/N, face a problemas com metodologia para quantificação de N-total, que incluem a fração fixada. Por outro lado, a presença de resíduos com altos teores de lignina, substância pobre em N, pode elevar a relação C/N do solo, muito embora não se observe imobilização do N-mineral (Jansson & Persson, 1982). Compostos como a lignina, praticamente tem mínima participação do ciclo de N no solo, de importância para os vegetais, indo, ao decorrer do tempo, compor a fração de N estável do solo. Dessa forma, Melillo et al (1989), propõem uma avaliação do estágio de decomposição da matéria orgânica do solo baseando-se no índice de lignocelulose ((lignina + carboidratos solúveis em ácido)/lignina), que segundo os mesmos está em torno de 0.7 em estágio final de decomposição. Logo, a avaliação dos teores de C e N nem sempre traduzem o

efeito da decomposição da matéria orgânica sobre a disponibilidade de N no solo.

Embora a disponibilidade de C e N sejam importantes fatores que atuam sobre o processo de mineralização/imobilização, fatores de ordem climática, edáfica e química ou um efeito integrado destes, devem ser considerados para se avaliar a disponibilidade de N no solo.

Fatores que afetam a mineralização/imobilização do N do solo.

Visto ser um processo de natureza predominantemente biológica, qualquer evento que interfira na atividade dos microrganismos acarretará numa alteração da taxa de mineralização.

Temperatura

A taxa de mineralização do N é bastante influenciada pela temperatura. Em estudo recente, baseando-se na evolução de CO_2 do solo, Grahammer et al (1991) mostrou que durante o dia, observa-se maior atividade biológica do que durante a noite, quando a temperatura é menor. De modo geral, é comum se observar acúmulo de matéria orgânica em regiões de clima frio, onde a população de amonificadores, que tem ótima atividade em torno dos 40°C , é bastante reduzida (Urquiaga et al, 1990). Gosz & White (1986)

mostraram uma redução da mineralização de N com a altitude, justificada pela diminuição da temperatura. Segundo Alexander (1977) em torno de 2°C a mineralização praticamente cessa, sendo interrompida em ponto de congelamento.

Stanford et al (1973), observaram que a um teor de umidade próximo a capacidade de campo, a função modificada de Arrhenius, $\log k = \log A - B/T$ (onde k é a taxa de mineralização, A é uma constante, B é o coeficiente angular da curva e T é a temperatura absoluta), com um coeficiente Q₁₀ de aproximadamente 2 (que significa que para uma variação de 10°C na temperatura, a taxa de mineralização dobra) geralmente descreve a relação entre a temperatura e a mineralização de N. Resultados semelhantes foram encontrados por Kladviko & Keeney (1987) estudando a mesma faixa de temperatura em 2 solos e por Nishio et al (1985), só que utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N. Outros trabalhos revelam coeficientes Q₁₀ para solo, maiores (2.5 - 4.1) (Tabatabai & Al-Khafaji, 1980) ou menores do que 2 (1.2 - 1.6) (MacDuff & White, 1985). Para a mineralização da liteira de florestas Emmer & Tietema (1990) encontraram um Q₁₀ em torno de 1.4. Não obstante as variações encontradas, o valor de Q₁₀ igual a 2 é comum a muitos solos, podendo ser útil para estimativas de N potencialmente mineralizável (N_o) do solo em situações onde as oscilações de temperatura devam

ser consideradas na avaliação da disponibilidade de N (Stanford et al, 1973; Smith et al, 1977).

Cassman & Munns (1980), mostraram resultados indicando que o efeito da temperatura sobre a mineralização do N não pode ser considerado isoladamente. Os dados obtidos neste trabalho revelam a existência de uma interação entre a temperatura e a umidade. Trabalhando neste sentido, Kladviko & Keeney (1987) não obtiveram significativos resultados a ponto de se invalidar a análise independente da temperatura e umidade, reforçando a necessidade de mais estudos nesta linha de modelos para mineralização.

Umidade/ pO_2

Conhecida como solvente universal, a água é o substrato para incontáveis reações que existem na natureza, daí sua importância para a sobrevivência dos seres vivos. A disponibilidade de água no solo controla a atividade de microrganismos, atuando no processo de mineralização de N no solo. Quanto a aeração do solo, pode-se dizer que é fator determinante do tipo de população microbiana que atuará na decomposição da matéria orgânica do solo.

Referindo-se a níveis de umidade abaixo da saturação dos poros do solo, ou seja em condições de aerobiose, a população fúngica assume papel principal na mineralização do N do solo (Alexander, 1977). Contudo, outros

fatores poderão contribuir para a modificação da população microbiológica do solo nas condições de aerobiose, como o pH que na faixa alcalina favorece à população bacteriana.

Mesmo abaixo do ponto de murchamento, a mineralização de N é ainda bastante significativa (Stanford & Epstein, 1974). Nestas condições, embora a água disponível seja mínima, a umidade relativa da atmosfera do solo ainda é bastante alta (em torno de 99%), o que parece permitir a atividade microbiológica, principalmente a atividade fúngica, menos exigente a umidade. Neste mesmo contexto, Stanford & Epstein (1974), mostraram que a mineralização do N ou a evolução de CO₂, a uma temperatura constante, diminuem linearmente com a redução do conteúdo de água no solo.

Um efeito de grande importância é a alternância no umedecimento e secagem, que segundo muitos autores, aumenta a mineralização do N do solo (van Veen et al, 1985; Seyfried & Rao, 1988; Kuikman et al, 1991). De acordo com Tuckneck & Oades (1983) e Cortez (1989), o aumento da mineralização se deve à morte da biota pela secagem do solo e consequente decomposição desta após reumedecimento, assim como pela desestabilização das ligações entre compostos nitrogenados e colóides do solo.

Sob condições de saturação aguosa, ou anaerobiose, o processo de mineralização se modifica drasticamente. Nestas condições, dois importantes aspectos

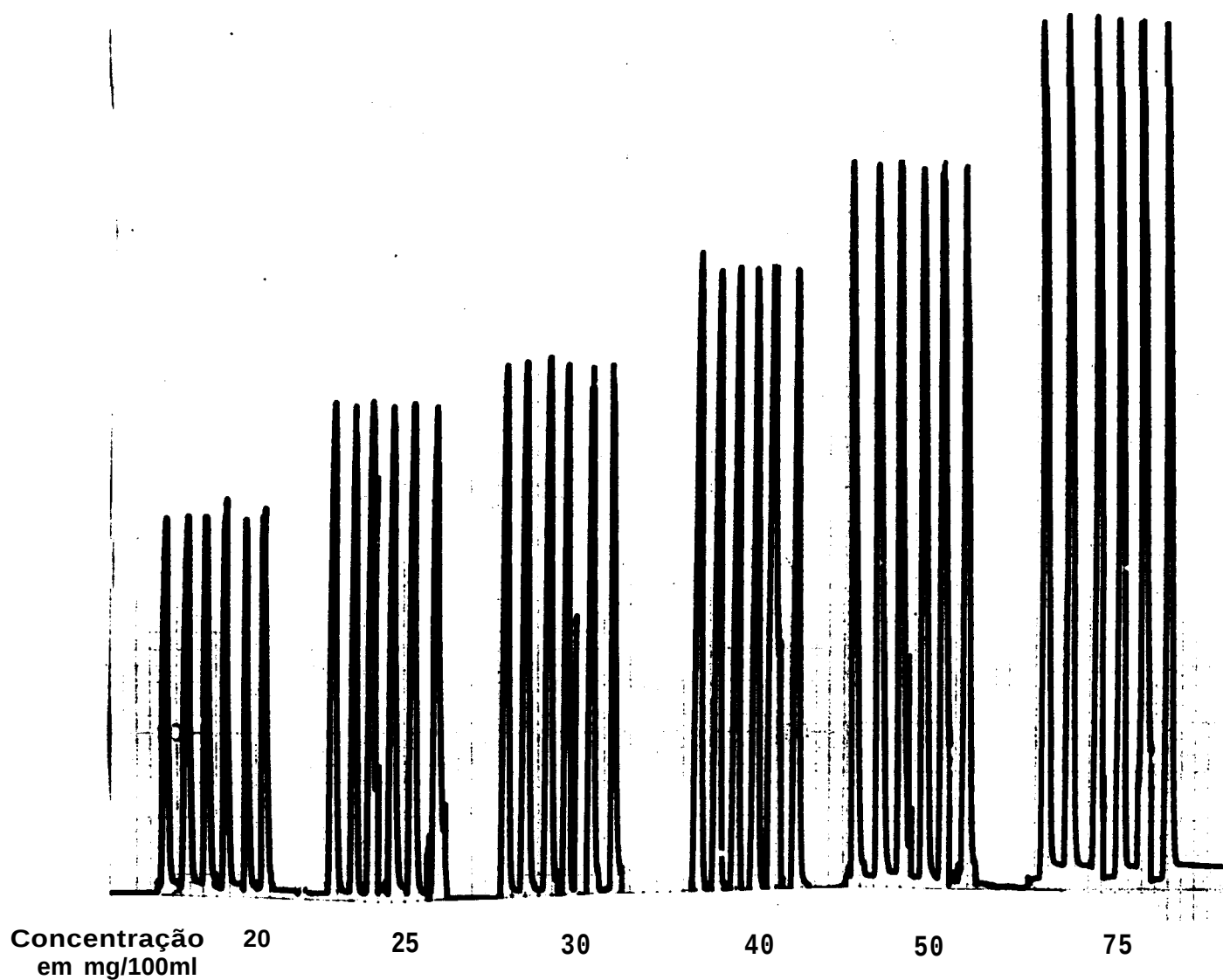


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio sobre o desenvolvimento da reação representado pela altura do pico do padrão 1.0 ugN/ml

podem ser destacados: primeiro, que a oxidação da matéria orgânica não é completa nas condições anaeróbicas, e segundo, está relacionado à natureza do produto final (Patrick Jr., 1982).

A decomposição anaeróbica é altamente dependente das bactérias anaróbicas que operam a níveis mais baixos de energia (Alexander, 1977). Tal fato é de grande importância na mineralização do N, pois em anaerobiose, a decomposição é incompleta, o que resulta em baixa produção de energia e menor síntese celular por unidade de C degradado. Dessa forma o baixo requerimento de N para constituição celular implica numa maior liberação de NH_4^+ para o solo (Campbell, 1977; Patrick Jr., 1982). Waring & Bremner (1964), mostraram que em 2 semanas, para cada 1 parte de N produzido aerobicamente, 1,23 eram produzidos anaerobicamente.

Não somente sob saturação aquosa do solo é esperada a anaerobiose, pois a adição de grandes quantidades de matéria orgânica de fácil decomposição pode promover o crescimento acelerado da população microbiana do solo, o que pode levar ao esgotamento das reservas de O_2 do solo (Glinski & Stepniewski, 1985).

Efeito do pH

O pH do solo é um dos principais fatores que agem sobre a população microbiana do solo, principalmente sobre os

nitrificadores (organismos que oxidam o NH_4^+ a NO_3^-). As fontes de acidez do solo incluem H_2CO_3 formado em altas concentrações de CO_2 originado da respiração de raízes e microrganismos, da mineralização de N e S, exudação de prótons das raízes, nitrificação etc (Thomas & Hargrove, 1984). Mesmo sendo um fator de grande importância na atividade microbiana, poucos trabalhos têm sido feitos neste sentido. Fu et al (1987), incubaram solos a 3 níveis de pH com adição de diferentes resíduos culturais. Como resultado, observou-se inicialmente imobilização de N em todos os tratamentos e posterior mineralização, porém a pH 4.0, o período de imobilização era mais pronunciado em relação aos níveis de pH 6.0 e 8.0. Neste mesmo trabalho observou-se aumento na mineralização com o aumento do pH, o que foi constatado, também, por Freitas et al (1988). Segundo Campell (1977), a mineralização ocorre em solos ácidos numa pequena taxa, que aumenta com o incremento do pH. Além de ser um fator determinante do tipo de população microbiana, o pH controla a solubilidade dos nutrientes. Em torno da neutralidade, maior quantidade de nutrientes se encontra em solução, o que estimula a atividade microbiana e conseqüentemente, aumenta a mineralização do N do solo.

... Estrutura e textura

Através de interações com microrganismos, raízes de plantas, polissacarídeos e substâncias húmicas, as partículas primárias do solo (areia, silte e argila) se unem para formar microagregados. A união dos microagregados dá origem aos macroagregados, que irão definir a estrutura do solo (Campbell, 1977). Como comentado anteriormente, a interação dos compostos orgânicos com a fração mineral do solo representa um importante mecanismo para a conservação da matéria orgânica do solo. Segundo Cortez (1989), o acúmulo da matéria orgânica está associado com as frações silte e argila grossa, estando os compostos mais lábeis em interação com a argila fina, onde se observa maior reciclagem de C. Por outro lado, é o tipo de agregação das partículas primárias do solo que controlará a intensidade da degradação dos compostos orgânicos. Em solos de pastagens da América do Norte, encontrou-se que os macroagregados, em comparação aos microagregados, continham maiores quantidades de C e N (Elliot, 1986; Gupta & Germida, 1988). Gupta & Germida (1988), mostraram que a destruição dos agregados expõe a biomassa do solo, acarretando num aumento da mineralização de N, fato este de grande significado para a interpretação de resultados de estudos de mineralização em frações texturais. A biomassa do solo, em especial a fúngica, é a grande responsável pela estabilidade dos agregados do solo (Gupta &

Germida, 1988). O cultivo do solo resulta numa diminuição da estabilidade dos agregados, resultando em menor proporção de macroagregados ricos em nutrientes e maior proporção de microagregados pobres em nutrientes (Elliot, 1986). A destruição de macroagregados acarreta na exposição da biomassa microbiana, o que explica, em parte, maior mineralização em solos cultivados (Elliot, 1986; Gupta & Germida, 1988). Além do efeito de proteção à biomassa, a agregação do solo afeta a mineralização de N indiretamente, por ser um fator determinante do grau de infiltração da água, conteúdo de umidade, aeração, temperatura e penetração de raízes (Allison, 1973).

... Presença da planta

O efeito da planta sobre a degradação da matéria orgânica do solo parece estar relacionado, principalmente, ao efeito de substâncias que são liberadas pelas raízes. Contudo, diminuições na taxa de decomposição de resíduos de plantas marcados com ^{14}C em solos plantados comparados a não plantados, tem sido atribuído a menor atividade microbiana resultado de aeração restrita (Stevenson, 1982a) e menor disponibilidade de água (Jenkinson, 1977). Além destes efeitos, a imobilização de N na liteira de pastagens também é considerada uma importante causa do acúmulo de matéria orgânica nestas áreas (Robbins et al, 1989). Todavia,

Sparling et al (1982), justifica a baixa decomposição da matéria orgânica marcada com ^{14}C , sob solo plantado, à retenção do ^{14}C pelo crescimento da biomassa microbiana, estimulada pela presença de raízes. Quanto a disponibilidade de N, em algumas situações a presença da planta, por intermédio das raízes, parece estimular a mineralização do N (Cornish & Raison, 1977; Fisher & Gosz, 1986). Huntjens (1971) observou que a mineralização de N do solo era estimulada em solos sob cultivo contínuo, sugerindo um possível efeito de exudados da raiz como estimulante da atividade microbiana. Por outro lado, já se verificou imobilização de N, fruto da inibição da atividade microbiológica por produtos das raízes (Fisher & GOSZ, 1986). Meentemeyer (1978), mostra que a qualidade da matéria orgânica influencia bastante na taxa de decomposição e no potencial de imobilização de N antes de sua mineralização. Em um experimento com 5 monoculturas de diferentes gramíneas, as diferentes taxas de mineralização de N encontradas para cada gramínea foram altamente correlacionadas com a qualidade da liteira do solo oriunda de cada espécie de gramínea (Wedin & Tilman, 1990). Tais resultados sugerem que um provável efeito e talvez o mais importante no controle da mineralização de N, esteja na qualidade do material vegetal adicionado ao solo, conforme o observado por Silvester-Bradley et al (1988) em relação aos exsudatos das raízes de *Brachiaria humidicola*.

Destino do N Mineralizado no solo

Uma vez mineralizado, o NH_4^+ poderá ser novamente imobilizado pela biomassa microbiana ou extraído pelas raízes de plantas ali presentes. Como comentado, a imobilização microbiana ocorrerá se neste solo existir material orgânico prontamente mineralizável pobre em N. Se disponível, o NH_4^+ poderá ser nitrificado, ou seja, oxidado a NO_2^- ou NO_3^- , principalmente por bactérias do gênero nitrossomonas e nitrobacter, respectivamente (Alexander, 1977). A oxidação de NO_2^- a NO_3^- é muito mais rápida do que a oxidação de NH_4^+ a NO_2^- , razão pela qual, praticamente, não se encontra NO_2^- nos solos. A nitrificação ocorre praticamente em todos os solos onde NH_4^+ está presente e as condições ambientais são favoráveis para a ocorrência do processo, sendo a temperatura, umidade, pH e $p\text{O}_2$, os principais fatores que controlam a nitrificação (Schnidt, 1982). A nitrificação ocorrerá na presença de adequados $p\text{O}_2$ e pH (>5.0) à atividade da população bacteriana. Contudo, estando o pH próximo a neutralidade, ideal para a população nitrificadora (Urquiaga et al, 1990), a volatilização de NH_3 será um importante processo de perda de N do sistema, face ao desequilíbrio gerado entre a forma gasosa e o NH_4^+ (Nelson, 1982). Por outro lado, o NO_3^- , se presente em um ambiente esgotado em O_2 , poderá ser perdido via desnitrificação, ou seja a redução de NO_3^- até N_2 , NO ou N_2O por microrganismos. A

desnitrificação é um processo respiratório presente em um limitado número de gêneros bacterianos, sendo altamente dependente da disponibilidade de compostos orgânicos decomponíveis (Firestone, 1982). Um outro processo de grande importância nas perdas de N do sistema é a lixiviação (Allison, 1973). As perdas ocorrem pela movimentação do NO_3^- junto com a água de percolação e são intensificadas com o aumento da concentração de NO_3^- na solução do solo e do fluxo de água no perfil (Legg & Meisinger, 1982). Embora deva-se considerar perdido o N que estiver fora do alcance das raízes das plantas, deve-se lembrar que mecanismos como ascensão capilar podem retorná-lo à zona de absorção radicular, introduzindo-o novamente no sistema solo-planta.

- Métodos de estudo da disponibilidade de N no solo

. Enriquecimento de ^{15}N

De todo o N existente na natureza, cerca de 0.3663% corresponde ao isótopo estável ^{15}N . Esta marcação é aproximadamente constante inclusive no N orgânico do solo. A grosso modo, a adição de N-mineral ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por exemplo) ao solo, enriquecido com ^{15}N (teor de ^{15}N superior a 0.3663%), irá fazer com que o N mineral na solução do solo fique com um teor de ^{15}N em excesso (em relação à marcação natural) (McAuliffe et al 1958). Com a mineralização do N orgânico do

solo (ingresso na solução do solo de N com 0.3663% de ^{15}N), ocorre uma diminuição no teor de ^{15}N do N disponível do solo. A partir da diluição isotópica de ^{15}N torna-se possível estimar o N mineralizado do solo. Uma possibilidade está na determinação do valor A do solo (Boddey et al, 1987). O valor A de um solo é a quantidade estimada de N que está disponível no solo para a planta, calculado com base em valores de enriquecimento de ^{15}N da planta crescida neste e da quantidade de um fertilizante marcado adicionado. De acordo com este índice, a fração do N da planta proveniente do adubo em relação a quantidade de adubo aplicada é proporcional à fração do N da planta proveniente do solo em relação ao N disponível do solo (valor A). A estimativa do valor A pode servir servido de referência para a averiguação de outros índices de disponibilidade (Stanford & Legg, 1968). A aplicação da técnica isotópica também pode ser utilizada para monitorar a quantidade de N fornecida pelo solo em estudos de quantificação da fixação biológica de N (Hamilton et al, 1992).

Não obstante à precisão da técnica de ^{15}N para o estudo da dinâmica do N no solo, a sua perfeita utilização exige uma série de considerações quanto ao sistema solo. O N marcado adicionado para enriquecer o solo sofre uma série de interações, principalmente com a fração do N trocável do solo e com a fração orgânica mais lábil. Estas interações podem

levar à diluição ou concentração do isótopo ^{15}N no N total disponível na solução do solo (NH_4^+ e NO_3^-). Este efeito tem sido abordado na literatura como interação do N adicionado (Jenkinson et al, 1985; Boddey et al, 1990). De acordo com Boddey et al (1990), a adição de pequena quantidade de fertilizante, porém com alto enriquecimento, minimiza bastante a interação.

. Índices de disponibilidade

Face a grande dinâmica que o N possui, em especial à constante ciclagem entre imobilização e mineralização, deve-se considerar como N disponível para as plantas, juntamente ao N-mineral (NO_3^- e NH_4^+) existente no solo, a fração orgânica que pode ser facilmente mineralizada pelos microrganismos. Grande interesse existe há muito tempo, em métodos que testam os solos para sua capacidade em suprir N para as plantas. Os experimentos de campo e casa-de-vegetação, onde o suprimento de N do solo se reflete no N absorvido pela planta, fornecem resultados mais reais, porém, a sua utilização na rotina de análises é inviável face a demora na obtenção de resultados, ficando limitada à calibração de outros métodos (Allison, 1973). Métodos baseados na oxidação química e biológica da matéria orgânica tem sido propostos. Os métodos biológicos baseam-se na estimativa do N-mineral produzido quando o solo é incubado

sob condições que promovem a mineralização do N (Waring & Bremner, (1964); Keeney & Bremner, 1967; Stanford & Smith, 1972). Tais métodos receberam considerável aceitação, sendo utilizados muitas vezes como padrão para os métodos químicos (Keeney & Bremner, 1966; Verstraeten et al, 1970; Lathwell et al, 1972; Stanford & Smith, 1978; Gianello & Bremner, 1988). Por sua vez, os métodos químicos objetivam simular a ação dos microrganismos através da ação de agentes oxidantes e fortes extratores (Mac Lean, 1964; Stanford & De Mar, 1969; Nommik, 1976; Fox & Piekielek, 1978; Stanford, 1978; Gianello & Bremner, 1988).

Nas comparações metodológicas, o N proveniente do solo (estimado) correlacionado com o N extraído pela planta ou com a produtividade relativa ou outro método considerado padrão, enquadra-se em uma das equações abaixo (Campbell, 1977):

$$N_{\text{solo}} = K \times (N_{\text{mineralizável}} + N_{\text{inicial}})$$

ou

(mineral),

$$N_{\text{solo}} = K \times N_{\text{mineralizável}}$$

ou

$$N_{\text{solo}} = K \times N_{\text{inicial}} \text{ (mineral)}$$

Esta última equação tem aplicação em solos que apresentam alta concentração de NO_3^- comparado ao NH_4^+ , e condições ambientais desfavoráveis à desnitrificação e lixiviação. Nestas condições tem se verificado que as

concentrações iniciais de NO_3^- correlacionam-se com o N extraído pela planta (Campbell, 1977; Keeney, 1982; Matar et al, 1990). Contudo, a época (Magdoff et al, 1990), o local (Matar et al, 1990) e a preparação das amostras (Magdoff et al, 1984), são fontes potenciais de erro nas estimativas. Por outro lado, a concentração de NO_3^- na camada superficial do solo (0-30 cm), no período inicial de desenvolvimento das plantas, pode ser um bom indicador do grau de resposta da planta à fertilização nitrogenada (Magdoff et al, 1984; Fox et al, 1989; Magdoff et al, 1990). Estes autores, encontraram que para a cultura do milho, no nordeste dos EEUU, o nível crítico de resposta a adubação nitrogenada esteve na faixa de 20 a 30 ppm de N- NO_3^- , presente no solo ao início da cultura. Já para a cultura do trigo, na Síria, o nível crítico esteve na faixa de 8 a 8.5 ppm de N- NO_3^- (Matar et al, 1990).

Face aos solos diferirem em sua capacidade de mineralizar N, a utilização das quantidades iniciais de NO_3^- como índice de disponibilidade de N é discutível (Stanford, 1982). Carter et al (1974), demonstrou que, para a cultura de beterraba, não só a dosagem inicial de NO_3^- mas, também, a determinação do N mineralizável através da incubação aeróbica eram essenciais na estimativa da capacidade do solo em fornecer N. Para esta mesma cultura, Stanford et al (1977) encontrou que $N_{\text{planta}} = 0,73 \times (N_{\text{mineralizável}} + N_{\text{inicial}}) + 5.3$, em mgN/g solo, sendo a incubação aeróbica por 30 semanas

o método utilizado para determinar o N mineralizável do solo. Estes trabalhos mostram a aplicabilidade da primeira equação relacionada por Campbell (1977). A preocupação com a quantidade de N mineral presente no solo somente se justifica em áreas que receberam pesadas adubações nitrogenadas, dessa forma apresentando alta quantidade de NO_3^- residual, ou em solos extremamente ricos em N, pois este N-mineral residual poderá representar significativa fração do N da planta.

Nas correlações diretas entre as estimativas de N mineralizável e N na planta, onde desconsidera-se a quantidade inicial de N-mineral, observa-se a aplicação da segunda equação ($N_{\text{solo}} = K \times N_{\text{mineralizável}}$) (Keeney & Bremner, 1967; Smith & Stanford, 1971; Fox & Piekielek, 1978; Stanford, 1978; Gianello & Bremner, 1988). Nestas estimativas, geralmente são utilizados os métodos químicos que descontam a fração inicial na forma mineral. Talvez, a desconsideração da fração mineral de N já disponível para a planta seja um dos fatores que contribuem para a variabilidade dos resultados obtidos pelos métodos químicos quando comparados a produção da planta.

.. Métodos químicos

A obtenção de um método químico que forneça um índice de disponibilidade de N é bastante desejável, pois as análises químicas são, normalmente, mais rápidas e mais

precisas do que os procedimentos utilizados nos métodos biológicos. Procedimentos químicos para acessar o N-orgânico do solo variam desde aqueles envolvendo uma extração relativamente moderada como fervura em água (Keeney & Bremner, 1966) ou fervura em 0.01M CaCl_2 (Stanford, 1968) até os que utilizam fortes oxidantes como extração ácida com permanganato de potássio (Stanford & Smith, 1978), ou extração com dicromato de potássio a 100°C (Nommik, 1976). Entre estes extremos inúmeros métodos propõem variações em temperatura, extratores e tempo de extração. Entre os diversos métodos químicos, poucos tem mostrado boa correlação entre suas estimativas de disponibilidade de N e o N mineralizado biologicamente ou o N absorvido pela planta. A baixa reproducibilidade dos resultados positivos obtidos de um determinado método, quando aplicado a outro solo de características diferentes, também contribui para a descredibilidade dos métodos químicos. Gallagher & Bartholomew (1964) mostraram que os métodos químicos (N extratável por 1N e 6N H_2SO_4 ou por 0.5N Na_2CO_3) correlacionaram-se bem com o N extraído por *Setaria italica* em experimento de casa de vegetação. Por outro lado, Fox & Piekielek (1978) correlacionaram resultados de disponibilidade de N de 8 métodos químicos com a capacidade de 8 solos da Pensilvânia em suprir N para a cultura do milho, e encontraram que a matéria orgânica do solo (oxidação

por dicromato), NO_3^- do solo e N extraído por H_2SO_4 e KCl não foram significativamente correlacionados com a disponibilidade de N do solo. Neste mesmo trabalho, N-total do solo e NH_4^+ extratável por autoclavagem correlacionaram-se com N extraído pela cultura do milho a 5% de significância. Em outro trabalho (Smith & Stanford, 1971), tanto o N-total como C-orgânico de 39 solos diferentes foram mal correlacionados com o N-mineralizado por incubação aeróbica e anaeróbica. Outros métodos como a extração alcalina com permanganato de potássio (Bremner, 1965) não tem demonstrado bons resultados nas correlações com N mineralizável (Jenkinson, 1968; Stanford, 1978, Gianello & Bremner, 1986). Por outro lado, Stanford & Smith (1978), mostraram que a extração ácida com permanganato correlacionou-se muito bem com o N potencialmente mineralizável, sendo que a quantidade de NH_4^+ extraída é dependente da concentração de KMnO_4 . Webster (1978), comparou resultados obtidos de incubação anaeróbica com outros obtidos da determinação de N liberado com água em ebulição (Keeney & Bremner, 1966) e NH_4^+ em extratos de solo com 0.01N CaCl_2 autoclavados por 16h (Stanford & Smith, 1976). Os procedimentos químicos liberaram mais N (67 e 109 mgN/kg solo, respectivamente) do que a incubação anaeróbica (41 mgN/kg de solo), mostrando baixa correlação com o método de incubação (r^2 de 0.67 e 0.53, respectivamente). Alguns trabalhos tem avaliado a metodologia

de Jenkinson (1968) que quantifica glucose extraída por Ba(OH)_2 , demonstrando boas correlações com o N mineralizável (Smith & Stanford, 1971; Stanford & DeMar, 1970), no entanto, a força do reagente antrona, usado no método, pode ser alterada por reações no solo causadas pelo pH (Jenkinson, 1968). Mais recentemente, Gianello e Bremner (1988), propuseram um método que consiste em determinar NH_4^+ produzido por destilação a vapor da amostra do solo com uma solução tampão borato-fosfato à pH 11.2 por 8 min. Os resultados obtidos deste método, para 33 solos brasileiros, mostraram alta correlação com os obtidos de incubação aeróbica e anaeróbica para acessar o N potencialmente mineralizável do solo.

Métodos biológicos:

A disponibilidade de N do solo para as plantas depende diretamente da ação dos microrganismos sobre a reserva orgânica que contém o N. Dessa forma, é de se esperar que a quantidade de N produzida após a incubação de amostras de solo proporcione melhores correlações com o N absorvido pelas plantas. Os primeiros métodos propostos baseavam-se na incubação aeróbica de amostras de solo, de 2 a 10 semanas à 30-35°C, em recipientes fechados o suficiente para impedir a perda de água e não prejudicar as trocas gasosas (Gallagher & Bartholomew, 1964; Stanford et al, 1965; Keeney & Bremner,

1966; Keeney & Bremner, 1967), ou na incubação anaeróbica por 14 dias a 30°C (Waring & Bremner, 1964) ou 7 dias à 40°C (Keeney & Bremner, 1966). Embora bons resultados tenham sido obtidos na utilização destes métodos (Stanford & Legg, 1968; Smith & Stanford, 1971; Lathwell et al, 1972; Smith et al, 1977; Gianello & Bremner, 1986), o pré-tratamento das amostras (secagem e estocagem), obtenção do nível de umidade ideal, temperatura de incubação, granulometria, presença de resíduos frescos de material orgânico etc, podem sub ou superestimar os valores de N potencialmente mineralizável (No) (Keeney, 1982). O método de incubação anaeróbica pode não ser apropriado na comparação de disponibilidade de N entre sítios onde a nitrificação é variável e importante para a planta (Binkley & Hart, 1989). Nas metodologias de incubação anaeróbica, o efeito do pré-tratamento na estimativa do No parece ser maior quanto menor o tempo de incubação das amostras, o que justifica a variabilidade nos resultados das comparações destes métodos com a performance da planta no acúmulo de N (Stanford, 1982).

Trabalhando com longo período de incubação aeróbica, Stanford & Smith (1972), incubaram 39 solos diferentes em colunas plásticas, à 35°C e umidade próxima a capacidade de campo. Durante as 30 semanas de incubação, as colunas foram lixiviadas com solução de CaCl_2 0.01N para extração do NH_4^+ e NO_3^- formados durante determinados

intervalos de tempo. Após a extração, adicionou-se em cada coluna uma solução com micronutrientes e fez-se sucção para correção da umidade. O N potencialmente mineralizável (N_0) foi estimado da quantidade acumulada do N mineralizado sob condições ótimas de umidade (em média 0.2 atm) e temperatura (35°C), baseando-se na premícia de que a mineralização de N obedece a uma cinética de primeira-ordem: $N_{min} = N_0(1 - e^{-kt})$, sendo k uma constante que define o percentual do N_0 que mineraliza em um tempo t. A utilização desta metodologia de incubação em outros trabalhos demonstrou que o N_0 estimado relacionou-se muito bem com o N extraído pelas plantas (Stanford et al, 1973; Smith et al, 1977).

Tabatabai & Al-Khafaji (1980), demonstraram que a mineralização do N do solo segue uma cinética de ordem zero, ou seja $N_{min} = kt$, porém neste trabalho, as amostras foram incubadas sem a pré-secagem do solo feita por Stanford & Smith (1972). O comportamento curvilíneo da mineralização de N, descrito por uma cinética de primeira ordem, parece estar relacionado com o pré-tratamento da amostra. A curva obtida, pode ser dividida em duas partes, uma inicial com alta taxa de decomposição, que após cerca de 15 dias diminui, entrando em uma estabilidade. Seyfried & Rao (1988) demonstraram que a secagem do solo afeta a mineralização do N até 30 dias após início da incubação, sendo que o efeito parece ser mais importante nos primeiros 15 dias (Stanford & Smith, 1972;

Juma et al, 1984; Beauchamp et al, 1986). Embora trabalhando com amostras sem pré-tratamento, Seyfried & Rao (1988) obtiveram um comportamento de mineralização do N igual ao obtido por Stanford & Smith (1972), porém, as amostras utilizadas na incubação foram congeladas antes do início do experimento. Segundo Jenkinson & Powlson (1976), o efeito do congelamento sobre a mineralização de N é semelhante ao efeito de secagem, o que pode ter proporcionado tal comportamento. Contudo, Beauchamp et al (1986), demonstraram que independente do pré-tratamento das amostras (compararam secagem, congelamento e umidade de campo), a mineralização de N segue uma cinética de primeira ordem, e sugeriram que os dados obtidos por Tabatabai & Al-Khafaji (1980) poderiam, também se enquadrar numa equação de primeira ordem.

A obtenção de uma primeira aproximação do N_0 através da regressão de $1/N_{\min}$ em relação a $1/t$, e posterior determinação do N_0 através da melhor regressão linear entre $\log(N_0 - N_t)$ e t (método iterativo) (Stanford & Smith, 1972), tem sido alvo de críticas (Smith et al, 1980; Talpaz et al, 1981; Molina et al 1980; Beauchamp et al, 1986; Broadbent, 1986). A transformação logarítmica dos dados faz com que as estimativas do N_0 sejam mais dependentes dos desvios dos dados obtidos no início da incubação, pois como os valores iniciais ($N_0 - N_t$) são maiores (N_t é menor inicialmente), a transformação logarítmica minimiza as diferenças (Smith et

al, 1980). Segundo Smith et al (1980), quando os erros não se correlacionam com o tempo de amostragem ou com os valores médios das medidas, estimativas mais reais de N_0 são obtidas utilizando-se o método de mínimos quadrados não-linear. Tal conclusão também foi ratificada por outros autores (Talpaz et al. 1981; Seyfried & Rao, 1988). Além desta forma de análise dos dados, propoe-se que seja utilizado um modelo exponencial duplo de primeira ordem, onde é avaliada a mineralização de N de dois compartimentos orgânicos, um de rápida decomposição e outro de compostos mais estáveis ($N_{min} = N_0 \times S(1-e^{-ht}) + N_0 \times (1-S)(1-e^{-kt})$, onde S e (1-S) reperesentam as frações lábeis e recalcitrantes com taxa de decomposição h e k, respectivamente) (Marion et al, 1981; Molina et al, 1980; Deans et al, 1986). Embora este modelo tenha proporcionado estimativas mais precisas do N_0 , fruto do maior número de parâmetros, (Hadas et al, 1983; Lindemann & Cardenas, 1984), isto não significa que somente existam dois compartimentos orgânicos de tamanhos distintos no solo. Cabrera & Kissel (1988a), demonstraram que com o passar do tempo N_0 aumenta e k diminui, logo a discriminação de compartimentos orgânicos com diferentes taxas de mineralização tende para um número infinito, ficando a decisão do número de parâmetros do modelo de mineralização dependente da precisão desejada para as estimativas (Sierra, 1990). Deve-se considerar também que quanto maior o número de parâmetros mais complexa é a

resolução matemática para a estimativa do N_o e da constante k .

A adaptação das estimativas *in vitro* de N_o para as condições de campo, utilizando-se a metodologia de incubação proposta por Stanford & Smith, (1972), é feita com base nos resultados de Stanford et al (1973) e Stanford & Epstein (1974). Com base nas flutuações de temperatura no campo, pode-se corrigir o valor de N_o . Para aumento da temperatura em 10°C , numa faixa de 5° a 35°C , a taxa de mineralização k dobra (Stanford et al, 1973). Para correção de N_o em relação às flutuações de umidade, considera-se que o N mineralizado (N_{min}) a 35°C em determinado nível de umidade, seja 100% e este valor de umidade representara 100% da água disponível. Esta relação é do tipo $Y = X$, ou melhor, se a umidade do solo cai para 50% da umidade ótima, somente 50% do N_{min} é liberado (Stanford & Epstein, 1974). Embora a metodologia de incubação por longo tempo seja considerada ideal pelo fato de minimizar os efeitos de pré-tratamento das amostras, as comparações obtidas entre as estimativas de campo (N na planta) e laboratório (recalculados considerando as oscilações de temperatura e umidade observadas no campo), deixam dúvidas para utilização desta metodologia (Cabrera & Kissel, 1988b).

Embora alguns resultados demonstrem que tanto a incubação aeróbica quanto a anaeróbica possuem potencial para

avaliar a disponibilidade de N no solo, as metodologias de avaliação de disponibilidade de N *in vitro* não possibilitam avaliar o efeito na disponibilidade de N ocorrido durante um processo de alteração ambiental (Binkley & hart, 1989).

.. Outros métodos:

Recentemente, processos mais sofisticados para estimar a capacidade dos solos em suprir N para as plantas tem sido utilizados (Németh, 1979; Meyer, 1989). O processo conhecido como eletro-ultrafiltração estima a disponibilidade potencial N de uma amostra de solo, através de uma combinação entre ultrafiltração e eletrodialise (Németh, 1979). Este método basea-se na diálise onde íons são separados de colóides (argilas) através do princípio de difusão, ao longo de um gradiente de concentração, através de uma membrana semipermeável. Outro método utilizado para estimar o N-potencialmente mineralizável do solo é chamado "Near Infra-red reflectance" (NIR) (Meyer et al, 1986). Na região espectral do infra-vermelho de menores comprimentos de onda, concentram-se as emissões da ressonância das ligações químicas que contém N ligado a átomos de N, C, O, P e S. Através da espectrofotometria das ondas refletidas desta zona espectral, é possível medir propriedades do solo como matéria orgânica, N-total e N potencialmente mineralizável, sendo

para este último através da medição das frações lábeis do N orgânico do solo.

Como visto, embora existam vários métodos químicos com inúmeras variantes (Stanford, 1982; Keeney, 1982), poucos trabalhos mostram resultados animadores para a adoção de um destes métodos em rotina laboratorial.

. N disponível para a planta: Incubação *in situ*:

Os insucessos observados nas simulações de laboratório tem sido creditados à falta de representatividade das condições do campo. Neste sentido, as metodologias de incubação *in situ* tem recebido grande atenção nos últimos anos. A idéia básica deste tipo de experimento é a de preservar ao máximo as características físicas e químicas do solo, deixando-o incubar diretamente no campo de forma a sofrer as oscilações naturais de temperatura e umidade. Ao contrário das metodologias comentadas anteriormente, a incubação *in situ* não fornece a quantidade de N potencialmente mineralizável, mas o N que é mineralizado durante um dado período de incubação, podendo ser utilizado ou não pela planta. Um dos métodos comumente utilizados é o de sacolas plásticas, impermeáveis a água e permeáveis a gases, que são enterradas com amostras de solo retiradas de forma a sofrer mínima perturbação (Eno, 1960). Ainda que incubadas em condição de campo, as amostras mantêm-se à

umidade constante, variando apenas a temperatura. Nadelhoffer et al (1984) examinaram o comportamento da mineralização de N e extração de N pelas plantas em 9 ambientes florestais. Eles encontraram que as taxas de mineralização do N-orgânico das sacolas enterradas correlacionaram-se bem com o N extraído pelas árvores ($r^2=0.9$), ao contrário das comparações com C e N totais e C/N. Comparadas as extrações de N por plantas de milho e batata, as estimativas de mineralização de N por este método, trouxe excelentes resultados (Westerman & Crothers, 1980). As comparações feitas através desta metodologia se fazem a partir das quantidades de N extraída pela planta e estimada pelo método ($N_{\text{estimado}} = N_{\text{mineralizado}} - N_{\text{mineral residual}}$), onde o $N_{\text{mineral residual}}$ é determinado numa amostra de solo retirada do local próximo à sacola enterrada, porém ao final do período de incubação. Por esta metodologia, as perdas de N do sistema estão somadas à estimativa de N extraído pela planta, pois o N dentro da sacola não está sujeito à lixiviação. Outro problema está na manutenção constante do nível de umidade dentro da sacola, que precisa ser multiplicado por um fator para que corrija as flutuações de umidade ocorridas fora da sacola (Westerman & Crothers, 1980; Binkley & Hart, 1989).

Para estimar a disponibilidade de N em condições de campo, Binkley & Matson (1983) propuseram a utilização de sacolas contendo somente resina trocadora que são enterradas

no campo. Segundo Binkley (1984), as estimativas deste método dependem do transporte de íons para as sacolas, o que pode ser um problema, visto que o NO_3^- se move mais rapidamente do que o NH_4^+ e que pode existir competição por N com microrganismos e plantas. Contudo, esta metodologia parece ser um bom método para mostrar diferenças na disponibilidade de N entre ecossistemas e entre tratamentos. O maior problema do método é que os componentes responsáveis pelas diferenças observadas, como mineralização, extração pelas plantas, perdas etc, não podem ser isoladas (Binkley & Hart, 1989).

Distefano & Gholz (1986), recentemente desenvolveram um metodologia de estudo da disponibilidade de N *in situ*. De acordo com esta metodologia, um cilindro de PVC é inserido no solo e em seguida retirado. Tanto a base quanto o topo do cilindro são cobertos por sacolas contendo resina trocadora de íons e então o cilindro é retornado ao ponto de inserção e deixado a incubar. A presença do cilindro de PVC elimina a possibilidade de perda do N por competição com raízes, observada na metodologia anterior. Ao final do tempo de incubação, analisa-se o solo no interior do cilindro e as resinas para N-mineral. O N contido na resina localizada na base do cilindro de PVC refere-se ao N lixiviado, e o contido na resina superior ao N que entraria na camada de solo em estudo (proveniente da camada de solo acima do cilindro ou proveniente da chuva se o cilindro está na superfície). O N

mineralizado do solo é calculado pela diferença entre as quantidades finais (solo + resinas) e iniciais (solo antes da incubação) de NH_4^+ e NO_3^- . No entanto, como discutido por Firestone & Hart (1989), é importante que a resina utilizada possua textura semelhante ao solo de forma a evitar alterações na condutividade hidráulica entre o sistema solo-resina. Face aos problemas de textura e a necessidade de que a resina apenas adsorva o N mineral lixiviado, esta metodologia deve apenas ser utilizada em solos bem drenados ou em locais onde haja grande precipitação pluviométrica (Binkley & Hart, 1989; Firestone & Hart, 1989).

Adams & Attiwill (1986) utilizaram uma metodologia de avaliação da mineralização *in situ* na qual um cilindro de aço ou PVC é inserido no solo e deixado para incubar durante 30 dias. Ao final deste tempo estima-se o N mineralizado subtraindo-se a quantidade inicial de N mineral da quantidade de N mineral acumulada ao final da incubação contida dentro da coluna de solo. O N extraído pela planta é calculado pela diferença do N mineralizado e a quantidade de N fora da coluna no final da incubação. A coluna inserida no solo para incubação permanece coberta por todo o período, o que inclui na estimativa do N extraído pela planta, a quantidade perdida por lixiviação. Raison et al (1987) incluíram uma segunda coluna que é incubada sem cobertura ao mesmo tempo que a coberta. Dessa forma, subtraindo-se o N-

mineralizado da coluna coberta pelo da coluna aberta, tem-se o N perdido no período de incubação. Segundo Raison et al (1987), o tempo de incubação deve ser suficiente para que se acumule uma quantidade de N mensurável e, também, que seja efetuado durante um período que coincida com situações de chuva, seca, calor e frio. O tempo de permanência das amostras no campo tem variado de 30 a 90 dias (Adams & Attiwill, 1986; Raison et al, 1987; Edmonds & Mcoll (1989); Smethurst & Nambiar, 1989), contudo, a escolha do tempo de incubação tem sido feita sem avaliação do seu efeito na mineralização dentro da coluna (Adams et al, 1989). Durante a incubação das colunas, raízes que foram seccionadas na inserção das colunas, entram em decomposição proporcionando imobilização do N. Num estudo mais detalhado dos efeitos desta metodologia sobre a mineralização do N, Adams et al (1989), concluíram que períodos de incubação superiores a 2 semanas podem gerar resultados subestimados da disponibilidade de N por efeito da decomposição das raízes. No entanto, o N imobilizado pelas raízes irá remineralizar em um tempo dependente da disponibilidade de C e N, o que provocará um fluxo extra de N (N das raízes) e talvez levar a uma superestimação do N disponível. A aplicação da maioria das técnicas de incubação *in situ*, principalmente esta técnica de colunas, tem se restringido à estudos em áreas florestais dificultando a comparação das estimativas do N

extraído com o realmente acumulado pela planta, o que seria muito importante como prova para as estimativas do método. Uma forma de testar esta técnica seria a de se trabalhar com plantas de ciclo anual, pastagens ou em áreas florestais recentemente cultivadas. Neste sentido, Smethurst & Nambiar (1989), demonstraram que a estimativa de extração de N pela planta através da metodologia de colunas (Raison et al, 1987) correlacionou-se razoavelmente com o N extraído por plantas de *Pinus radiata* com 1 ano e meio de idade ($r^2 = 0.57$, $P < 0.01$). Neste estudo observou-se, em alguns períodos de avaliação, que a técnica superestimou o N absorvido pela planta, resultando em uma diferença de aproximadamente 20% entre o N estimado e o quantificado na planta, ao final do experimento. Esta diferença poderia ser minimizada se fosse considerado o N em raízes não amostradas e a ciclagem interna de N no sistema radicular (Smethurst & Nambiar, 1989). Por outro lado, seguindo as considerações de Adams et al (1989), o tempo de incubação utilizado no estudo de Smethurst & Nambiar (1989) (4 a 16 semanas), a imobilização de N pelas raízes cortadas começaria a interferir após 2 semanas de incubação. Dessa forma, a remineralização do N das raízes poderia contribuir para a superestimação, observada no período de amostragens com maior tempo de incubação. Outro problema comentado por Smethurst & Nambiar (1989) refere-se à frequência de amostragens que poderia estimular a

mineralização no interior das colunas devido a perturbação do solo durante a inserção destas, gerando um erro cumulativo com o decorrer do tempo.

De acordo com o revisado, observa-se que alguns anos de estudo ainda separam o N disponível estimado do realmente presente no solo durante o ciclo da planta. Para tanto, procurou-se estudar nesta tese, a utilização de algumas técnicas de avaliação da disponibilidade de N no solo para a planta.

EXPERIMENTO 1

**EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A MINERALIZAÇÃO DO N DO
SOLO EM AMOSTRAS INTACTAS.**

INTRODUÇÃO

Nadelhoffer et al (1985), Adams & Attiwill (1986), Raison et al (1987), Smethurst & Nambiar (1989) obtiveram relativo sucesso com o uso da metodologia de colunas de solo para incubação *in situ*. Contudo, concluiu-se que o tempo de permanência da coluna no campo precisa ser melhor avaliado (Adams et al, 1989).

Raison et al (1987) relataram que para a melhor quantificação da mineralização do N *in situ* através da metodologia de colunas, deve-se deixar as colunas em incubação o tempo suficiente para que se consiga uma quantidade máxima de N mineralizável, de forma que as raízes seccionadas não interfiram no resultado líquido do processo de mineralização.

Dessa forma, para averiguar o melhor período de incubação, realizou-se este ensaio preliminar para averiguar,

nas condições tropicais, se as duas semanas sugeridas por Adams et al (1989) seriam satisfatórias.

OBJETIVO

Estudar o efeito do tempo de incubação das amostras de solo, dentro do cilindro de PVC, sobre a mineralização do N.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cerca de 3 dias após a ocorrência de chuvas na área experimental, inseriram-se aleatoriamente, 30 colunas de PVC (d.i. 5cm x 15cm) em 3 solos diferentes (Tabela 1). No solo Piraí, presente em cilindros de concreto, plantas de *Panicum maximum* (KK16) cobriam inteiramente a sua superfície. Na área de solo Ecologia a gramínea dominante era *Paspalum notatum* (grama batatais) e para a área com solo Itaguaí a gramínea era *Brachiaria arrecta*. Todas as colunas foram imediatamente retiradas do solo e colocadas para incubar à 35°C em sala escura, com excessão de 5 delas para cada solo, que foram analisadas para N mineral inicial, através da metodologia de fluxo contínuo descritas no primeiro capítulo.

Tabela 1. Resultados da análise química dos diferentes solos utilizados no estudo do efeito do tempo de incubação sobre a mineralização de N do solo.

Solos	pH	C%	N%	Ca+Mg -mEq/100g-	Al	P - ppm -	K
Itaguaí	5.3	0.93	0.09	2.1	0.2	5.0	77
Piraí	4.4	1.23	0.12	1.2	0.7	3.8	52
Ecologia	5.5	0.61	0.05	1.0	0.3	1.4	41

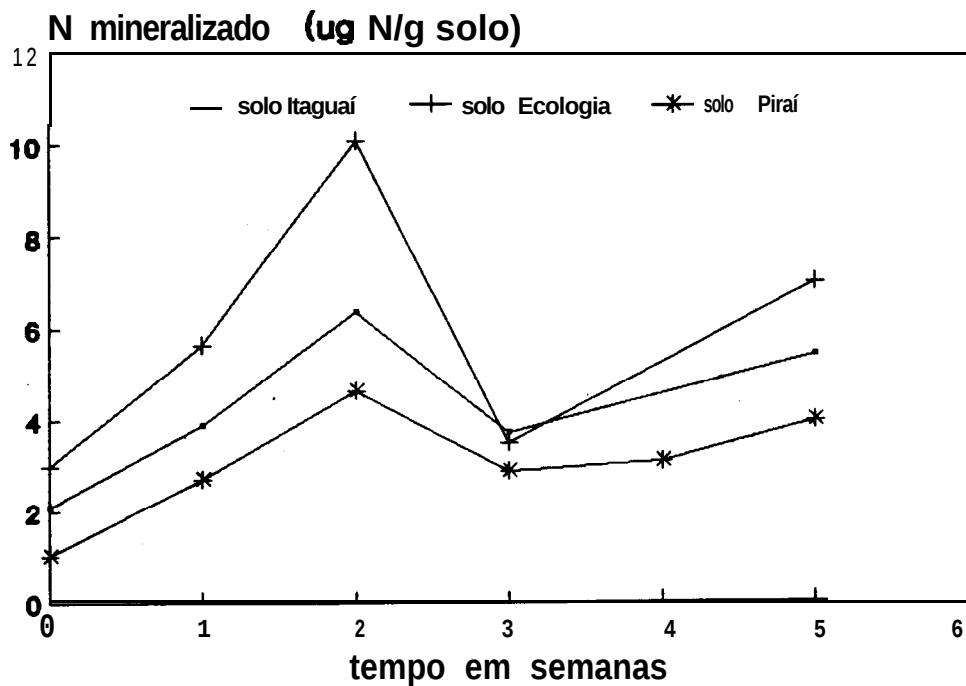
os solos Itaguaí e Piraí são solos
podzólicos enquanto que o solo
Ecologia trata-se de um planossolo.

As colunas incubadas foram cobertas com plásticos de forma a permitir a troca gasosa e reduzir ao mínima a perda de umidade. Cinco colunas de cada solo foram amostradas a cada semana para análise de N mineral acumulado no respectivo período.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostrados na Figura 1, demonstraram claramente que o período de incubação de 2 semanas possibilitou obter o maior acúmulo de N sem que se notasse interferência significativa das raízes seccionadas. Na amostragem referente à terceira semana de incubação, notou-se forte imobilização do N, que seguiu até a quarta semana, quando a mineralização líquida voltou a predominar. A imobilização pode ser atribuída praticamente à decomposição das raízes seccionadas.

Estes resultados confirmam os obtidos por Adams et al (1989) que recomendam que o tempo máximo de incubação seja ao redor de duas semanas, porém deve-se salientar que as condições impostas neste trabalho eram mais favoráveis à mineralização do que as condições *in situ* relatadas por Adams et al (1989), onde se conclui que este intervalo de 2 semanas é o que traz maior segurança para os estudos de mineralização



Análise de 0-20cm de profundidade

Figura 1. N mineralizado em três diferentes solos acumulado durante 5 semanas de incubação, em condições controladas.

através desta técnica aplicada à plantas como as gramíneas. No caso das leguminosas, este tempo seria, possivelmente menor, face a baixa relação C/N das raízes, necessitando contudo de um estudo neste sentido.

EXPERIMENTO 2

COMPARAÇÃO DAS ESTIMATIVAS DA MINERALIZAÇÃO DO N DO SOLO
PELO MÉTODO DE INCUBAÇÃO AERÓBICA E PELA METODOLOGIA DE
AMOSTRAGEM *IN SITU*, EM PEFIL DE SOLO UNIFORME, COM O N
ACUMULADO POR *Panicum maximum*.

OBJETIVO

Este experimento objetivou comparar o resultado estimado da extração de N do solo pela planta através da metodologia de avaliação *in situ* com os dados reais obtidos diretamente pela análise de N-total na planta indicadora. Além disso, comparar a estimativa da mineralização *in situ* num perfil de solo homogêneo com a estimativa através de modelos baseados em medidas de temperatura e umidade obtidas *in situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

O solo utilizado no experimento, correspondeu à camada de 0-20cm de um podzólico vermelho amarelo distrófico série Itaguaí, cujas características são dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Análise dos constituintes orgânicos e inorgânicos do solo Itaguaí utilizado nos estudos de disponibilidade de N.

Constituintes orgânicos				Constituintes inorgânicos				
%C	N -- ug/g	No --	k (1/dia)	pH	Ca + Mg -- meq/100g	Al --	P - ppm	K -
0.81	910	56	0.0042	5.1	2.0	0.3	1.2	52

As determinações de No e k foram feitas através de cálculos não lineares.

- Incubação aeróbica:

A metodologia aeróbica utilizada foi a descrita por Stanford & Smith (1972). O solo após ser secado ao ar e peneirado (2mm) foi misturado numa proporção de 1:2 de areia lavada (a areia foi tratada com HCl 50% para eliminação de carbonatos). Foram pesadas 750 g desta mistura e colocadas nas colunas de PVC (d.i. 5cm x 30cm). Para a lixiviação das colunas trabalhou-se com uma solução de nutrientes diluída conforme descrita por Cassman & Munns (1980) (1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1mM KH_2PO_4 ; 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Esta solução mantém o estado nutricional do solo numa situação favorável para a mineralização. Ao todo trabalhou-se com 10 colunas, sendo 5 delas preenchidas com a mistura solo : areia e as 5 restantes contendo somente 500 g de areia como branco. Cada coluna foi lixiviada no tempo 0 com 1500ml de extrator (solução de nutrientes) para retirada de todo o N mineral inicialmente presente. As colunas foram colocadas para incubar a 30°C e a umidade obtida após 24h da adição da solução extratora (tensão matricial em torno de 0.2 atm). Após 7 dias, nova lixiviação foi feita com 200ml de extrator, sendo o coletado analisado para N-mineral através da destilação a vapor (método descrito no capítulo 1). Novas lixiviações foram feitas em 14, 28, 45, 70, 91 e 119 dias após início do experimento. As colunas foram tampadas com plástico de forma a permitir a troca de gases e impedir a perda de água.

Através desta metodologia obtém-se o N potencialmente mineralizável (N_0) e a constante k de mineralização, a partir de dados de acumulação do N mineralizado (N_m) e do tempo de incubação (t) em cada amostragem. Segundo Stanford & Smith (1972) os parâmetros N_0 e k são obtidos da equação $N_m = N_0 (1 - \exp(-kt))$, que considera que a mineralização de N segue uma cinética de primeira ordem.

Com base no proposto por Stanford et al (1973a) e Stanford & Epstein (1974), a estimativa da mineralização de N obtida para condições de campo, foi feita mediante aplicação de modelos que relacionam os valores de mineralização potencial com valores de temperatura e umidade. Para a utilização deste modelo, valores de temperatura e umidade foram obtidos durante o período de incubação *in situ*.

Para correção em função da temperatura, utilizou-se um fator de 2 para cada variação de 10°C, $Q_{10}=2$, e para umidade, o fator foi baseado na relação entre os dados de tensão matricial do solo e N mineralizado obtidos dos dados de Stanford & Epstein (1974) de solos da mesma ordem do solo em estudo (Ultissolos).

Dessa forma, o N mineralizado estimado pelo modelo para cada período de observação *in situ*, foi obtido multiplicando-se o fator de umidade e o fator de temperatura pelo valor de N potencialmente mineralizável.

- Metodologia de avaliação in situ:

Utilizou-se como cultura indicadora *Panicum maximum* cv KK16, não fixadora de nitrogênio (Miranda & Boddey, 1987), que foi plantada nas parcelas cerca de 3 meses antes do início do experimento. Cada parcela resumiu-se a um cilindro de concreto (diam. 60cm x 100cm profundidade) enterrado no campo e contendo o solo acima (peneirado e homogeneizado). O experimento possuiu ao todo 12 parcelas, onde cada 4 parcelas foram amostradas ao final de um período de incubação (2 semanas), totalizando 3 períodos de amostragens (6 semanas). As colunas de amostragens foram de PVC rígide (diam. 7.5cm x 60cm prof.) cortadas longitudinalmente para facilitar a retirada do solo após a retirada da coluna.

Imediatamente antes do início das amostragens, faz-se um corte de uniformização da gramínea a aproximadamente 10cm acima da superfície do solo, a seguir, inserem-se três colunas no solo, sendo uma retirada imediatamente (tempo 0) e as outras duas (uma tampada e outra aberta), deixadas por um período de duas semanas. Ao fim das duas semanas, retiram-se as duas colunas e, novamente, se inserem três outras colunas (em outros quatro cilindros), com a retirada imediata de uma delas (tempo final do período-1 e tempo inicial do período-2), e as outras duas deixadas por

mais duas semanas e assim sucessivamente até o último período de incubação.

Após a última amostragem, toda a gramínea rebrotada é colhida e quantificada para acúmulo de matéria seca e N-total conforme Bremner & Mulvaney (1982). O solo retirado das colunas de amostragem foi dividido em sete profundidades (0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60cm), sendo cada fração analisada para N-NH_4^+ e N-NO_3^- (Keeney & Nelson, 1982). O monitoramento da temperatura (10 e 30cm prof.) e umidade (com tensiômetros a 10, 30 e 60cm prof.) do solo foi feito em duas parcelas escolhidas ao acaso.

- Cálculos

$$N_m = Q_f - Q \quad (\text{N-mineralizado})$$

$$N_{mr} = Q_{\#} - Q \quad (\text{N-mineralizado residual})$$

$$N_p = Q_f - Q_a \quad (\text{N-perdido})$$

$$N_{ep} = (N_m - N_{mr}) - N_p = Q_a - Q_{\#} \quad (\text{N-extraído pela planta})$$

onde,

Q = quantidade de N no tempo 0

Q_f = quantidade de N na coluna fechada após incubação

Q_a = quantidade de N na coluna aberta após incubação

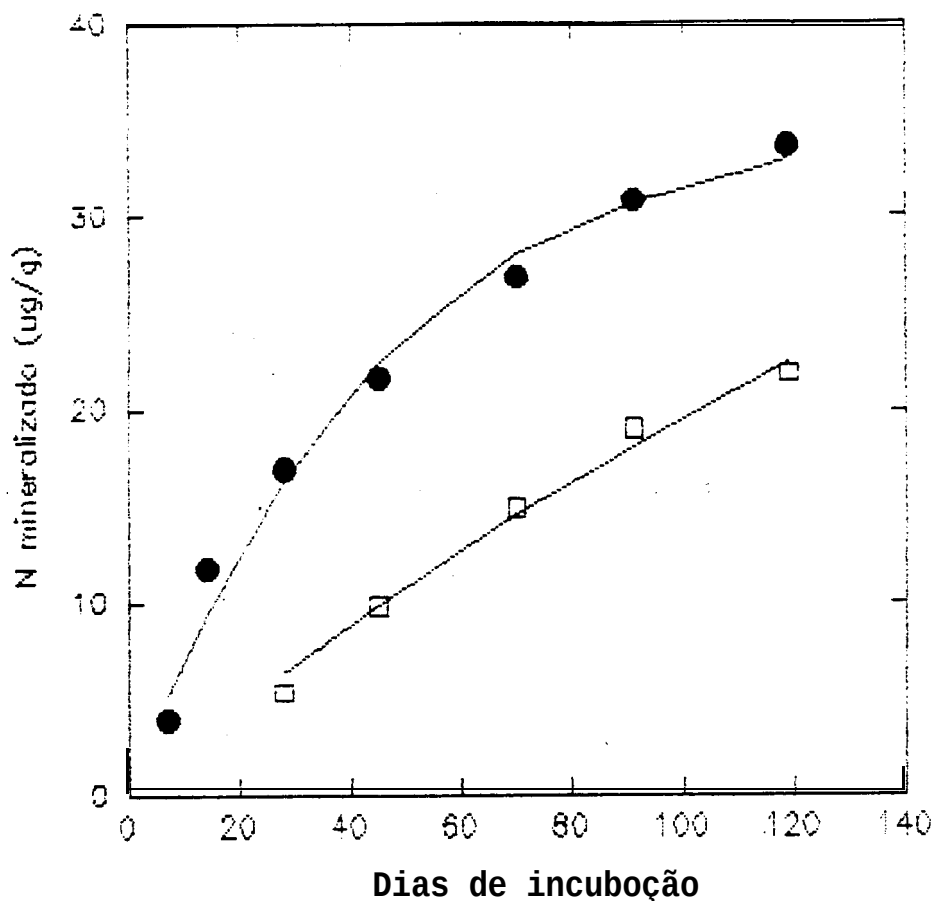
$Q_{\#}$ = quantidade de N no tempo final primeiro período
(inicial do segundo período)

Análises estatísticas:

O melhor ajuste da curva para determinação de N_0 e k obtidos na incubação aeróbica, foram feitos através de cálculos não lineares como sugerido por Smith et al (1980), com auxílio do computador. As demais análises estatísticas foram feitas pelo programa MSTATC-ANOVA2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando-se a Figura 2, onde têm-se as curvas de N mineralizado acumulado em relação aos dias de incubação. Verifica-se que inicialmente, a curva que considera todos os dias de incubação apresentou uma curvilinearidade entre os primeiros pontos, seguindo-se mais linear e novamente se curvando ao final do tempo de incubação. A curvilinearidade inicial, está relacionada à taxas de mineralização mais altas neste período, provavelmente devido ao efeito do pré-tratamento (peneiramento, secagem etc) das amostras (Seyfried & Rao, 1988, Cabrera & Kissel, 1988a). Este efeito refere-se ao aumento da taxa de mineralização durante as primeiras semanas de incubação, que surge da exposição de uma fração da matéria orgânica, que estava protegida da decomposição por estar em interação com partículas do solo (Cortez, 1989), quando o solo é destorreado e peneirado (Jenkinson & Powlson, 1976b). O secamento do solo faz com que a biomassa microbiana



CÍRCULO CHEIO - CURVA 1 ($N_{MIN} = 35 \times (1 - \exp(0.0224t))$)

QUADRADO - CURVA 2 ($N_{MIN} = 56 \times (1 - \exp(0.0043t))$)

Figura 2. Curvas de N mineralizado acumulado vs. tempo de incubação para obtenção do N_0 e da constante k , considerando o período de 0-17 semanas para a obtenção da curva 1 e 2-17 semanas para a curva 2. As estimativas foram obtidas da curva $N_{mint} = N_0 \times (1 - \exp(kt))$.

morra, vindo a se decompor após ao reumidecimento, gerando um fluxo extra de N (Jenkinson & Powlson, 1976a). O trabalho de Stanford & Smith (1972) mostrou que para uma grande variedade de solos estudados, as respectivas constantes k de mineralização são muito similares, estando em torno de 0.054 ± 0.009 1/semana à temperatura de 35°C . Para a estimativa de k e N_0 , Stanford & Smith (1972) desconsideraram o N mineralizado nas 2 primeiras semanas, assumindo que após este período o N mineralizado não sofria influência do pré-tratamento. De outra forma, quando se incluem todas as medidas de N mineralizado, principalmente as iniciais, que se considera serem superestimadas, é comum se observar um valor de k maior e um valor de N_0 menor (Stanford & Smith, 1972; Cabrera & Kissel, 1988a). Dessa forma, da segunda curva mostrada (Figura 2), onde se descartaram o N mineralizado nas duas primeiras semanas de incubação, obteve-se um valor de N_0 igual a 56 mgN/kg e uma constante k de 0.0042 1/dia. Contudo, observou-se a necessidade de um tempo de incubação maior para melhor definir o ponto onde o N mineralizado acumulado tende para N_0 . Transformando-se a constante k determinada neste trabalho, à temperatura de incubação de 30°C , para uma razão semanal, encontra-se um valor de 0.030 1/semana, mas, aplicando-se o modelo de temperatura proposto por Stanford et al (1973a), que estima o valor desta constante para a temperatura de 35°C , obtem-se um valor para k de 0.043

1/semana, o qual está dentro da faixa observada por Stanford & Smith (1972), demonstrando que, para o solo em estudo, cerca de 4.3% do que resta do No é mineralizado semanalmente a temperatura de 35°C e a um nível ótimo de umidade.

De modo contrário ao proposto por Stanford & Smith (1972) e confirmado neste trabalho, Cassman & Munns (1980) encontraram valores para a constante k, em amostras de várias profundidades do perfil natural de um solo, fora dos limites observados por Stanford & Smith (1972), embora, para a superfície (0-18cm), o valor encontrado estivesse na faixa esperada por estes últimos autores. Os altos valores da constante k nas amostras mais profundas, encontrados por estes autores, pode ser um efeito da diferente composição das substâncias nitrogenadas orgânicas. Compostos deste tipo, porém com baixo peso molecular e mais solúveis, poderiam ser transportados da camada superficial para as mais profundas através do arraste pela água e lá se conservarem devido as condições menos propícias a mineralização. A exposição do solo destas camadas subsuperficiais às condições potenciais de mineralização proporcionaria maiores taxas de mineralização ao início da incubação até que os compostos lixiviados se consumissem. Como discutido anteriormente, a inclusão deste período proporcionou constantes k maiores do que a obtida por Stanford & Smith (1972).

Vários trabalhos tem considerado que a taxa de declínio da mineralização de N do solo é inversamente proporcional à reserva de N susceptível ao ataque biológico (Stanford & Smith, 1972; Cassman & Munns, 1980; Talpaz et al, 1981; Seyfried & Rao, 1988). Este comportamento é descrito por uma cinética de primeira ordem. Por outro lado é reconhecido que o solo possui várias formas de N orgânico que diferem em susceptibilidade à mineralização, embora tentativas em definir a contribuição relativa dessas formas têm encontrado sucesso limitado. Gianello & Bremner (1986, 1988) demonstraram que o N mineralizado em 33 solos brasileiros, através de dois métodos químicos se correlacionaram muito bem com as estimativas obtidas através do modelo de Stanford & Smith (1972) que tem como base uma cinética de primeira ordem para a mineralização de N. Os dois procedimentos químicos foram aplicados a uma solução contendo 50 compostos orgânicos incluindo todos os que tem sido detectados em significantes quantidades no solo ou em hidrolizados do solo, verificando-se que principalmente glucosamina, galactosamina, asparagina e glutamina decompuseram-se com a formação de NH_4^+ através do tratamento químico. Como observado por Bremner (1965), nenhum reagente químico é conhecido por simular completamente a atividade dos microrganismos do solo, ou liberar seletivamente a fração de N do solo que é utilizada pelos microrganismos. Também,

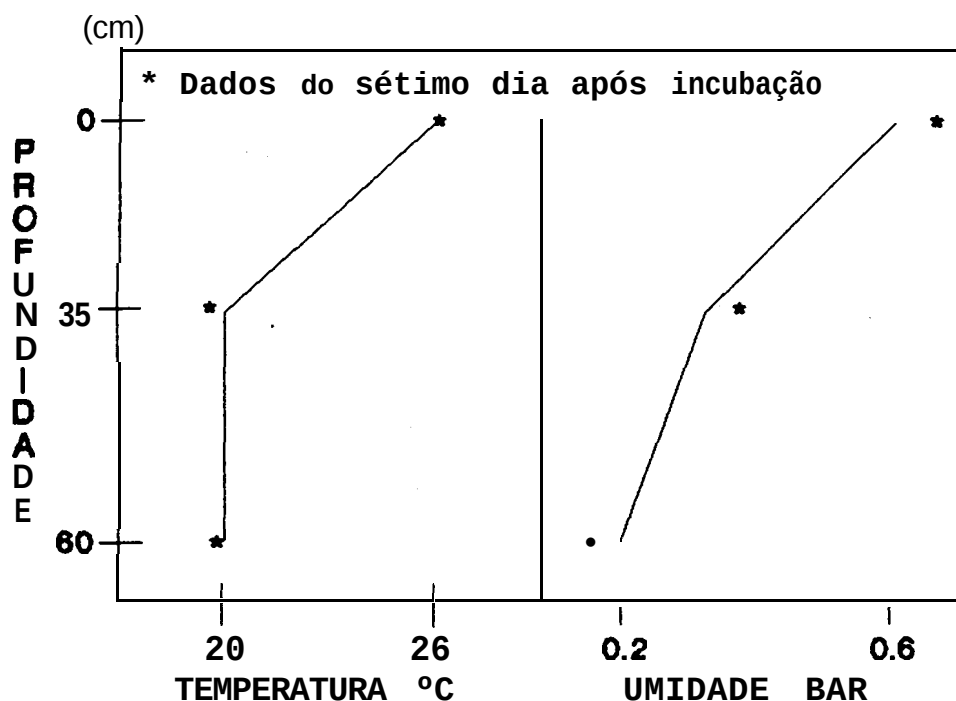
considera-se que grande parte do N do solo seja relativamente resistente à decomposição microbiana (Stanford, 1982). Como o princípio dos métodos testados por Gianello & Bremner (1986; 1988) baseam-se em extração branda através de hidrólise alcalina o que implica na liberação de N de compostos menos complexos, é possível que esta fração do N-orgânico seja também o principal substrato da mineralização dos microrganismos. Seguindo este raciocínio, é muito provável que a composição do N orgânico do solo potencialmente disponível seja semelhante para muitos tipos de solo, tal como foi sugerido por Sanford & Smith (1972), como justificativa da obtenção de constantes de mineralização sempre ao redor de 0.054 ± 0.009 1/dia para muitos tipos de solo.

A utilização de modelos que consideram alguns fatores que interferem na mineralização do N em condições naturais, tem sido avaliados para se obter melhores estimativas da disponibilidade de N (Smith et al, 1977; Cabrera & Kissel, 1988b; Hadas et al, 1989). A temperatura e a umidade são os principais fatores de importância biológica que mais variam no solo durante o desenvolvimento da planta. Stanford et al (1973a) e Stanford & Epstein (1974), demonstraram que tanto a temperatura quanto a umidade tem influência sobre a mineralização do N representados por modelos matemáticos. Com base nestes trabalhos, estimou-se a

mineralização do N de acordo com as condições climáticas que prevaleceram *in situ*.

De acordo com Stanford et al (1973a), a correção para temperatura (T), é feita sobre a constante k. Neste experimento seguiu-se a equação $k_{\text{corrigido}} = k \times 2^{0.1T-3}$. Como as temperaturas foram tomadas a 10 e a 35cm de profundidade, assumiu-se que a temperatura teve variação linear da superfície até 35cm mantendo-se, a partir daí constante (Figura 3). As constantes k de mineralização foram calculadas para cada uma das sete profundidades avaliadas na metodologia *in situ*.

A correção de umidade foi feita diretamente através da relação proposta por Stanford & Epstein (1974), onde no nível de umidade em que a mineralização do N foi máxima, considerou-se como umidade ótima. Daí, quando o solo está com 100% desta umidade, tem-se 100% de N mineralizado. Neste experimento, os dados de umidade foram tomados em relação à tensão matricial. Os dados de Stanford & Epstein (1974) mostraram uma relação muito próxima entre os dados de tensão e o N mineralizado para os solos da mesma ordem (Ultissolos) do solo em estudo neste trabalho. As curvas de umidade (Stanford & Epstein, 1974) mostram que uma quantidade maior de água é perdida na faixa de tensão entre 0.1 e 2 bares, dessa forma para este trabalho utilizaram-se 2 equações para descrever a relação entre o N mineralizado e o



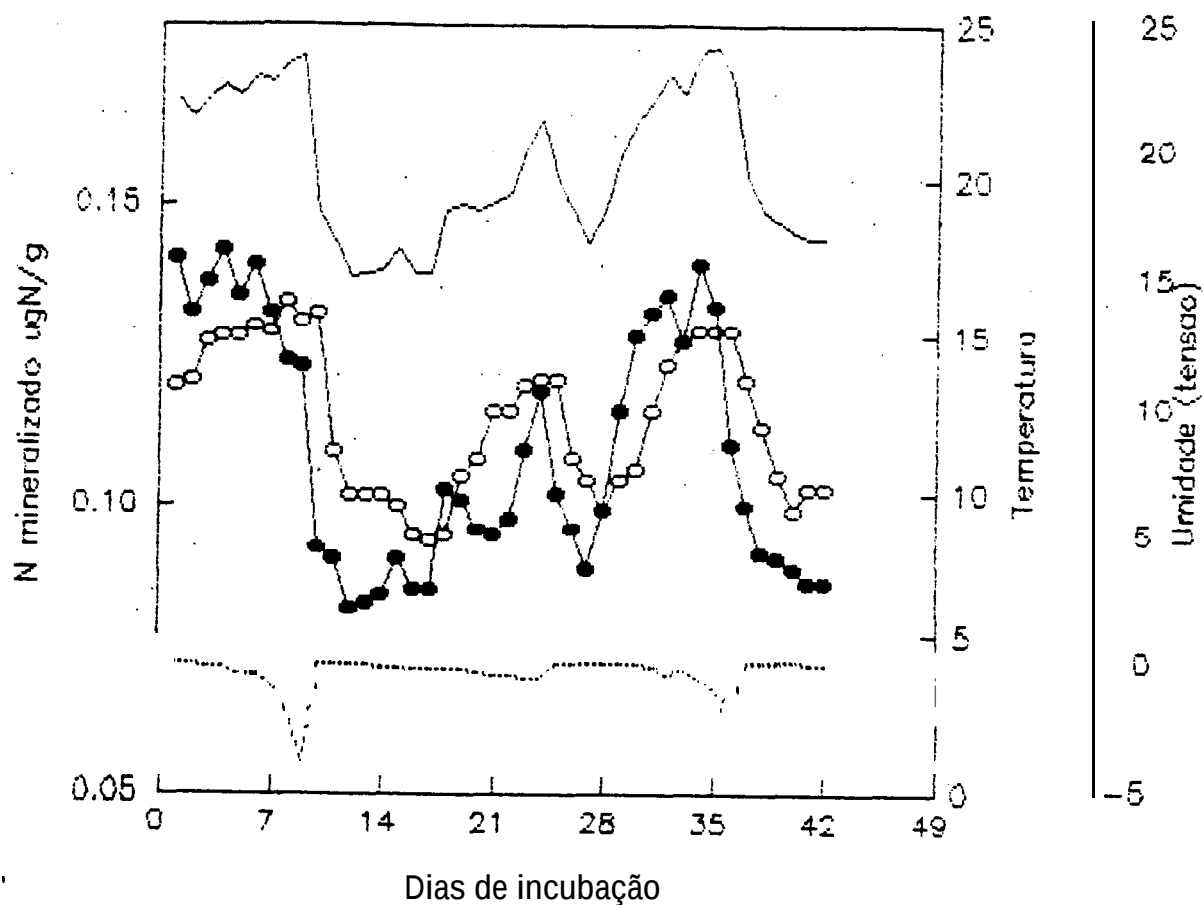
* CONSIDEROU-SE CONSTANTE PARA A CAMADA DE 30-60CM A TEMPERATURA OBTIDA NOS 30 CM DE PROFUNDIDADE A CADA DIA, SENDO LINEAR A VARIAÇÃO NA CAMADA SUPERFICIAL A PARTIR DO OBTIDO A 10 E 30CM DE PROFUNDIDADE.

** CONSIDEROU-SE LINEAR A VARIAÇÃO DA UMIDADE OBTIDA A 10 E 30CM E A 30 E 60CM.

Figura 3. Comportamento da temperatura e da umidade do solo considerados para as estimativas dos mesmos para as 7 profundidades do solo

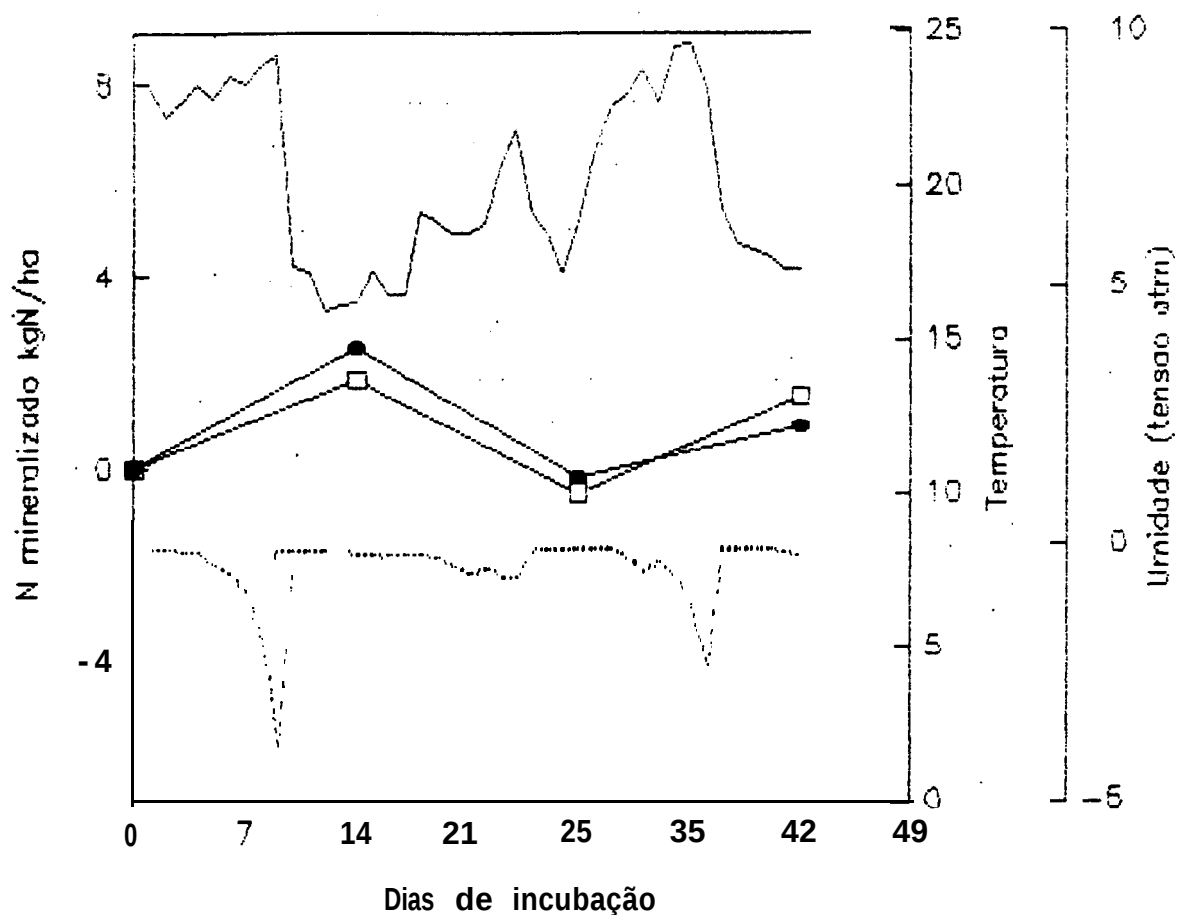
valor de tensão matricial do solo a cada dia. Para os dias com valores entre 0.2 e 2 bares de tensão, usou-se a equação: Fator a ser multiplicado pelo N mineralizado (F_h) = $101.7 - 8.72 \times$ tensão matricial do solo (T_m), para a faixa de 2 a 15 bares usou-se a equação: $F_h = 86.1 - 0.89$ bares usou-de umidade foi feita em apenas três pontos, assumiu-se que da superfície até 30cm a variação da umidade foi linear e descrita por uma função obtida pelos pontos a 10cm e a 30cm, abaixo dos 30cm, a relação linear foi obtida pelos pontos a 30cm e a 60cm (Figura 3).

Os dados obtidos demonstraram que, neste experimento, a temperatura foi mais importante do que a umidade no controle da mineralização do N (Figuras 4 e 5). A pouca influência da umidade parece estar ligada ao tipo de solo em estudo. O efeito da umidade sobre a mineralização baseou-se na correlação dos dados de mineralização de N e os níveis de tensão mostrados para os ultissolos no trabalho de Stanford & Epstein (1974). Em relação aos valores máximos de mineralização, obtidos em torno de 0.33 bar de tensão, o percentual de N mineralizado à 15 bares ainda era bastante grande (cerca de 72% do máximo mineralizado à 0.33 bar), o que demonstra que a umidade teve pouca influência para o solo utilizado neste estudo. Durante este estudo, como a umidade do solo esteve praticamente abaixo de 1 atm de tensão, o N



* CÍRCULOS CHEIOS- N MINERALIZADO 0-50CM
 CÍRCULOS - N MINERALIZADO 30-40CM
 LINHA CHEIA - TEMPERATURA
 LINHA TRACEJADA - UMIDADE

Figura 4. Comportamento do N mineralizado, estimado pelo modelo em relação às oscilações de temperatura e umidade



* CÍRCULOS CHEIOS - N MINERALIZADO 0-50CM
 QUADRADOS - N MINERALIZADO 30-40CM
 LINHA CHEIA - TEMPERATURA
 LINHA TRACEJADA - UMIDADE

Figura 5. Comportamento do N mineralizado, estimado pela metodologia das colunas em relação às oscilações de temperatura e umidade

mineralizado sempre esteve ao redor do máximo a uma dada temperatura.

Comparando-se os dados estimados pelo modelo para diferentes profundidades, nota-se que estes fatores (temperatura e umidade) pouco influenciaram a mineralização do N do solo (Figura 4). A principal razão para a semelhança entre as profundidades, está na pequena diferença entre os valores de temperatura entre as profundidades (Figura 4) e na mínima influência da umidade sobre a mineralização.

Com relação a metodologia de avaliação *in situ*, observou-se que a estimativa do N absorvido pela planta em comparação à quantidade realmente extraída por ela foram similares (Tabela 3). Este resultado demonstrou que a metodologia de avaliação *in situ* pouco interferiu nos processos que atuam sobre o N no solo (Keeney, 1980; Binkley & Hart, 1989), proporcionando maior segurança na interpretação dos dados de mineralização de N.

De acordo com a Tabela 3 e a Figura 5, observa-se que as estimativas de mineralização de N utilizando a coluna fechada ou a aberta foram muito próximas. Esta semelhança entre as estimativas permite afirmar que o processo de lixiviação de N não foi importante como dreno de N mineral do sistema.

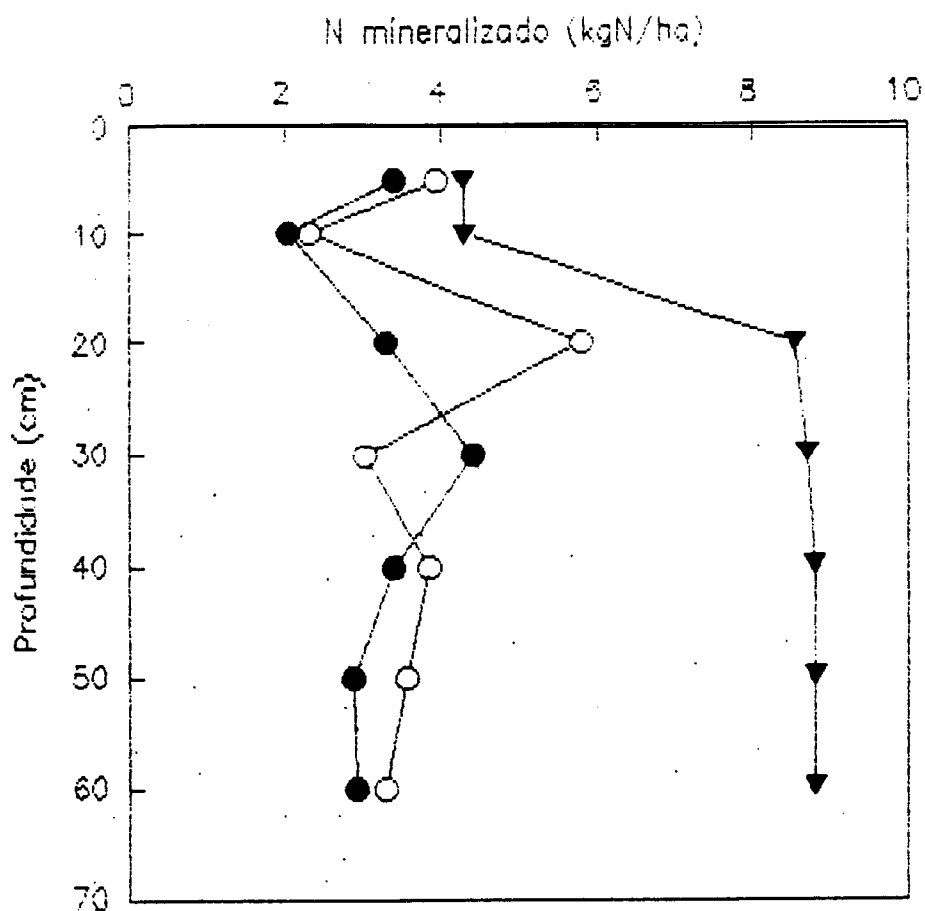
Tabela 3 - Estimativas do N mineralizado calculado com base na coluna aberta e na fechada assim como a do N extraído pela planta calculada pela coluna aberta e acumulado na planta. Valores médios de 4 repetições.

Tempo em semanas	N-mineralizado		N-extraído	
	Fechada	Aberta	Estimado	Planta
		kg N/	ha	
0 - 2	16.87(2.86)*	17.06(2.26)	15.29(3.70)	-
2 - 4	-5.08(3.15)	-2.53(3.72)	7.07(2.32)	-
4 - 6	10.52(1.90)	11.23(3.35)	5.16(2.37)	-
Total	22.32(3.46)	25.76(5.36)	27.06(4.12)	30.05(5.81)

* Os números entre parenteses correspondem aos desvios em relação à média.

O estudo da mineralização de N *in situ*, mostrou que este processo é mais ativo no período de altas temperaturas e ótimo teor de água, sendo que com a queda da temperatura, no segundo período de avaliação, observou-se pequena imobilização líquida do N do solo (Figura 5). É sabido que a atividade biológica é afetada pela temperatura, contudo não é de se esperar que a queda da temperatura de 23°C para 17°C em média, reduza drasticamente a mineralização de N, ao menos que a variação da mineralização em relação a temperatura siga um fator Q_{10} maior do que 2 (Tabatabai & Al-Khafaji, 1980) ou seja reflexo da alta variabilidade dos resultados obtidos neste período.

A distribuição da mineralização de N entre as diferentes camadas foi bem diferente, não obstante o perfil do solo deste experimento ser artificialmente homogêneo. Como observado por Hadas et al (1989), com o aumento da profundidade ocorreu diminuição da mineralização do N do solo (Figuras 5 e 6). A maior mineralização observada nos primeiros 10cm do solo foi, possivelmente, devido a maior susceptibilidade desta camada as variações de temperatura e umidade, responsáveis por fluxos extra de N mineralizado gerados da decomposição de compostos orgânicos que são expostos pela desestabilização das interações com minerais do solo (Jenkinson & Powlson, 1976a).



CÍRCULO CHEIO - N MINERALIZADO ESTIMADO PELA COLUNA FECHADA
CÍRCULO - N MINERALIZADO ESTIMADO PELA COLUNA ABERTA
TRIÂNGULO CHEIO - N MINERALIZADO ESTIMADO PELO MÉTODO

Figura 6. Comparação do N mineralizado estimado pelo modelo e estimado pela metodologia de colunas nas diferentes profundidades do solo.

O significado da mineralização abaixo dos 20 cm e sua distribuição com a profundidade, foi similar aos encontrados em experimentos de incubação em laboratório (Cassman & Munns, 1980; Hadas et al, 1986). Neste trabalho, encontrou-se que a contribuição da mineralização da camada de 20-60cm para a nutrição da planta, foi cerca de 50% da estimativa total de N extraído. Esta significativa contribuição da camada de 20-60cm deste solo deve-se, em grande parte, ao alto teor de N orgânico encontrado em toda a sua profundidade, pois tratou-se de um perfil homogêneo conseguido artificialmente com a camada de 0-20cm de um solo natural. Contudo, em solos similares ou onde altos teores de N mineral estão presentes nas camadas subsuperficiais, devido a lixiviação, plantas com raízes profundas podem aproveitar esta reserva de N conforme mostrado neste trabalho (Figura 7). A importância disso está relacionada ao cultivo de determinadas plantas que podem aprofundar seu sistema radicular para obter água em profundidade (Taylor, 1981), fugindo do estresse hídrico, e utilizar possíveis reservas de NO_3^- oriundas do processo de lixiviação.

Comparando os resultados de mineralização estimados pelo modelo com os obtidos da medição *in situ*, observa-se que o modelo superestimou as quantidades mineralizadas, principalmente nas camadas mais profundas (Figura 8). Tal comportamento também foi observado por

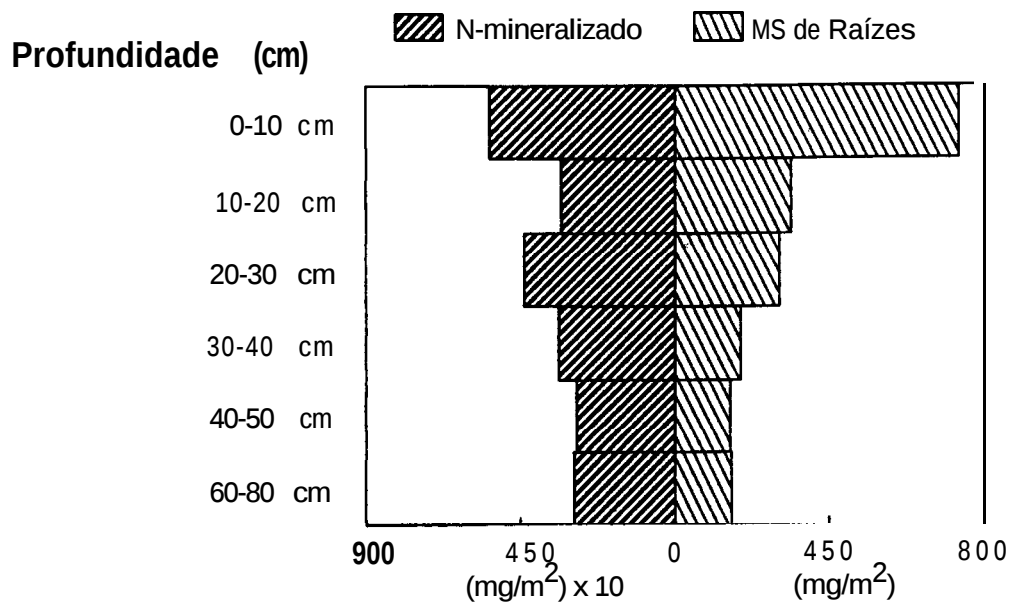
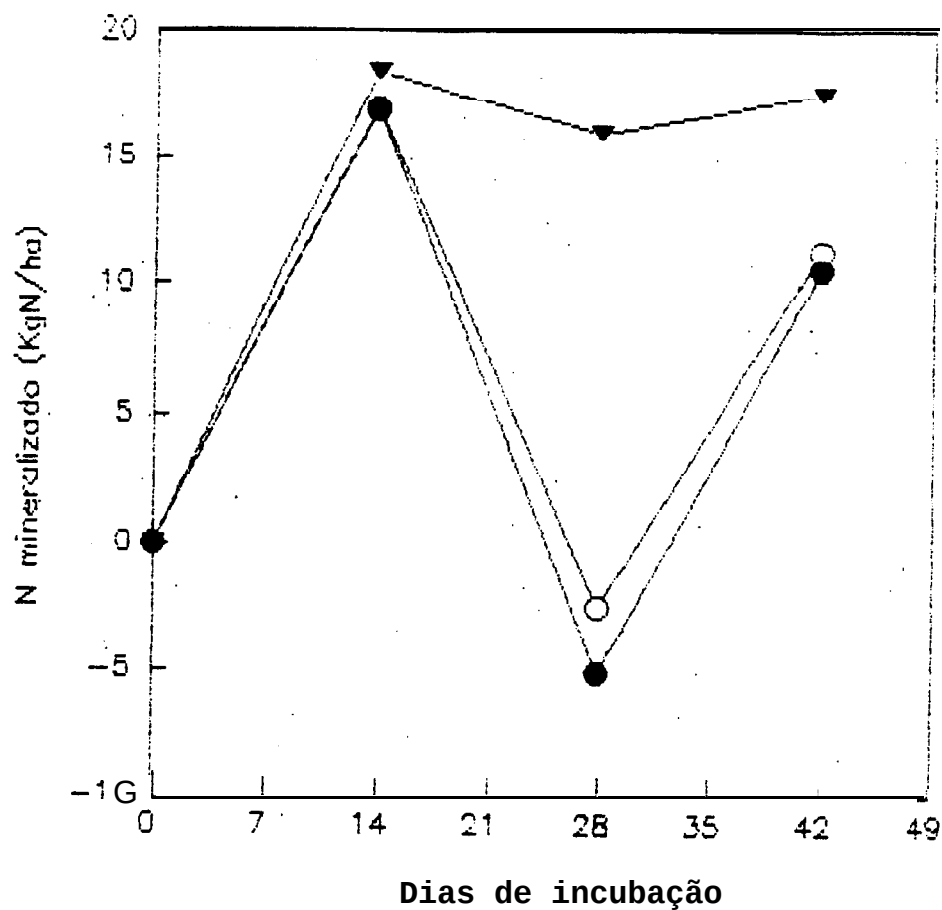


Figura 7. N mineralizado acumulado estimado pela metodologia de colunas, e distribuição de raízes de *Panicum maximum* nas diferentes profundidades do solo Itaguaí.



CÍRCULO CHEIO - N MINERALIZADO ESTIMADO PELA COLUNA FECHADA
 CÍRCULO - N MINERALIZADO ESTIMADO PELA COLUNA ABERTA
 TRIÂNGULO CHEIO - N MINERALIZADO ESTIMADO PELO MÉTODO

Figura 8. Comparação do N mineralizado estimado pelo modelo e estimado pela metodologia de colunas.

Cabrera & Kissel (1988b), cujo estudo demonstrou que o modelo superestimou até 343% do N mineralizado estimado através de um balanço de N incluindo plantas de Sorgo. Smith et al (1977) utilizando um modelo semelhante ao utilizado neste trabalho, encontrou boa correlação com o N acumulado por plantas de Beterraba, porém quando este mesmo modelo foi utilizado para comparação com as determinações *in situ*, também superestimaram o N mineralizado em profundidade em cerca de 20% (Hadas et al, 1989). Contudo, como é mostrado na Figura 8, o comportamento obtido dos resultados de mineralização *in situ* foi muito bem representado pelo modelo utilizado. A superestimativa da mineralização *in situ* através do modelo pode ter sido devida ao pouco peso dado aos coeficientes dos modelos matemáticos que representaram o comportamento da mineralização em relação à temperatura e umidade, ou devido a necessidade de se incluir no modelo, outros fatores que possam ter tido maior influência sobre a mineralização do N nas condições deste trabalho.

EXPERIMENTO 3

**ESTIMATIVAS DA MINERALIZAÇÃO DO N DO SOLO PELO MÉTODO DE
AMOSTRAGEM *in situ*.**

OBJETIVO

Avaliar a mineralização do N do solo em perfil natural pela metodologia de colunas *in situ* baseado no N acumulado por *Panicum maximum* e *Brachiaria arrecta*.

MATERIAL E MÉTODOS

Baseando-se nos bons resultados obtidos através da técnica de Raison et al (1987) no primeiro experimento, tratou-se nesta segunda etapa em se verificar a estimativa desta técnica em um solo com perfil natural. O solo em questão foi o mesmo utilizado no estudo anterior, porém tratou-se de uma área experimental anteriormente cultivada (análise química do solo na Tabela 4). Cresceu-se *Brachiaria arrecta* cv IRI 442 e *Panicum maximum* cv KK16, gramíneas estas incapazes de obter significativa contribuição de N fixado biologicamente (Boddey

Tabela 4. Conteúdo inicial de N no solo e alguns dados de fertilidade das diferentes profundidades estudadas no experimento de colunas em perfil natural.

Prof. (cm)	%N	pH	P -- ug/g --	K --	Ca --- meq/100ml---	Mg	Al
0-5	0.11	4.5	13.2	77.0	2.4	1.5	0.3
5-15	0.09	4.3	6.3	28.0	2.0	1.4	0.5
15-30	0.08	4.3	4.0	19.0	2.0	1.1	0.5
30-60	0.06	4.3	2.4	10.0	1.6	1.3	0.5

& Victoria, 1986; Miranda et al, 1990). As duas gramíneas foram plantadas num delineamento em split plot com 3 repetições (blocos). Cada parcela (2.5 x 5.0m) foi dividida em 4 subparcelas (1.5 x 1.0m) para 4 colheitas sequenciais, a cada duas semanas, com 0.5m em torno de cada subparcela considerados como contorno. Dentro de cada subparcela, uma área de 1m² foi reservada para colheita da parte aérea da planta e uma área de 0.5m² para amostragem com as colunas de PVC (7.5cm d.i. x 60cm). O período de amostragem iniciou-se após 60 dias do plantio das gramíneas, tempo suficiente para que as raízes das plantas estivessem bem estabelecidas. As plantas foram cortadas a uma altura de 3cm imediatamente antes da primeira amostragem, e a partir daí, a parte aérea foi colhida das respectivas subparcelas a cada amostragem. A acumulação de N para cada período foi calculado subtraindo-se a acumulação total de N das diferentes subparcelas correspondentes a cada período de amostragem do acumulado até o período de amostragem anterior.

A técnica de amostragem do solo seguiu exatamente o descrito no experimento anterior. Contudo, para o corrente experimento, foi necessário adaptar à extremidade da coluna de amostragem, um segmento cilíndrico de aço para aumentar a resistência das colunas de PVC e facilitar a penetração destas no solo.

As análises de N-mineral foram feitas através do sistema de fluxo contínuo (FIA): a técnica de Giné et al (1980) para NO_3^- e a técnica descrita no capítulo 1 para NH_4^- . A parte aérea das gramíneas colhidas a cada 2 semanas de intervalo foi secada (48h, 65°C) e moídas de forma a se obter partículas menores do que 0.85mm. As análises para N-total da planta foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bremner & Mulvaney (1982).

Medidas de precipitação e da temperatura do ar (Figura 9) foram obtidas da estação meteorológica localizada na Estação Experimental de Itaguaí (Pesagro), situada a aproximadamente 1 km a oeste da área experimental.

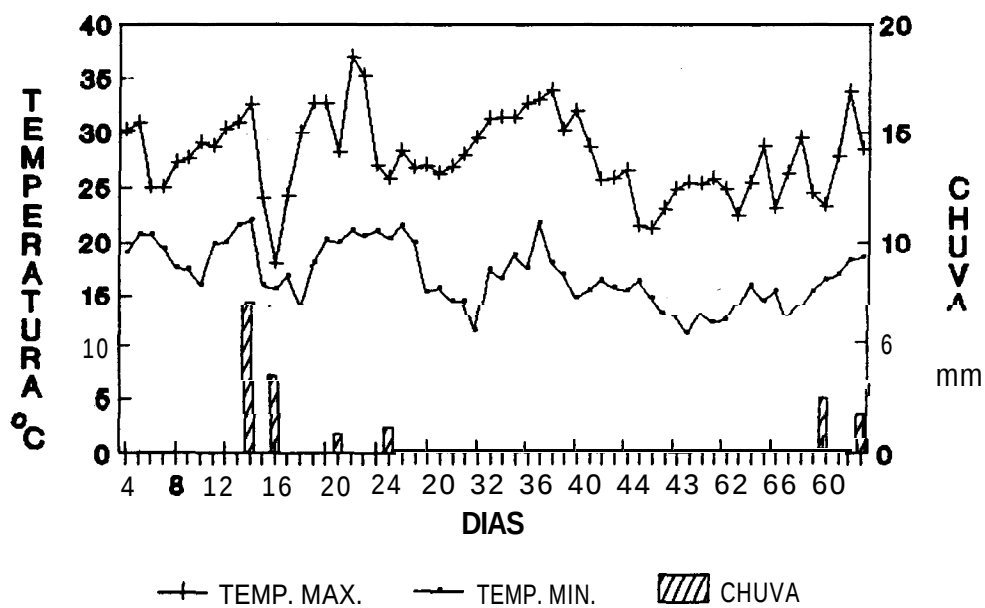


Figura 9. Dados de temperatura máxima e mínima, e de precipitação referentes ao período de 63 dias de experimento de campo em perfil natural.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi planejado que as amostragens deveriam ser feitas a um intervalo de 14 dias como recomendado por Adams et al (1989). Em um estudo preliminar, encontrou-se evidências de que incubações superiores a este período podem levar a uma subestimativa da mineralização de N (experimento 1), provavelmente devido a imobilização do N pelas raízes cortadas na inserção das colunas (Figura 1, Adams et al, 1989). Infelizmente, devido a um período de fortes chuvas, a amostragem programada para a segunda avaliação foi prorrogada por mais 7 dias, totalizando um período de incubação de 21 dias. Na primeira amostragem, o N mineral do solo variou de 11 a 3 ug/g em amostras de solo das camadas de 0-5cm ate 30-60cm, sendo NH_4^+ a principal forma de N encontrada. Com o progresso do estudo, o N mineral do solo diminui, ao passo que a relação entre NO_3^- e NH_4^+ aumentou. Este fato parece estar diretamente relacionado com a melhoria das condições

aeróbicas, que favorecem a nitrificação (Schmidt, 1982), face a íntima relação entre o nível de umidade do solo e a proporção de NO_3^- para NH_4^+ (Figura 10). Como já observado muitas vezes, o solo é muito heterogêneo em sua concentração das formas de N-mineral (Young & Aldag, 1982). Apesar de ter se utilizado a média de 3 pares de colunas para obtenção dos dados apresentados na Tabela 5, os desvios padrões foram muito altos. Contudo, certas observações são pertinentes: Aparentemente, o decrescimento do N mineral do solo com o tempo não foi fruto somente da absorção de N pela planta, mas também por uma considerável imobilização, principalmente nos primeiros 14 dias de incubação (Tabela 5). Os dados também mostram que após o primeiro período, quando houve chuvas intermitentes, a mineralização foi maior na camada mais superficial, decrescendo consideravelmente após 35 dias do início do experimento, quando praticamente não houve mais chuvas (Figura 9). Tudo indica que a maior mineralização observada no segundo período deve-se ao conhecido efeito de reumidecimento em favor da mineralização (Jenkinson & Powlson, 1976a), sendo que este processo diminuiu com o prevalescimento de condições mais secas (Stanford & Epstein, 1974). Com respeito às estimativas obtidas do método para o N extraído pela planta, para o primeiro período de amostragem

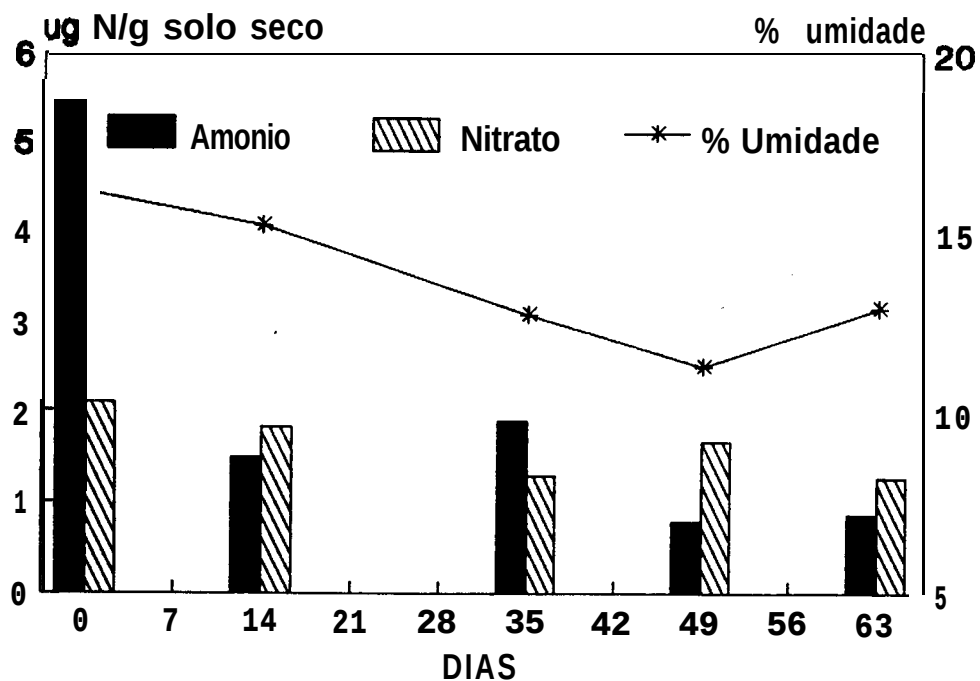


Figura 10. Concentração de NH_4^+ e NO_3^- em relação à umidade do solo em 5 tempos de amostragem. Médias de 4 profundidades e 3 repetições (3 colunas por repetição).

Tabela 5. Estimativas do N mineralizado do solo nas 4 profundidades sob *Panicum maximum* e *Brachiaria arrecta* usando a técnica de colunas. Médias de 3 repetições (3 pares de coluna por repetição).

Gramínea	Prof. (cm)	Época de amostragem (dias)			
		0-14	14-35	35-49	49-63
		----- ug g ⁻¹ -----			
<i>P. maximum</i>	0-5	-3.54	4.45	0.24	-0.23
	5-15	-4.54	1.03	-0.15	0.62
	15-30	-1.14	0.89	0.98	0.35
	30-60	-1.18	0.03	0.59	0.55
<i>B. arrecta</i>	0-5	-2.98	6.53	0.29	3.03
	5-15	-2.90	1.02	0.22	1.46
	15-30	-2.98	0.52	0.45	-0.60
	30-60	-1.51	1.76	-0.47	0.32
erro padrão da média		0.83	0.47	0.80	0.57

¹ Estimativa do N mineralizado = N mineral na coluna fechada no final do período de incubação - N mineral na coluna inserida e amostrada no começo do período.

houve uma boa aproximação entre a estimativa e o valor real acumulado pela planta, exceto para o resultado obtido do cálculo com a coluna aberta para as parcelas com *B. arrecta* (Tabela 6). Esta subestimativa não poderia ter sido devido a lixiviação do N mineral das colunas abertas, pois não houve chuvas durante este período (Figura 9). Durante o segundo período, as estimativas do método foram menores do que a metade do N acumulado pelas gramíneas, provavelmente devido ao efeito de imobilização discutido anteriormente. Novamente, as estimativas de extração de N pela *B. arrecta* obtidas do cálculo com as colunas abertas foram consideravelmente menores do que as obtidas das colunas fechadas. Durante este período ocorreram fortes chuvas, o que poderia ter explicado este efeito, porém o mesmo não foi observado para as estimativas com *P. maximum*.

Durante os dois últimos períodos de amostragem não se registraram chuvas até 5 dias antes do fim do experimento e esta condição seca (Figura 9) refletiu-se na estimativa do N extraído pela planta e pelo acumulado nesta. Os valores negativos observados para o acúmulo de N de *B. arrecta* durante o terceiro período e de *P. maximum* no último período foram um efeito da variabilidade entre as parcelas. Os dados superestimados da extração de N pela planta observados na época seca, podem ter sido causados pela maior

Tabela 6. N extraído por *Panicum maximum* e *Brachiaria arrecta* conforme estimativa da técnica de colunas. Médias de 3 repetições.

	<i>P. maximum</i>	<i>B. arrecta</i>	DP da média
Período 1. 0-14 dias			
coluna fechada 1	0.898	1.255	0.164
coluna aberta	1.120	0.356	0.057
N total na planta 3	1.133	1.370	0.037
Período 2. 14-35 dias			
coluna fechada	1.008	0.987	0.292
coluna aberta	1.079	0.283	0.170
N Total na planta	2.617	2.503	0.114
Período 3. 35-49 dias			
coluna fechada	0.631	0.696	0.270
coluna aberta	0.526	0.686	0.276
N Total na planta	0.595	-0.782	0.234
Período 4. 49-63 dias			
coluna fechada	0.824	0.414	0.199
coluna aberta	0.388	0.452	0.112
N Total na planta	-0.220	1.568	0.264

1	N acumulado pela planta (estimado) = N mineral total na coluna fechada incubada <i>in situ</i> no período - N mineral na coluna inserida no final do período.		
2	N acumulado pela planta (estimado) = N mineral total na coluna aberta incubada <i>in situ</i> no período - N mineral na coluna inserida no final do período.		
3	N acumulado no material da planta colhido no final do período.		

perturbação do solo no interior da coluna durante a sua inserção (Smethurst & Nambiar, 1989).

Quando se utiliza esta técnica de amostragem *in situ* para estimar a extração de N pela planta, é necessário considerar tanto o cálculo com a coluna aberta quanto com a coluna fechada. O cálculo com a coluna fechada deve superestimar o N absorvido pela planta, já que se inclui o N perdido por lixiviação. Por outro lado, as perdas por lixiviação consideradas no cálculo com as colunas abertas são maiores do que se observa externamente, uma vez que as raízes das plantas não só removem o N do solo continuamente assim que é mineralizado, mas também as raízes vivas extraem água do solo (Tynker, 1981). Em consequência, a verdadeira extração de N pela planta deve estar entre as duas estimativas feitas com as colunas aberta e fechada. Nos dados apresentados aqui, as colunas fechadas produziram as melhores estimativas de N extraído, pela planta. Contudo, novos estudos são necessários para averiguar os efeitos do tempo de incubação sobre a mineralização do N, levando-se em consideração que embora curtos períodos sejam favoráveis para evitar interferências das raízes é necessário que o acúmulo de N neste período seja suficiente para minimizar os erros gerados pelo grau de sensibilidade nas determinações das formas minerais.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Para determinação dos teores de N-NH_4^+ em solos pobres, a metodologia do Salicilato mostrou-se a mais sensível (0.01 ugN/ml), quando comparada às metodologias do Indofenol e a de destilação a vapor, sendo tão precisa e exata quanto esta última.
- 2 - Foi possível adaptar a metodologia colorimétrica do Salicilato ao sistema de fluxo contínuo (FIA) de forma a manter a sensibilidade a um excelente nível (0.05 ug/ml) e proporcionar a velocidade de determinação desejável para estudos de mineralização (entre 60-80 determinações por hora).
- 3 - A estimativa do N potencialmente mineralizável e da constante k podem ser afetadas pelo pré-tratamento das amostras, sendo que este efeito parece interferir até duas semanas após o início da incubação.

- 4 - A utilização de modelos matemáticos representou muito bem o comportamento da mineralização comparada às estimativas *in situ*. Porém as estimativas fornecidas por estes modelos foram maiores do que as obtidas *in situ*.
- 5 - A umidade teve pouca influência sobre a mineralização do N do solo, tomando-se como base a metodologia de avaliação *in situ*.
- 6 - A estimativa da extração de N pela planta através da metodologia de avaliação *in situ*, produziu resultados semelhantes ao obtidos pela planta quando se seguiu o tempo de incubação de 2 semanas.
- 7 - Em condições secas, a mineralização do N pode ser superestimada por efeito da perturbação do solo na inserção das colunas utilizadas na metodologia de avaliação *in situ*.
- 8 - A metodologia de colunas para avaliação *in situ* mostrou-se bastante promissora para o estudo da disponibilidade do N mineral no solo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ABSHAHI, A., GOYAL, S.S., MIKKELSEN, D.S. Simultaneous determination of urea and ammonia nitrogen in soil extracts and water by high performance liquid chromatography. soil Sci. Soc. Am. J., v.52, n.4, p.969-974. 1988.
- ADAMS, M.A.; ATTIWILL, P.M. Nutrient cycling and nitrogen mineralization in eucalypt forests of south-eastern Australia. II. Indices of nitrogen mineralization. Plant Soil, v.92, p.341-362. 1986.
- ADAMS, M.A.; POLGLASE, P.J.; ATTIWILL, P.M.; WESTON, C.J. In situ studies of nitrogen mineralization and uptake in forest soils; some comments on methodology. Soil Biol. Biochem., v.21, n.3, p.423-429. 1989.
- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. Wiley, New York. 1977.

- ALLISON, F.E. Soil organic matter and its role in trop production. Elsevier Scientific Publishing Co. New York. 1973.
- BALL, P.R.; RYDEN, J.C. Nitrogen relationships in intensively managed temperate grasslands. Plant and Soil. v.76, no.1-3, p.23-33. 1984.
- BANWART, W.L., TABATABAI, M.A. AND BRFMNER, J.M. Determination of ammonium in soil extracts and water samples by ammonia electrode. Commun. Soil Sci. Plant Anal., v.3, p.449-458. 1972.
- BEAUCHAMP, E.G.; REYNOLDS, W.D.; BRASCHE VILLENEWE, D.; KIRKBY, K. Nitrogen mineralization kinetics with different soil pretreatments and cropping histories. Soil Sci. Soc. Am. J., v.50, n.6, p.1478-1483. 1986.
- BINKLEY, D. Ion exchange resin bags: factors affecting estimates of nitrogen availability. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.46, p.1181-1184. 1984.
- BINKLEY, D.; HART, S.C. The components of nitrogen availability assessments in forest soils. In: Advances in Soil Science. (Stewart, B.A.) Springer-Verlag, New York. v.10, p.57-112. 1989.
- BINKLEY, D.; MATSON, P. Ion exchange resin bag method for assessing forest soil nitrogen availability. Soil Sci. Soc. Am. J., v.47, n.5, p.1050-1052. 1983.

- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. CRC Crit. Rev. Plant Sci., v.6, n.3, p.209-266. 1987.
- BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Métodos de estudo da origem de nitrogênio em plantas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITROGÊNIO EM PLANTAS, vol.2, Itaguaí. Cadernos de Trabalhos Apresentados... Itaguaí, Imprensa Universitaria da UFRRJ. p.417-447. 1990.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with Brachiaria and Paspalum grasses using ^{15}N labelled organic matter and fertilizer. Plant Soil, v.90, p.265-292. 1986.
- BOSATTA, E.; BERENDSE, F. Energy or nutrient regulation of decomposition: implications for the mineralization-immobilization response to perturbations. Soil Biol. Biochem., v.16, no.1, p.63-67. 1984.
- BRAUN, W.A.G. Indústria de Fertilizantes nitrogenados. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITROGÊNIO EM PLANTAS, Itaguaí. Anais do 1 Simpósio Brasileiro. Itaguaí, Imprensa Universitária da UFRRJ. p.89-157. 1990.
- BREMNER, J.M. Inorganic forms of nitrogen. In: Methods of soil Analysis. (Black, C.A.) Am. soc. Agron., Madison, Wisconsin, USA. p.1179-1237. 1965.

- BROADBENT, F.E. Empirical modeling of soil nitrogen mineralization. *Soil Sci.*, v.141, n.3, p.208-213. 1986.
- BROADBENT, F.E.; NAEASHIMA, T. Effect of added salts on nitrogen mineralization in three California soils. *Soil Sci. soc. Am. Proc.* v.35, p.457-460. 1971.
- BURITY, H.A.; FARIS, M.A.; COULMAN, B.E. Nitrogenase activity of alfafa grown alone and in mixture with grass under greenhouse conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, v.65, p.787-791. 1985.
- BURTON, D.L.; GOWER, D.A.; RUTHERFORD, P.M.; MCGILL, W.B. Amino acid interference with ammonium determination in soil extracts using the automated indophenol method. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.20, n.5, p.555-565. 1989.
- CABRERA, M.L.; KISSEL, D.E. Evaluation of a method to predict nitrogen mineralized from soil organic matter under field conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.52, n.4, p.1027-1032. 1988a.
- CABRERA, M.L.; KISSEL, D.E. Length of incubation time affects the parameter values of the double exponential model of nitrogen mineralization. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.52, n.4, p.1186-1188. 1988b.

- CADISCH, G.; CARVALHO, E.F.; SUHET, A.R.; VILELA, L.; SOARES, W.; SPAIN, J.M.; URQUIAGA, SI; GILLER, K.E.: BODDEY, R.M. The importance of legume N₂-fixation in sustainability of pastures in the cerrados of Brazil. In: International Grassland Congress, Palmerston North, New Zealand. 1992 (in press).
- CADISCH, G.; SCHUNKE, R.M.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; GILLER, K. Microbial process in N cycling in the cerrados of Brazil. Presented at the workshop: MANAGING LEGUME BASED PASTURES IN THE TROPICS - TOWARDS A MECHANISTIC UNDERSTANDING. 10-15 september, Cali, Colômbia. 1990.
- CAMPBELL, C.A. Soil organic carbon, nitrogen and fertility. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U., Eds. Soil Organic Matter Amsterdam. Netherlands. p. 173-271. 1978.
- CARTER, J.N.; JENSEN, M-E.; BOSMA, s.m. Determining nitrogen fertilizer needs for sugarbeets from residual soil nitrate and mineralizable nitrogen. Agron. J. v.66, p.319-323. 1974.
- CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N. Nitrogen mineralization as affected by soil moisture, temperature, and depth. Soil Sci. Soc. Am. J., v.44, n.6, p.1233-1237. 1980.
- CORNISH, P.S.; RAISON, R.J. Effects of phosphorus and plants on nitrogen mineralisation in three grassland soils. Plant Soil, v.47, n.1, p.289-296. 1977.

- CORTEZ, J. Effect of drying and rewetting on mineralization and distribution of bacterial constituents in soil fractions. *Biol. Fertil. Soils*, v.7, n.2, p.142-151. 1989.
- CROOKE, W.M. AND SIMPSON, W.E. Determination of ammonium in kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J. Sci. Fd. Agric.* v.22, p.9-10. 1971.
- DALAL, R.C., The nature and distribution of soil nitrogen in tropical soils. *Trop. Agric.* v.55, p.369-376. 1978.
- DEANS, J.R.; MOLINA, J.A.E.; CLAPP, C.E. Models for predicting potentially mineralizable nitrogen and decomposition rate constants. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, v.50, n.2, p.323-326. 1986.
- DEMETRIO, R. Efeitos da aplicação da matéria orgânica sobre a biomassa-C microbiana do solo e o crescimento e o crescimento e absorção de nitrogênio em milho (*Zea mays* L.). Tese de mestrado, UFRRJ, Itaguaí. 98pág. 1988.
- DISTEFANO, J.F.; GHOLZ, H.L. A proposed use of ion exchange resins to measure nitrogen mineralization and nitrification in intact soil cores. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.17, n.9, p-989-998. 1986.

- DÖBEREINER, J. O nitrogênio na agricultura brasileira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITROGÊNIO EM PLANTAS, Itaguaí. Anais do 1 Simpósio Brasileiro. Itaguaí, Imprensa Universitária da UFRRJ. p. 1-17. 1990.
- DORICH, R.A.; NELSON, D.W. Direct colorimetric measurement of ammonium in potassium chloride extracts of soils. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.47, p.833-836. 1983.
- DUQUE, F.F.; DE POLLI, H.; SOUTO, S.M.; ALMEIDA, D.L. de Utilização mais intensiva e diversificada de adubos verdes. A Lavoura, v.88, p.20-23. 1986.
- EDMONDS, R.L.; MCCOLL, J.G. Effects of forest management on soil nitrogen in Pinus radiata stands in the Australian capital territory. For. Ecol. Manag., v.29, p.199-212. 1989.
- EMMER, J.M.; TIETEMA, A. Temperature dependent nitrogen transformations in acid oak beech forest litter in the Neetherlands. Plant and Soil. v.122, p.193-196. 1990.
- ENO, C.F. Nitrate production in the field by incubating the soil in polyethylene bags. Soil Sci. Soc. Am. Proc., v.24, p.277-279. 1960.
- FIRESTONE, M.K. Biological denitrification. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS. Madison. ASA. p.289-326. 1982.

- FISHER, F.M.; GOSZ, J.R. Effects of plants on net mineralisation of nitrogen in forest soil microcosms. *Biol. Fertil. Soils*, v.2, p.43-50. 1986.
- FOX, R.H.; PIEKIELEK, W.P. A rapid method for estimating the nitrogen supplying capability of a soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.42, n.5, p.751-753. 1978.
- FOX, R.H.; ROTH, G.W.; IVERSON, K.V.; PIEKELEK, W.P. Comparison of soil and tissue nitrate tests for predicting soil nitrogen availability to corn. *Agron. J.* v.81, p.971-974. 1989.
- FREITAS, S.S.; CARDOSO, C.O.N.; CAMARGO, O.A.; LOPES, E.S. Mineralização e imobilização de nitrogênio em solo tratado com torta de filtro e carbonata de cálcio. *R. Bras. Ci. Solo.* v.12, p. 243-248. 1988.
- FU, M.H.; XU, X.C.; TABATABAI, M.A. Effect of pH on nitrogen mineralization in trop-residue-treated soils. *Biol. Fertil. Soils*, v.5, n.2, p.115-119. 1987.
- GALLAGHER, P.W.; BARTHOLOMEW, W.V. Comparison f nitrate production and other procedures in determining nitrogen availability in southeastern coastal plain soils. *Agron. J.* v.56, p.179-184. 1964.
- GENTRY, C.E.; WILLIS, R.B. Improved method for automated determination of ammonium in soil extracts. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.19, n.6, p.721-737. 1988.

- GIANELLO, C.; BREMNER, J.M. A rapid steam distillation method of assessing potentially available organic nitrogen in soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.19, n.14, p.1551-1568. 1988.
- GIANELLO, C.; BREMNER, J.M. Comparison of chemical methods of assessing potentially available organic nitrogen in soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.17, n.2, p.215-236. 1986.
- GINÉ, M.F.; BERGAMIN FO, F.H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. SIMultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Anal. Chem. Acta.* v.114, p. 191-197. 1980.
- GLINSKI, J. & STEPNIEWSKI, W. Soil aeration and its role for plants. CRC Press. Inc., Boca Raton, Flórida. 1982.
- GOSZ, J.; WHITE, C.S. Seasonal and annual variation in nitrogen mineralization and nitrification along an elevational gradient in New Mexico. *Biogeochemistry*, v.2, p.281-297. 1986.
- GUPTA, V.V.S.R.; GERMIDA, J.J. Populations of predatory protozoa in field soils after five years of elemental sulfur fertilizer application. *Soil Biol. Biochem.*, v.20, p.787-791. 1988.

- HADAS, A., FEIGENBAUM, S.; FEIGIN, A.; PORTNOY, R. Nitrogen mineralization rate in profiles of differently managed soil types. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v.50, p.314-319. 1986.
- HADAS, A., FEIGIN, A., FEIGENBAUM, S. AND PORTNOY, R. Nitrogen mineralization in the field at various soil depths. *J. Soil Sci.* v.40, p.131-137. 1989.
- HAMILTON, S.D.; SMITH, C.J.; CHALK, P.M.; HOPMANS, P. A model based on measurement of soil and plant ^{15}N enrichment to estimate N_2 fixation by soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in pots. *Soil Biol. Biochem.*, v.24, n.1, p.71-78. 1992.
- HARMSSEN, G.W.; KOLENBRANDER, G.L. Soil inorganic nitrogen. In: BARTHOLOMEW W.V.; CLARK F.E., Eds. *SOIL NITROGEN* Madison. ASA, p.43-92. 1965.
- HART, S.C.; FIRESTONE, M.K. Evaluation of three in situ soil nitrogen availability assays. *Can. J. For. Res.*, v.19, p.185-191. 1989.
- HAUCK, R.D.; TANJI, K.K. Nitrogen transfers and mass balances. In: STEVENSON, F.J., Ed. *NITROGEN IN AGRICULTURAL SOIL* Madison. ASA. p.891-925. 1982.
- HUNTJENS, J.L.M. The influence of living plants on mineralization and immobilization of nitrogen. *Plant Soil*, v.35, p.77-94. 1971.

- JANSSON, S.L.; PERSSON, J. Mineralization of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOIL Madison. ASA. p.229-252. 1982.
- JENKINSON, D.S. The nitrogen economy of the broadbalk experiments. 1. Nitrogen balance in the experiments. In: Rothamsted Experimental Station Report for 1976, part 2. p.103-109. 1977.
- JENKINSON, D.S.; FOX, R.H.; RAYNER, J.H. Interactions between fertilizer and soil nitrogen - the so-called 'priming' effect. J. Soil. Sci., v-36, p.425-444. 1985.
- JUMA, N.G.; PAUL, E.A.; MARY, B. Kinetic analysis of net nitrogen mineralization in soil. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.48, p.753-757. 1984.
- KEENEY, D.R. Nitrogen - availability indices. In: PAGE, A.L., MILLER, R.H., KEENEY, D.R., METHODS OF SOIL ANALYSIS 2nd edition. Madison. ASA. p.711-733. 1982b. Eds
- KEENEY, D.R. Nitrogen management for maximum efficiency and minimum pollution. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOIL. Madison. ASA. p.605-649. 1982a.
- KEENEY, D.R. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems: A literature review. For. Sci., v.26, p.159-171. 1980.

- KEENEY, D.R.; BREMNER, J.M. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 6. mineralizable nitrogen. Soil Sci. soc. Am. Proc. v.31, No.1, p.34-39. 1967.
- KEENEY, D.R.; BREMNER, J.M. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 4. Exchangeable ammonium, nitrate, and nitrite by direct-distillation methods. Soil Sci. Amer. Proc., v.30, p.583-587. 1966.
- KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen - Inorganic forms. In: Methods of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties. (Page, A.L.; Miller, R.H. & Keeney, D.R.) Madson, USA. p.643-698. 1982.
- KEERTHISINGHE, D.G.; DE DATTA, S.K.; MENGEL, K. Importance of exchangeable and nonexchangeable soil ammonium in nitrogen nutrition of lowland rice. Soil Sci., v.140, p.194-201. 1985.
- KEMPERS, A.J.; ZWEERS, A. Ammonium determination in soil extracts by the Salicylate method. Commun. Soil Sci. Plant Anal., v.17, n.7, p.715-723. 1986.
- KLADIVKO, E.J.; KEENEY, D.R. Soil nitrogen mineralization as affected by water and temperature interactions. Biol. Fertil. Soils, v.5, n.3, p.248-252. 1987.

- KOWALENKO, C.G. Organic nitrogen, phosphorus and sulfur in soils. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U., Eds SOIL ORGANIC MATTER Amsterdam. Netherlands. p. 95-136. 1978.
- KUCHNICKI, T.C.; WEBSTER, G.R.B. A comparison of HPLC analysis of nitrate in soils with the phenoldisulfonic acid and hydrazine sulfate methods. Can. J. Soil Sci., v.66, p.151-157. 1986.
- KUIKMAN, P.J.; JANSEN, A.G.; VAN VEEN, J.A. ¹⁵N-nitrogen mineralization from bacteria by protozoan grazing at different soil moisture regimes. Soil Biol. Biochem., v.23, n.2, p.193-200. 1991.
- LADD, J.N.; JACKSON, R.B. Biochemistry of ammonification. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS. Madison. ASA. p.173-228. 1982.
- LANDESWAK, P.; PIISPANEM, R. Changes in concentrations of free aminoacids during humification of spruce and aspen leaf litter. Soil Biol. Biochem., v.21, n.7, p.975-978. 1989.
- LATHWELL, D.J.; DUBEY, H.D.; FOX, R.H. Nitrogen-suppling power of some tropical soils of Puerto Rico and methods for its evaluation. Agron. J. v.64, p.763-766. 1972.
- LAURA, R.D. On the "priming effect" of ammonium fertilizers. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.39, no.2, p.385. 1975.

- LEGG, J.O.: MEISINGER, J.J. Soil nitrogen budgets. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL - SOILS. Madison. ASA. p.502-566. 1982.
- LINDEMANN, W.C.: CARDENAS, M. Nitrogen mineralization potential and nitrogen transformations of sludge-amended soil. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.48, p.1072-1077. 1984.
- MACLEAN, A.A. Measurement of nitrogen supplying-power of soils by extraction with sodium bicarbonate. Nature, v.203, n.4951, p.1307-1308. 1964.
- MAGDOFF, F.R.; JOKELA, W.E.; FOX, R.H.; GRIFFIN, G.F. A soil test nitrogen availability in the northeastern united states. Commun. Soil Sci. Plant Anal., v.21, n.13, p.1103-1115. 1990.
- MAGDOFF, F.R.; ROSS, D.; AMADON, J. A soil test for nitrogen availability to corn. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.48, p.1301-1304. 1984.
- MALAVOLTA, E. Pesquisa com nitrogênio no Brasil - passado presente e perspectivas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITROGÊNIO EM PLANTAS, vol.1, Itaguaí. Cadernos de Trabalhos Apresentados... Itaguaí, Imprensa Universitária da UFRRJ. p.89-157. 1990.
- MARION, G.M.; KUMMEROW, J.; MILLER, P.C. Predicting nitrogen mineralization in chaparral soils. Soil Sci. Soc. Am. J. v.45, p. 956-961. 1981.

- MATAR, A.E.; BECK, D.; GARABET, S. Nitrate-N test a guide to N fertilization of wheat in the mediterranean region. *commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.21, n.13, p.1117-1130. 1990.
- MCAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE ARANGO, H.; WOODHOUSE, W.W. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by N¹⁵. *Agron. J.*, v.50, p.334-337. 1958.
- MEENTEMEYER, V. Macroclimate and lignin control litter decomposition rates. *Ecology*, v.59, p.465-472. 1978.
- MELILLO, J.M.; ABER, J.D.; LINKINS, A.E.; RICCA, A.; FRY, B.; NADELHOFFER, K.J. Carbon and nitrogen dynamics along the decay continuum: Plant litter to soil organic matter. *Plant Soil*, v.115, n.2, p.189-198. 1989.
- MEYER, J.H. Rapid simultaneous rating of soil texture, organic matter, total nitrogen and nitrogen mineralization potential by near infra-red reflectance. *S. Afr. J. Plant Soil*. v.6, no.1, p.59-61. 1989.
- MEYER, J.H.; WOOD, R.A.; LEIBBRANDT, N.B. Recent advances in determining the N requirement of sugarcane South African sugar industry. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* v.60, p. 205-211. 1986.

- MIRANDA, C.H.B.; BODDEY, R.M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in nitrogen-15-labeled soil. Agron. J., v.79, p.558-563. 1987.
- MOLINA, J.A.E.; CLAPP, C.E.; LARSON, W.E. Potentially mineralizable nitrogen in soil: the simple exponential model does not apply for the first 12 weeks of incubation. Soil Sci. Soc. Amer. J. v.44, p.442-443. 1980.
- NADELHOFFER, K.J.; ABER, J.D.; MELILLO, J.M. Fine roots, net primary production, and soil nitrogen availability: a new hypothesis. Ecology, v.66, n.4, p.1377 1985.
- NADELHOFFER, K-J.; ABER, J.D.; MELILLO, J.M. Seasonal patterns of ammonium and nitrate uptake in nine temperate forest ecosystems. Plant and Soil. v.80, p.321-335. 1984.
- NASCIMENTO, V.M. DO; MELO, W.J. DE; NEPTUNE, A.M.L. Efeitos da rotação de culturas sobre frações da matéria orgânica de um latossolo sob vegetação de cerrado. Científica, v.16, n.1, p.13-19. 1988.
- NELSON, D.W. Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS. Madison. ASA. p.327-364. 1982.

- NÉMETH, K. The availability of nutrients in the soil as determined by electro-ultrafiltration (EUF). *Adv. Agronomy*, v.31, p.155-188. 1979.
- NOMMIK, H. Predicting the nitrogen-supplying power of acid forest soils from data on the release of CO₂ and NH₃ on partial oxidation. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, v.7, n.6, p.569-584. 1976.
- NOMMIK, H.; VAHTRAS, K. Retention and fixation of ammonium and ammonia in soils. F.J., Ed. *NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS*. Madison. ASA. p.123-172. 1982.
- PARSONS, J.W. Chemistry and distribution of aminosugars in soils and soil organisms. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. Eds. *SOIL BIOCHEMISTRY* v. 5, Marcel Dekker Inc., New York. p.197-227. 1981.
- PATRICK JR., W.H. Nitrogen transformations in submerged soils. In: STEVENSON, F.J., Ed. *NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS*. Madison. ASA. p.449-466. 1982.
- RAISON, R.J.; CONNELL, M.J.; KHANNA, P.K. Methodology for studying fluxes of soil mineral-N In situ. *Soil Biol. Biochem.*, v.19, n.5, p.521-530. 1987.
- ROBBINS, G.B.; BUSHELL, J.J.; MCKEON, G.M. Nitrogen immobilization in decomposing litter contributes to productivity decline in ageing pastures of green panic (*Panicum maximum* var. *trichoglume*). *J. Agric. Sci.*, v.113, p.401-406. 1989.

- RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection Analysis. Anal. Chem. Acta. v.78, p. 145-180. 1975.
- SANTOS FA, M.M.; FREIRE DOS REIS, B.; BERGAMIN FO, H.; BACAN, N. Determination of low level of ammonium in natural waters employing pre concentration by cation exchange resin in flow injection analysis. p. 1-12. 1992. (submetido).
- SCHIMIDT, E.L. Nitrification in soil. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS . Madison. ASA. p.253-288. 1982.
- SCOTT, T.J.; MITCHELL, M.J.; SANTOS, A.; DESTAFFEN, P. Comparison of two methods for measuring ammonium in solution samples. Commun. Soil Sci. Plant Anal., v.20, n.11, p.1131-1144. 1989.
- SEARLE, P.L. Reducing interferences by aminoacids in the determination of ammonium by an automated indophenol method. Commun. Soil Sci. Plant Anal. v.21, no.9&10, p.831-835. 1990.
- SEYFRIED, M.S.; RAO, P.S.C. Kinetics of nitrogen mineralization in Costa Rican soils: Model evaluation and pretreatment effects. Plant Soil, v.106, n.2, p.159-169. 1988.
- SIERRA, J. Analysis of soil nitrogen mineralization as estimated by exponential models. Soil Biol. Biochem., v.22, n.8, p.1151-1153. 1990.

- SMETHURST, P.J.; NAMBIAR, E.K.S. An appraisal of the in situ soil-tore technique for measuring nitrogen uptake by a Young *Pinus radiata* plantation. *Soil Biol. Biochem.*, v.21, n.7, p.939-942. 1989.
- SMITH, J.L.; SCHNABEL, R.R.; MCNEAL, B.L.; CAMPBELL, G.S. Potential errors in the first-order model for estimating soil nitrogen mineralization potentials. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v.44, p.996-1000. 1980.
- SMITH, O.L. *Soil Microbiology: A model of decomposition and nutrient cycling*. CRC Press. Inc., Boca Raton, Flórida. 1982.
- SMITH, S.J.; STANFORD, G. Evaluation of a chemical index of soil nitrogen availability. *Soil Sci.* v.111, p.228-232. 1971.
- SMITH, S.J.; YOUNG, L.B.; MILLER, G.E. Evaluation of soil nitrogen mineralization potentials under modified field conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v.41, p.74-76.
- SOWDEN, F.J.; CHEN, Y.; SCHNITZER, M. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta.* v.41, p.1524-1526. 1977.
- SPARLING, G.P.; CHESHIRE, M.V.; MUNDIE, C.M. Effect of barley plants on the decomposition of ^{14}C -labelled soil organic matter. *J. Soil Sci.* v.33, p.89-100. 1982.

- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organismst pure and applied aspects. London. Chapman and Hall ed. 256 pág. 1990.
- STANFORD, G. Assesment of soil nitrogen availabillity. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS. Madison. ASA. p.651-687. 1982.
- STANFORD, G. Evaluation of ammonium release by alkaline permanganate extraction as an index of soil nitrogen availability. Soil Sci., v.126, n.4, p.244-253. 1978.
- STANFORD, G. Extractable organic nitrogen and nitrogen mineralization in soils. Soil Sci. v.106, p.345-351. 1968.
- STANFORD, G.; AYNES, A.S.; DOI, M. Mineralizable soil nitrogen in relation to fertilizer needs of sugarcane in hawaii. Soil Sci. v.99, p.132-137. 1965.
- STANFORD, G.; CARTER, J.N.; WESTERMAN, D.T.; MEISINGER, J.J. residual nitrate and mineralizable nitrogen in relation to nitrogen uptake by irrigated sugar beets. Agron. J. v.69, p.303-308. 1977.
- STANFORD, G.; DEMAR, W.H. Extraction of soil organic nitrogen by autoclaving in water: 1. The NaOH-distillable fraction as an index of nitrogen availability in soils. Soil Sci., v.107, n.3, p.203-205. 1969.

- STANFORD, G.; EPSTEIN, E. Nitrogen mineralization-water relations in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. v.38, p.103-107. 1974.
- STANFORD, G.; FRERE, M.H.; SHWANINGER, D.H. Temperature coefficient of soil nitrogen mineralization. Soil Sci. v.115, no.4, p.321-323. 1973a.
- STANFORD, G.; LEGG, J.O. Correlation of soil nitrogen availability indexes with nitrogen uptake by plants. Soil Sci. v.105, p.320-326. 1968.
- STANFORD, G.; LEGG, J.O.; SMITH, S.J. Soil nitrogen availability evaluations based on nitrogen mineralization potentials of soils and uptake of labelled and unlabelled nitrogen by plants. Plant and Soil v.39, p.113-124. 1973b.
- STANFORD, G.; SMITH, J. Estimating potentially mineralizable soil nitrogen from a chemical index of soil nitrogen availability. Soil Sci., v.122, n-2, p.71-76. 1976.
- STANFORD, G.; SMITH, S.J. Nitrogen mineralization potentials of soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc., v.36, p.465-472. 1972.
- STANFORD, G.; SMITH, S.J. Oxidative release of potentially mineralizable soil nitrogen by acid permanganate extraction. Soil Sci., v.126, n.4, p.210-218. 1978.

- STEVENSON, F.J. Organic forms of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS. Madison. ASA. p.67-122. 1982b.
- STEVENSON, F.J. Origin and distribution of nitrogen in soil. In: STEVENSON, F.J., Ed. NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS. Madison. ASA. p.1-42. 1982a.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; MOSQUERA, D.; MENDEZ, J.E. Inhibition of nitrate accumulation in tropical grassland soil: effect of nitrogen fertilization and soil disturbance. J. Soil Sci. v.39, p.407-416. 1988.
- TABATABAI, M.A.; AL KHAFAJI, A.A. Comparison of nitrogen and sulfur mineralization in soils. Soil Sci. Soc. Amer. J., v-44, n.5, p.1000-1005. 1980.
- TALPAZ, H.; FINE, P.; BAR YOSEF, B. On the estimation of N-mineralization parameters from incubation experiments. Soil Sci. Soc. Am. J. v.45, p. 993-996. 1981.
- THOMAS, G.W.; HARGROVE, W.L. The chemistry of soil acidity. adams, F. Ed. SOILS ACIDITY AND LIMING. Monograph, no 12, 2nd edition, Madison. ASA. p.3-56. 1984.
- TOLEDO, J.M. Pasture development for cattle production in the major ecosystems of the tropical american lowlands. In: Proceedings of the International Grassland Congress, Japan. 1985.

- TURCHENEK, L.W.; OADES, J.M. Fractionation of organo-mineral complexes by sedimentation and density techniques. *Geoderma*, v.21, p. 311-343. 1979.
- URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. Dinâmica do N no solo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITROGÊNIO EM PLANTAS, vol.1, Itaguaí. Cadernos de Trabalhos Apresentados... Itaguaí, Imprensa Universitária da UFRRJ. p.181-251. 1990.
- URQUIAGA, S.; LIBARDI, P.L.; REICHARDT, K.; MORAES, S.O.; VICTORIA, R.L. Variação do nitrogênio nativo e do proveniente do fertilizante, em terra roxa estruturada, durante o desenvolvimento de uma cultura de feijão. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.8, p.223-227. 1984.
- VAN VEEN, J.A.; LADD, J.N.; AMATO, M. Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with [$^{14}\text{C}(\text{U})$] glucose and [^{15}N] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.*, v.17, n.6, p.747-756. 1985.
- VERSTRAETEN, L.M.J.; VLASSAK, K.; LIVENS, J. Factors affecting the determination of available soil nitrogen by chemical methods. 1. Comparison of extratable with mineralized nitrogen. *Soil Sci.* v.99, p.299-305. 1970.

- WARING, S.A.; BRENNER, J.M. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. *Nature*, v.201, n.4922, p.951-952. 1964.
- WEDIN, D.A.; TILMAN, D. Species effects on nitrogen cycling: a test with perennial grasses. *Oecologia*, v.84, p.433-441.1990.
- WESTERMAN, D.T.; CROTHERS, S.E. Measuring soil nitrogen mineralization under field conditions. *Agron. J.*, v.72, p.1009-1012. 1980.
- WESTERMAN, R.L.; TUCKER, T.C. Effect of salts and salts plus nitrogen-15-labelled ammonium chloride on mineralization of soil nitrogen, nitrification and immobilization. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* v.38, no.4, p.602-605. 1974.
- YOUNG, J.L.; ALDAG, R.W. Inorganic forms of nitrogen in soil. In: STEVENSON, F.J., Ed. *NITROGEN IN AGRICULTURAL SOILS* Madison. ASA. p.43-66. 1982.
- ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; BERGAMIN FO, H.; PESSEDA, L.C.R.; MORATTI, J.; GINE, M.F. Manual da análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo. Piracicaba. USP-CENA. 45 pág. 1981.