

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Uso da Abundância Natural de  $^{15}\text{N}$  em Estudos com  
Fertilizantes Orgânicos**

**Caio de Teves Inácio**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**USO DA ABUNDÂNCIA NATURAL DE  $^{15}\text{N}$  EM ESTUDOS COM  
FERTILIZANTES ORGÂNICOS**

**CAIO DE TEVES INÁCIO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Segundo Urquiaga**

*e Co-orientação do Pesquisador*  
**Phillip Michael Chalk**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor** no  
Curso de Pós-Graduação em  
Agronomia, área de concentração em  
Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2015

631.86

I35u

T

Inácio, Caio de Teves, 1974-

Uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em estudos com fertilizantes orgânicos / Caio de Teves Inácio. – 2015. 118 f.: il.

Orientador: Segundo Urquiaga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2015.

Bibliografia: f. 103-118.

1. Adubos e fertilizantes orgânicos - Teses. 2. Isótopos - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Compostos orgânicos – Teses. I. Urquiaga Caballero, Segundo Sacramento, 1950- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

**CAIO DE TEVES INÁCIO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 03/12/2015.

---

Segundo Urquiaga. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Everaldo Zonta. Prof. Dr. UFRRJ

---

Bruno José Rodrigues Alves. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

José Guilherme Guerra. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Gabriela Bielefeld Nardoto. Profa. Dra. UnB

## **DEDICATÓRIA**

À minha esposa Viviane,  
e às minhas filhas Beatriz e Mariana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Embrapa e ao curso de pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela gratificante oportunidade e todo suporte para realizar esta pesquisa e frequentar o curso de doutorado.

Agradeço ao meu orientador Dr. Segundo Urquiaga a chance da parceria e pela irrestrita confiança depositada em mim ao longo desses quatro anos.

Agradeço especialmente ao Dr. Phillip M. Chalk por ter sido parceiro de trabalho em tantas publicações e ter sido frequentemente meu mentor e incentivador durante cinco anos.

Agradeço aos colegas da Embrapa Solos e Embrapa Agrobiologia pelos incentivos e troca de experiências e ideias. É muito bom trabalhar com vocês.

Um agradecimento especial à Dra. Silmara Bianchi, analista da Embrapa Solos, pelas análises elementares de carbono e nitrogênio, e ao Dr. Renato Moutinho, analista da Embrapa Agrobiologia, pelas análises no espectrômetro de massa de razão isotópica.

Agradeço ao estagiário, agora mestrando (UFRJ), Paulo O. de Souza pela ajuda no preparo das amostras, e ao agrônomo, agora doutorando (UFRRJ), João Antônio Montibeller pela participação no trabalho de campo.

Agradecimento especial à Maria Gabriela Ferreira da Mata, doutoranda deste mesmo curso (UFRRJ), e responsável pelo módulo de produção de hortaliças orgânicas da Fazendinha Agroecológica.

Agradeço ao Sr. Francisco Epifânio, sócio do Rancho SF Ltda., em Teresópolis, e ao agrônomo Nelson Pontes, pela parceria nos trabalhos de campo.

Agradeço aos professores e alunos que tanto se esforçam para manter o alto nível do curso.

Agradeço à minha família que está sempre ao meu lado.

## RESUMO

INÁCIO, Caio de Teves. **Uso da Abundância Natural de  $^{15}\text{N}$  em Estudos com Fertilizantes Orgânicos**. 2015. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

As variações na abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de fertilizantes orgânicos (ex. +5 a +20 ‰) os diferenciam dos fertilizantes nitrogenados sintéticos (-5 a +5 ‰), permitindo diversas aplicações na agronomia e na ciência do solo. O objetivo foi empregar a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  no estudo da perda de nitrogênio (N) na compostagem e no uso do N de fertilizantes orgânicos. As hipóteses foram se o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  é indicador para: (i) as perdas de N na compostagem, (ii) a eficiência de uso de N de fertilizantes orgânicos, e, (iii) a diferenciação entre hortaliças 'orgânicas' e convencionais. O aumento do  $\delta^{15}\text{N}$  (2,31 ‰) foi utilizado para estimar as perdas de N (10,5 a 17,2 %) na compostagem de esterco e folhas de alface em biorreatores (3 L) e apresentou estimativa e coeficiente de variação (~30%) similares ao cálculo por balanço de massas. A equação proposta para uso geral é:  $N_{\text{perdido}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{inicial}}) \div 0,96$ . Fertilizantes orgânicos e organominerais com matéria-prima vegetal (turfa e cana de açúcar) apresentaram valores mais baixos de  $\delta^{15}\text{N}$  (< +8,0 ‰) que os estercos e lodos de esgoto (+8,1 a 14,9 ‰). Porém, a adição de fertilizante nitrogenado sintético pode reduzir o  $\delta^{15}\text{N}$  do produto final. Houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre o  $\delta^{15}\text{N}$  de alfaces orgânicas (+ 14,3 ± 1,0 ‰), convencionais (+ 8,5 ± 2,7 ‰) e hidropônicas (+4,5 ± 0,2 ‰). No entanto, não houve diferença entre o sistema convencional e o orgânico que não aplica esterco ( $\delta^{15}\text{N} = 9,2 \pm 1,1$  ‰). A comparação entre o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo dos insumos orgânicos e da alface permitiu inferir qual foi a principal fonte de N em cada sistema de produção. O  $\delta^{15}\text{N}$  e a produtividade da cenoura em resposta às doses crescentes de composto (0 a 2,5 kg m<sup>-2</sup>, 14 g N kg<sup>-1</sup>, base seca) apresentaram correlação positiva e significativa (raíz, R = 0,88, P = 0,02; parte aérea, R = 0,76; P = 0,08). A recuperação de N (%NRec) variou de 4 a 9 %, onde  $\%N\text{Rec} = [(\delta_{\text{planta}+} - \delta_{\text{planta}-}) \div (\delta_{\text{composto}} - \delta_{\text{solo}})] \times [N_{\text{colhido}} \div N_{\text{aplicado}}$  e,  $\delta_{\text{planta}+} - \delta_{\text{planta}-}$  é a variação do  $\delta$  da planta com e sem composto. Portanto, o  $\delta^{15}\text{N}$  permitiu abordagens qualitativas (marcador de sistemas de produção / diferentes fertilizantes), semi-quantitativas (indicador da principal fonte de N) e quantitativas (estimador de perda e recuperação de N) em estudos com fertilizantes orgânicos.

**Palavras-chave:** Isótopos estáveis.  $\delta^{15}\text{N}$ . Composto orgânico.

## ABSTRACT

INÁCIO, Caio de Teves. **Use of  $^{15}\text{N}$  Natural Abundance in Studies with Organic Fertilizers.** 2015. 118p. Thesis (Doctor of Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Variations in the  $^{15}\text{N}$  natural abundance ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in organic fertilizers (e.g. +5 to +20 ‰) differ from those of synthetic N-fertilizers (-5 or +5 ‰) allowing for several applications in agronomy and soil science. The objective was to apply the natural abundance of  $^{15}\text{N}$  to study nitrogen (N) loss in composting and the use of N from organic fertilizers. The hypotheses were if the  $\delta^{15}\text{N}$  value is an indicator for: (i) N loss during composting, (ii) N use efficiency from organic fertilizers, and (iii) differentiation between 'organic' and conventional vegetables. The increase of  $\delta^{15}\text{N}$  (2.31 ‰) was used to estimate the N loss (10.5 to 17.2 ‰) from composting of manure and lettuce leaves in bioreactors (3 L), and showed similar estimates and coefficient of variation (~30 %) to mass balance calculation. The equation proposed for general use is:  $N_{\text{lost}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{initial}}) \div 0.96$ . Organic and organo-mineral fertilizers with vegetal feedstock (peat and sugarcane) showed lower values of  $\delta^{15}\text{N}$  (< +8.0 ‰) than manure and biosolids (+8.1 to 14.9 ‰). However, addition of synthetic N-fertilizers may decrease the  $\delta^{15}\text{N}$  of the end product. There were significant differences between ( $p > 0.05$ ) the  $\delta^{15}\text{N}$  organic (+14.3  $\pm$  1.0 ‰), conventional (+8.5  $\pm$  2.7 ‰), and hydroponic (+4.5  $\pm$  0.2 ‰) lettuces. However, there was no difference between the conventional system and the organic that do not apply manure (+9.2  $\pm$  1.1 ‰). The comparison between  $\delta^{15}\text{N}$  of soil organic inputs and lettuce allowed us to infer which was the main N source in each type of farming.  $\delta^{15}\text{N}$  and yield of carrot in response to increasing levels of compost (0 to 2.5 kg m<sup>-2</sup>, 14 g N kg<sup>-1</sup>, dry weight) showed positive and significant correlation (root, R = 0.88, P = 0.02; shoot, R = 0.76, P = 0.08). The N recovery (%NRec) varied from 4 to 9 %, where  $\%N\text{Rec} = [(\delta_{\text{planta}+} - \delta_{\text{planta}-}) \div (\delta_{\text{compost}} - \delta_{\text{soil}})] \times [N_{\text{harvested}} \div N_{\text{applied}}]$  and  $\delta_{\text{planta}+} - \delta_{\text{planta}-}$  is the variation of  $\delta$ -plant with and without compost. Therefore,  $\delta^{15}\text{N}$  values allowed qualitative (marker for systems of production / fertilization regime), semi-quantitative (indicator for the main N source) and quantitative (estimator for N loss and N recovery) approaches in studies with organic fertilizers.

**Keywords:** Stable isotopes.  $\delta^{15}\text{N}$ . Compost.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I - APLICAÇÕES DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA AGRICULTURA .....	3
1 RESUMO .....	4
2 ABSTRACT .....	5
3 ISÓTOPOS ESTÁVEIS .....	6
3.1. Conceitos Básicos e Nomenclatura .....	6
3.1.1 Isótopos estáveis .....	6
3.1.2 Valores absolutos ( $x$ ) e relativos ( $\delta$ ) .....	7
3.1.3 Fracionamento isotópico.....	9
4 APLICAÇÕES NA AGRICULTURA .....	10
4.1 $^{13}\text{C}$ .....	10
4.1.1 A assinatura isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) das plantas .....	10
4.1.2 Decomposição de resíduos agrícolas.....	12
4.1.3 Carbono orgânico do solo.....	14
4.1.4 Diferenciação de produtos de origem animal .....	15
4.2 $^{34}\text{S}$ .....	16
4.2.1 Origem geográfica .....	16
4.2.2 Modos de produção .....	17
4.3 $^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}$ .....	18
5 ISÓTOPO ESTÁVEL DE NITROGÊNIO ( $^{15}\text{N}$ ) .....	19
5.1 Aplicação Agronômica da Abundância Absoluta ( $x$ ) .....	19
5.1.1 Fertilizantes marcados com $^{15}\text{N}$ .....	19
5.1.2 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio (FBN) por diluição isotópica .....	21

5.2 Aplicação Agronômica da Abundância Relativa ( $\delta$ ).....	21
5.2.1 Fracionamento de $^{15}\text{N}$ influenciando os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de fertilizantes orgânicos .....	21
5.2.2 Diferenciação de produtos de origem vegetal e animal.....	23
5.2.3 Estimativa da FBN por abundância natural.....	24
6 CONCLUSÕES .....	26
CAPÍTULO II - USE OF $^{15}\text{N}$ NATURAL ABUNDANCE TO ESTIMATE TOTAL N LOSS DURING BENCH-SCALE COMPOSTING .....	27
1 RESUMO .....	28
2 ABSTRACT .....	29
3 INTRODUCTION.....	30
4 MATERIAL AND METHODS.....	31
4.1 Experiment .....	31
4.2 Analytical Methods .....	33
5 RESULTS AND DISCUSSION.....	33
5.1 N Loss ( $\text{NH}_3$ and $\text{N}_2\text{O}$ ) During Composting .....	33
5.2 $^{15}\text{N}$ Fractionation During Composting .....	38
6 CONCLUSIONS .....	44
CAPÍTULO III - ISOTOPE ABUNDANCE ( $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ) OF ORGANIC AND ORGANO-MINERAL FERTILIZERS .....	45
1 RESUMO .....	46
2 ABSTRACT .....	47
3 INTRODUCTION.....	48
4 MATERIAL AND METHODS.....	48
5 RESULTS AND DISCUSSION.....	49
6 CONCLUSIONS .....	53
CAPÍTULO IV - IDENTIFYING NITROGEN FERTILIZER REGIME AND LETTUCE PRODUCTION SYSTEM.....	54

1 RESUMO .....	55
2 ABSTRACT .....	56
3 INTRODUCTION .....	57
4. MATERIAL AND METHODS.....	57
4.1 Farming Systems .....	57
4.2 Sampling.....	59
4.3 Isotope Ratio Analysis.....	59
4.4 Statistical Analysis .....	60
5 RESULTS AND DISCUSSION.....	60
5.1 Isotope Signatures of Organic Inputs and Soil.....	60
5.2 Differentiation of Production Systems .....	63
5.3 N in the Farming Systems .....	65
6 CONCLUSIONS .....	69
CAPÍTULO V – ESTIMATIVA DE RECUPERAÇÃO DE N EM HORTALIÇAS FERTILIZADAS COM COMPOSTO ORGÂNICO EMPREGANDO A ABUNDÂNCIA NATURAL DE <sup>15</sup> N .....	
1 RESUMO .....	71
2 ABSTRACT .....	72
3 INTRODUÇÃO.....	73
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.1 Experimento .....	74
4.2 Métodos Analíticos.....	76
4.3 Análise Estatística .....	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
5.1 Resposta às Doses de Composto Orgânico.....	77
5.2 Balanço de Nitrogênio .....	78
5.3 Variação nos Valores de $\delta^{15}\text{N}$ .....	79

5.4 Relação entre $\delta^{15}\text{N}$ e o Fornecimento de N pelo Composto.....	80
5.5 Estimativa da Contribuição das Fontes de N.....	86
6 CONCLUSÕES .....	88
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	89
RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA .....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

As fontes orgânicas de nutrientes para agricultura, ou simplesmente fertilizantes orgânicos são insumos de relevância para a horticultura, atividade de cultivo intensivo que tem forte demanda por nutrientes, como também, matéria orgânica para o solo. Esses fertilizantes orgânicos podem ser os esterco, composto orgânico, adubos-verdes, restos vegetais ou produtos a base desses materiais. A relevância dos fertilizantes orgânicos aumenta para o sistema 'orgânico' de produção que exclui fertilizantes sintéticos de nitrogênio. E na agricultura convencional, os estudos envolvendo as interações entre as fontes de nitrogênio (N) e fósforo (P) no uso conjunto de fertilizantes sintéticos ou minerais e orgânicos tem ganhado destaque na comunidade científica.

A geração de esterco tem aumentado concomitantemente com demanda por alimentos e a expansão da produção (ex. avicultura) (Benites et al., 2010). Bem como, o aumento da produção de alimentos ocasiona a geração de mais resíduos orgânicos (ex. sobras de hortaliças). Assim, é preciso aprender a lidar com essas potenciais fontes de nutrientes, desde a sua geração, passando pela transformação ou tratamento, até o uso como fertilizante ou condicionador do solo. Inúmeros são os benefícios do uso de esterco como fonte de nutrientes, mas igualmente relevantes são os problemas conhecidos, como desbalanço de nutrientes e contaminação de solo e água, quando do uso *in natura*.

E por que abundância natural de  $^{15}\text{N}$ ? As variações na abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de fertilizantes orgânicos (ex. +5 a +20 ‰) os diferenciam dos fertilizantes nitrogenados sintéticos (ex. -5 a +5 ‰) permitindo diversas aplicações na agronomia e na ciência do solo (Chalk et al., 2013). Já as plantas leguminosas (*Fabaceae*), muito utilizadas como adubos-verdes por serem fixadoras de N atmosférico em associação com bactérias, são levemente empobrecidas ou enriquecidas em  $^{15}\text{N}$ . Estas diferentes fontes de N quando aplicadas no cultivo agrícola influenciam os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo e, principalmente, das plantas, a ponto de ser possível identificar a origem do N absorvido e, mesmo, o fertilizante que foi aplicado.

A referência para a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  é a fração atômica do isótopo no ar atmosférico, que é igual a 0,3663 ‰ ( $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}+^{14}\text{N}$ ). Por definição, o ar atmosférico possui valor de  $\delta^{15}\text{N} = 0$  ‰ (por mil). Variações da fração atômica de  $^{15}\text{N}$  na amostra em relação ao padrão ar são expressas em valores positivos ou negativos de  $\delta^{15}\text{N}$ , que indicam uma amostra enriquecida ou empobrecida em  $^{15}\text{N}$ . Respectivamente, a variação na abundância natural dos isótopos estáveis ocorre nos sistemas físicos devido ao fracionamento isotópico. Processos físicos, químicos ou biológicos podem fracionar o átomo  $^{15}\text{N}$  gerando produtos que são empobrecidos em  $^{15}\text{N}$  e substratos que ficarão enriquecidos em  $^{15}\text{N}$ . O átomo mais 'pesado' ( $^{15}\text{N}$ ) reage mais lentamente e realiza ligações mais fortes que o átomo mais 'leve' ( $^{14}\text{N}$ ). No ciclo de N são vários os processos que podem gerar o fracionamento isotópico. Os mais relevantes são a volatilização de amônia, a nitrificação e a desnitrificação. No caso da volatilização de amônia da solução do solo, esta amônia sai empobrecida em  $^{15}\text{N}$  e o amônio remanescente na solução ficará, portanto, enriquecido em  $^{15}\text{N}$ .

A volatilização de amônia e a desnitrificação são os principais fatores para o "enriquecimento natural" do esterco estocado e do composto orgânico (compostagem). Este "enriquecimento natural" dos fertilizantes orgânicos pode ser útil no desenvolvimento de um

método alternativo ao enriquecimento artificial em  $^{15}\text{N}$  de materiais orgânicos com fertilizantes sintéticos marcados, como a ureia ou o sulfato de amônio enriquecidos artificialmente com  $^{15}\text{N}$  (em %). A produção de material orgânico marcado é trabalhosa e relativamente custosa, a ponto de limitar os estudos de eficiência de uso de N de esterco e compostos orgânicos. Aprofundar a aplicação da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em estudos agronômicos é um desafio devido aos efeitos do fracionamento isotópico no ciclo do N. Ao mesmo tempo, estudos recentes têm demonstrado diversas possibilidades de aplicação e versatilidade do uso do  $\delta^{15}\text{N}$  como método para estudar o N em processos como a compostagem (ex. Hristov et al., 2009) e no uso de N de fontes orgânicas (esterco, composto, adubos-verdes, restos vegetais) (ex. Yun; Ro, 2009), ou mesmo para estimar a disponibilidade de N em sistemas naturais (Craine et al., 2009; 2015).

Outros isótopos estáveis ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ) têm tido diversas aplicações nas ciências biológicas em geral, incluindo a agricultura e alimentos. O estudo das variações na abundância natural desses isótopos estáveis nos fertilizantes orgânicos e nos solos e plantas cultivadas com estas fontes de N ainda é um campo pouco explorado.

As hipóteses testadas foram se o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  é indicador para:

- (i) As perdas de N durante a compostagem,
- (ii) A eficiência de uso de N de fertilizantes orgânicos, e,
- (iii) A diferenciação entre hortaliças 'orgânicas' e convencionais em condições de cultivo no Brasil.

O objetivo geral da tese foi estudar o potencial e as limitações do uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) como indicador para a quantificação das perdas de N na compostagem, a diferenciação de alfaces “orgânicas” e convencionais, e a recuperação de N do composto orgânico por espécies hortícolas. Os objetivos específicos foram:

- (i) Estudar a relação quantitativa das perdas de N e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  durante a compostagem de esterco e restos vegetais.
- (ii) Caracterizar as assinaturas isotópicas ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de fertilizantes orgânicos e organo-minerais.
- (iii) Estudar o potencial de aplicação do conceito de assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  para diferenciar hortaliças (alface) orgânicas e convencionais em condições brasileiras.
- (iv) Estudar o uso do  $\delta^{15}\text{N}$  do composto orgânico como um estimador da recuperação do N pela planta.

A Tese está organizada em cinco capítulos. O **Capítulo 1** é uma revisão da literatura científica sobre as aplicações da análise de isótopos estáveis ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ) na agricultura e nos alimentos, com ênfase no  $^{15}\text{N}$ . O **Capítulo 2** apresenta o estudo sobre o fracionamento de  $^{15}\text{N}$  durante a compostagem de resíduos orgânicos e sua relação com as perdas de nitrogênio. O **Capítulo 3** é um levantamento da assinatura isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) de fertilizantes orgânicos e esterco. O **Capítulo 4** é um estudo sobre como o regime de adubação e tipo de fertilizante influencia a assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  de alface cultivada em sistemas orgânicos e convencionais. O **Capítulo 5** é o estudo sobre como as doses de composto orgânico influenciam na assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  de três diferentes espécies de hortaliças (alface, cenoura e brócolis) e a recuperação de N do composto. Por fim, apresentam-se as Considerações Finais e as Recomendações de Pesquisa.

# CAPÍTULO I

## APLICAÇÕES DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA AGRICULTURA

Partes publicadas em:

CHALK, P.M.; INÁCIO, C.T.; CRASWELL, E.T.; CHEN, D. On the usage of absolute ( $x$ ) and relative ( $\delta$ ) values of  $^{15}\text{N}$  abundance. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 85, p. 51-53, 2015.

CHALK, P.M., MAGALHÃES, A.M.T., INÁCIO, C.T. Towards an understanding of the dynamics of compost N in the soil-plant-atmosphere system using  $^{15}\text{N}$  tracer. **Plant Soil**, v. 362, p. 373-388, 2013.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., URQUIAGA, S., CHEN, D.  $^{13}\text{C}$  isotopic fractionation during biodegradation of agricultural wastes. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 51, p. 201-213, 2015.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., BALIEIRO, F.C., ROWS, J.R.C. Do techniques based on  $^{15}\text{N}$  enrichment and  $^{15}\text{N}$  natural abundance give consistent estimates of the symbiotic dependence of  $\text{N}_2$ -fixing plants? **Plant Soil**, v. 399, p. 415-426, 2016.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., A.M.T. From fertilizer to food: tracing nitrogen dynamics in conventional and organic farming systems using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. In: HENG, L.K., SAKADEVAN, K., DERCON, G., NGUYEN, M.L. (Eds.). **Proceedings – International Symposium on Managing Soils for Food Security and Climate Change Adaptation and Mitigation**. Rome, Food and Agriculture Organization of United Nations, 2014. P. 339-349

INÁCIO, C.T., CHALK, P.M., MAGALHÃES, A.M.T., Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 1. Plant products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1206-1218, 2015.

## 1 RESUMO

Isótopos estáveis de hidrogênio (H), carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. Existe uma variação na composição isotópica no ambiente que é devida aos processos físicos, químicos e biológicos de fracionamento isotópico. Cada elemento possui um isótopo 'leve' dominante com o peso atômico nominal ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ ), e um ou mais isótopos 'pesados' ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ). O fracionamento isotópico resulta em produtos os quais são isotopicamente mais 'leves' (contém menos do isótopo 'pesado') que o material precursor. Estas variações na abundância natural ( $\delta$ ), tal como ocorre devido ao fracionamento isotópico pelas reações de fotossíntese e fixação biológica de N, permitem uma gama de aplicações nas mais diversas ciências naturais, entre elas a agronomia e ciência do solo. A abordagem alternativa ao uso das variações na abundância natural são os materiais artificialmente enriquecidos, os chamados traçadores que são adicionados ao sistema em estudo. As principais aplicações dos isótopos estáveis para agricultura, seja em nível de abundância natural ou enriquecido, envolvem estudos com (i) fotossíntese ( $^{13}\text{C}$ ), (ii) decomposição de resíduos orgânicos ( $^{13}\text{C}$ ), (iii) carbono orgânico do solo ( $^{13}\text{C}$ ), (iv) eficiência de fertilizantes orgânicos e fertilizantes sintéticos ( $^{15}\text{N}$  e  $^{34}\text{S}$ ), (v) fixação biológica do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ), (vi) diferenciação de modos de produção e/ou regime de fertilização ( $^{15}\text{N}$ ) (p.ex. orgânico vs. convencional), e (vii) designação da origem geográfica ( $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$  e  $^{34}\text{S}$ ). O estudo do N na agricultura sempre foi de extrema relevância pela sua importância na nutrição de plantas e sua alta mobilidade nos ecossistemas. Neste sentido, os estudos com  $^{15}\text{N}$ , especialmente em abundância natural, têm se mostrado como ferramenta de pesquisa que traz informações importantes sobre a dinâmica do N nos agroecossistemas e ecossistemas naturais. Portanto, identifica-se a tendência de que as análises de isótopos estáveis se tornem cada vez mais corriqueiras nos trabalhos científicos e como serviço disponível à sociedade.

**Palavras-chave:** Abundância natural. Fracionamento isotópico. Agricultura.



## 2 ABSTRACT

Stable isotopes of hydrogen (H), carbon (C), nitrogen (N), oxygen (O), and sulfur (S) occur naturally in the atmosphere, hydrosphere, lithosphere and biosphere. There is a natural variation of isotopic abundance in the environment due to physical, chemical and biological processes of isotopic fractionation. Each element has a dominant 'light' isotope with a nominal atomic weight ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ ), and one or more 'heavy' isotopes ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ). Isotopic fractionation gives products which are isotopically lighter (contain less of the 'heavy' isotope) than the source material. These variations on natural abundance ( $\delta$ ), as occurs due to the fractionation by photosynthetic reactions and biological  $\text{N}_2$  fixation, allow an array of applications in diverse natural sciences, including agronomy and soil science. The alternative approach to the use of variations of natural abundance is the use of artificially enriched materials, so called 'tracers' which are added to the system under study. The main applications of stable isotopes in agriculture, both at natural abundance or enrichment levels, are related to studies with (i) photosynthesis ( $^{13}\text{C}$ ), (ii) organic residues decomposition ( $^{13}\text{C}$ ), (iii) soil organic carbon ( $^{13}\text{C}$ ), (iv) organic and synthetic fertilizer efficiency ( $^{15}\text{N}$  and  $^{34}\text{S}$ ), (v) biological nitrogen fixation ( $^{15}\text{N}$ ), (vi) differentiation of mode of production and/or fertilizer regime (e.g. organic vs. conventional) ( $^{15}\text{N}$ ), and (vii) designation of geographical origin ( $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$  and  $^{34}\text{S}$ ). The study of N in agriculture always had major relevance due to its importance for plant nutrition and its high mobility in the ecosystems. In this sense, studies with  $^{15}\text{N}$ , especially at natural abundance level, have shown as research tool which brings lot information about N dynamics in agroecosystems and natural ecosystems. Therefore, there is a trend that the stable isotope analyses become more and more usual in scientific research and as a service available for the society.

**Key-words:** Natural abundance. Isotopic fractionation. Agriculture

## 3 ISÓTOPOS ESTÁVEIS

### 3.1. Conceitos Básicos e Nomenclatura

#### 3.1.1 Isótopos estáveis

Isótopos estáveis de hidrogênio (H), carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. Isótopos são átomos de um elemento com o mesmo número de prótons (mesmo número atômico), mas diferente número de nêutrons (massa atômica diferente) no núcleo. Isótopos estáveis não estão sujeitos ao decaimento radioativo, em oposição aos isótopos radioativos (emissão  $\beta$ ). Portanto, existe uma variação na composição isotópica no ambiente que é devido aos processos físicos e químicos de fracionamento isotópico e não devido ao decaimento radioativo. Cada elemento possui um isótopo ‘leve’ dominante com o peso atômico nominal ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ ), e um ou mais isótopos ‘pesados’ ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ) (Tabela 1.1). Além desses cinco elementos com grande aplicação na Ecologia e na Agronomia, a IUPAC (Coplen et al., 2002) lista um total de 20 elementos com variações na abundância natural de seus isótopos estáveis (Li, B, Mg, Si, Cl, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Se, Mo, Pd, Te, e Ti).

**Tabela 1.1** Abundância natural de isótopos estáveis importantes para as ciências biológicas.

Elemento	Número atômico	Isótopo estável	Abundância (fração molar)
Hidrogênio	1	$^1\text{H}$	0,999 844 26
		$^2\text{H}$	0,000 155 74
Carbono	6	$^{12}\text{C}$	0,988 922
		$^{13}\text{C}$	0,011 078
Nitrogênio	7	$^{14}\text{N}$	0,996 337
		$^{15}\text{N}$	0,003 663
Oxigênio	8	$^{16}\text{O}$	0,997 620 6
		$^{17}\text{O}$	0,000 379 0
		$^{18}\text{O}$	0,002 000 4
Enxofre	16	$^{32}\text{S}$	0,950 407 4
		$^{33}\text{S}$	0,007 486 9
		$^{34}\text{S}$	0,041 959 9
		$^{36}\text{S}$	0,000 145 79

Fonte: Coplen et al., 2002.

Embora os isótopos de um mesmo elemento participem das mesmas reações químicas, isso ocorre em taxas diferentes gerando uma variação na abundância natural desses elementos. Reações químicas e processos físicos, tais como evaporação e condensação, discriminam contra isótopos ‘pesados’. O fracionamento resulta em produtos os quais são isotopicamente mais ‘leves’ (contém menos do isótopo ‘pesado’) que o material precursor. Estas variações na abundância natural, tal como ocorre devido ao fracionamento pelas reações de fotossíntese ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ), fixação biológica de N ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ), evaporação ( $^1\text{H}/^2\text{H}$ ;  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ) e oxidação biológica

( $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ ), permitem uma gama de aplicações nas mais diversas ciências naturais (Coplen et al., 2002), dentre elas a agronomia e a ciência do solo. A abordagem alternativa ao uso das variações na abundância natural é o uso de materiais artificialmente enriquecidos isotopicamente (p. ex.  $> 1\%$  de  $^{15}\text{N}$ ), os chamados traçadores que são adicionados ao sistema em estudo.

### 3.1.2 Valores absolutos ( $x$ ) e relativos ( $\delta$ )

A rigor não há um valor absoluto de abundância isotópica *per se* porque cada medida contém uma incerteza expressa como desvio padrão ou outro parâmetro estatístico similar (Coplen, 2011). Tomando os isótopos de N como exemplo, podemos expressar os valores absolutos ( $x$ ) conforme a Equação 1.1:

$$\text{Fração atômica de } ^{15}\text{N}, \quad x(^{15}\text{N}) = \frac{\text{quantidade de } ^{15}\text{N}}{\text{quantidade de } ^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \quad (1.1)$$

Ou como excesso da fração atômica de  $^{15}\text{N}$  (Eq. 1.2);

$$x^E(^{15}\text{N})_{\text{amostra/referência}} = x(^{15}\text{N})_{\text{amostra}} - x(^{15}\text{N})_{\text{referência}} \quad (1.2)$$

Onde a fração atômica de  $^{15}\text{N}$  da referência internacional do  $\text{N}_2$  do ar,  $x(^{15}\text{N})_{\text{ar}}$ , foi determinada precisamente como  $0,003\,663 \pm 0,000\,004$  (Junk; Svec, 1958). O excesso da fração atômica,  $x^E(^{15}\text{N})$ , é muito empregado para amostras enriquecidas, por ex. fertilizantes como ureia e sulfato de amônia. As primeiras aplicações de  $^{15}\text{N}$  como um traçador envolveram as tentativas para estimar a eficiência dos fertilizantes nitrogenados, aplicando ao solo materiais enriquecidos ou empobrecidos em  $^{15}\text{N}$  (Hauck; Bremner, 1976). Quando as amostras tem a composição isotópica próxima à abundância natural, o uso do valor relativo ( $\delta$ ) é preferido ao invés do valor absoluto ( $x$ ) (Coplen, 2011). O valor  $\delta$  é a razão isotópica de uma amostra relativa à razão isotópica do padrão internacional (Equação 1.3). Como o N tem apenas dois isótopos ( $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$ ), então:

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{amostra}}}{R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{padrão}}} - 1 \quad (1.3)$$

Onde o padrão internacional por definição tem  $\delta = 0$ . Comumente valores de  $\delta$  são expressos *per mil* ou ‰, apesar de não ser uma prática do Sistema Internacional (S.I.) de Unidades.

Chalk et al., (2015d) chamam a atenção para um erro comum na literatura quando se substitui o  $R$  por  $x(^{15}\text{N})$  na Equação 1.3. Apesar de essa substituição resultar em valores similares de  $\delta$  para  $^{15}\text{N}$ , para outros isótopos com maior fração atômica, como os isótopos  $^{13}\text{C}$  e  $^{34}\text{S}$ , os resultados são mais discrepantes.

O valor  $R$  é calculado como:

$$\text{Razão Isotópica}, R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = \frac{x(^{15}\text{N})}{1-x(^{15}\text{N})} \quad (1.4)$$

Portanto, para o padrão internacional (ar), onde a fração atômica de  $^{15}\text{N} = 0,003\ 663$   
 $R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = 0,003\ 663 \div (1 - 0,003\ 663)$   
 $= 0,003\ 663 \div 0,996\ 337 = 0,003\ 676\ 47$

Um cuidado deve ser tomado, porque muitas vezes na literatura o valor  $R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = 0,003\ 663$  é usado no lugar no valor correto  $0,003\ 676\ 47$  (Chalk et al., 2015c).

Então, para uma amostra na qual a fração atômica de  $^{15}\text{N}$ ,  $x(^{15}\text{N})$ , é igual a  $0,003\ 686$ , temos:

$$R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = 0,003\ 686 \div (1 - 0,003\ 686)$$

$$= 0,003\ 686 \div 0,996314 = 0,003\ 699\ 64$$

Substituindo os valores acima na Equação 1.3, temos:

$$\delta^{15}\text{N} = (0,003\ 699\ 64 \div 0,003\ 676\ 47) - 1 = +6,3 \times 10^{-3} = +6,3 \text{ ‰}$$

Exemplos adicionais são apresentados na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2** Valores relativos ( $\delta$ ) da abundância de  $^{15}\text{N}$  considerando a faixa de valores de  $\delta^{15}\text{N}$  normalmente encontrada para solos, plantas e fertilizantes.

Amostra	$x(^{15}\text{N})$ %	$x(^{15}\text{N})$	$x^E(^{15}\text{N})$ %	$R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})^a$	$\delta^{15}\text{N} / \text{‰}^b$ Eq.1.3
1	0,3637	0,003637	-0,0026	0,00365028	-7,12
2	0,3643	0,003643	-0,002	0,00365632	-5,48
3	0,3653	0,003653	-0,001	0,00366639	-2,74
Ar	0,3663	0,003663	0	0,00367647	0
4	0,3667	0,003667	+0,0004	0,00368050	+1,096
5	0,3673	0,003673	+0,001	0,00368654	+2,74
6	0,3683	0,003683	+0,002	0,00369661	+5,48
7	0,3693	0,003693	+0,003	0,00370669	+8,22
8	0,3703	0,003703	+0,004	0,00371676	+10,96
9	0,3713	0,003713	+0,005	0,00372684	+13,70
10	0,3718	0,003718	+0,0055	0,00373188	+15,07

<sup>a</sup> $x(^{15}\text{N}) / (100 - x(^{15}\text{N}))$

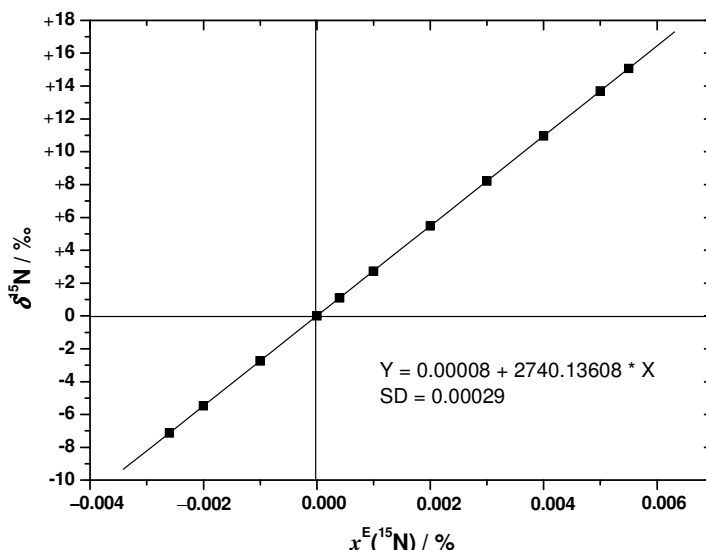
<sup>b</sup> O segundo e o terceiro decimais não denotam o nível de precisão da medição, apenas são mostrados para efeito de comparação.

Fonte: Modificado de Chalk et al., 2015c.

Portanto, um valor de  $\delta$  ( $^i\text{E}$ ) (p. ex.  $\delta^{15}\text{N}$ ) positivo indica que a amostra é mais enriquecida no isótopo ‘pesado’ ( $^{15}\text{N}$  contra  $^{14}\text{N}$ ) que a referência, e valores negativos de  $\delta$  ( $^i\text{E}$ ) indicam que a amostra é empobrecida no isótopo ‘pesado’ em relação à referência (Coplen et al., 2002).

A relação entre  $\delta^{15}\text{N}$  e o excesso da fração atômica de  $^{15}\text{N}$ ,  $x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{amostra/ar}}$ , na faixa de 7 a 15 ‰ (Figura 1.1), pode ser expressada simplificadamente como:

$$\delta^{15}\text{N} = 2740 \times x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{amostra/ar}}, \text{ em } \text{‰} \quad (1.5)$$



**Figura 1.1** Relação entre  $\delta^{15}\text{N}$  / ‰ e o excesso da fração atômica,  $x^{\text{E}}(^{15}\text{N})/\text{‰}$ , na faixa de valores de  $\delta$  apresentados por Inácio et al. (2015a) para solos, plantas e fertilizantes (Elaborado pelo autor e publicado por Chalk et al., 2015c).

Onde o incremento de 1  $\delta / \text{‰}$  é equivalente ao incremento de  $0.003649 \times 10^{-3}$  de excesso da fração atômica de  $^{15}\text{N}$ ,  $x(^{15}\text{N})$  (Fig. 1.1).

Este valor é menor do que  $0.003663 \times 10^{-3}$  proposto por Doughton et al. (1992). Esta diferença é atribuída à aproximação comum, porém errônea, de que o valor de 1  $\delta$  está diretamente relacionado à fração atômica,  $x(^{15}\text{N})$ , quando de fato este é relacionado à razão isotópica,  $R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$ , na Eq. 1.3. (Chalk et al., 2015c).

### 3.1.3 Fracionamento isotópico

O fracionamento isotópico pode ocorrer como resultado de um processo físico (p.ex. difusão), químicos (p.ex. troca iônica), ou biológico (enzimático). O fracionamento isotópico pode ser expresso de duas formas:

$$\text{Fator de fracionamento } (\alpha), \alpha = \delta A / \delta B$$

Onde A é o reagente e B é o produto da reação (em equilíbrio).

Ou como discriminação ( $\Delta$  ou  $\epsilon$ ) em unidade por mil (‰).

$$\epsilon / \text{‰} = (\delta s - \delta p) \times [1 + (\delta p \times 1\,000)]$$

Onde  $\delta s$  é o substrato e  $\delta p$  é o produto.

Uma aproximação da equação acima é:

$$\varepsilon \text{ ‰} = \delta_s - \delta_p$$

O fator de fracionamento ( $\alpha$ ) é aproximado por:

$$\alpha = (\varepsilon / 1\,000) + 1$$

ou

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1\,000$$

Então, para o um fator de fracionamento ( $\alpha$ ) de 1,020, o  $\varepsilon$  do produto =  $-20 \text{ ‰}$  relativo ao substrato (Högberg, 1997).

Processos físicos de fracionamento isotópico incluem aqueles nos quais as taxas de difusão são dependentes da massa, tais como ultrafiltração ou difusão gasosa de íons ou moléculas. Processos químicos de fracionamento isotópico envolvem a redistribuição dos isótopos de um elemento em suas fases, moléculas ou espécie química. Estes podem tanto ser: (1) fracionamentos isotópicos em equilíbrio, quando as taxas de reações bidirecionais são iguais para reações de troca iônica, ou (2) fracionamentos isotópicos cinético, que é causado por reações unidirecionais nas quais a reação de formação do produto é dependente da massa do elemento. Nas reações isotópicas em equilíbrio o isótopo ‘pesado’ estará enriquecido na substância com o estado de oxidação mais elevado, e também no estado mais condensado, em geral. Em processos cinéticos, o isótopo “leve” forma ligações mais fracas e que são mais facilmente quebradas. Portanto, o isótopo ‘leve’ é mais reativo e, desta forma, se concentra mais no produto, deixando enriquecido em isótopo “pesado” o reagente (remanescente). A maioria das reações biológicas são exemplos de fracionamento cinético (p. ex. fotossíntese e redução de sulfatos por bactérias) (Coplen et al., 2002).

O equilíbrio isotópico entre duas fases não significa que as duas fases tem frações molares (abundância) idênticas de cada isótopo. Neste caso, somente as frações molares são constantes. Por exemplo, o vapor d’água em um sistema fechado em contato com água líquida, em uma temperatura constante, tem as concentrações dos isótopos ‘pesados’,  $^2\text{H}$  e  $^{18}\text{O}$ , mais elevada na fase líquida do que no vapor (Coplen et al., 2002).

## 4 APLICAÇÕES NA AGRICULTURA

### 4.1 $^{13}\text{C}$

#### 4.1.1 A assinatura isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) das plantas

A composição isotópica ou assinatura isotópica do tecido vegetal ( $\delta^{13}\text{C}$ ) é função, principalmente, do fracionamento isotópico do  $\text{CO}_2$  durante a fotossíntese (Dawson et al., 2002). A difusão do  $\text{CO}_2$  através do estômato foliar (um processo físico) e a redução enzimática de  $\text{CO}_2$  pela enzima RuBisCo durante a carboxilação (um processo bioquímico) contribuem para o fracionamento (discriminação) do isótopo  $^{13}\text{C}$ , já que ambos os processos favorecem o isótopo  $^{12}\text{C}$ , mais leve. Existem três tipos de metabolismo fotossintético vegetal: C3 (Ciclo Calvin); C4 (Rota Hatch-Slack); e CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas). Os primeiros produtos nos metabolismos C3 e C4 são moléculas de três e quatro átomos de

carbonos, respectivamente. Plantas com metabolismo CAM possuem a rota C4 ativa durante a noite (ausência de luz) e ciclo C3 durante o dia (Larcher, 2003). A maioria das plantas de clima temperado são espécies C3 (hortaliças em geral, cereais e frutíferas), enquanto muitas gramíneas tropicais possuem metabolismo C4 (milho, cana-de-açúcar, pastagens). O abacaxi é um exemplo de espécie CAM, da família das Bromélias, como os cactos (*Opuntia* spp.) encontrados em climas áridos. Conforme o metabolismo fotossintético as plantas apresentam específicos valores de  $\delta^{13}\text{C}$ . Plantas C3 apresentam valores de  $\delta$  entre  $-22$  a  $-30\text{‰}$ , plantas C4 entre  $-10$  a  $-14\text{‰}$  e plantas CAM  $-10$  a  $-35\text{‰}$  (Cerling et al., 1997; Coplen et al., 2002; Larcher, 2003). A composição isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do  $\text{CO}_2$  da atmosfera é aproximadamente  $-8\text{‰}$  (Yun; Ro, 2008) mas esse valor de  $\delta$  tem gradualmente se tornado mais negativo com o aumento das concentrações de  $\text{CO}_2$  atmosférico (Peck; Tubman, 2010).

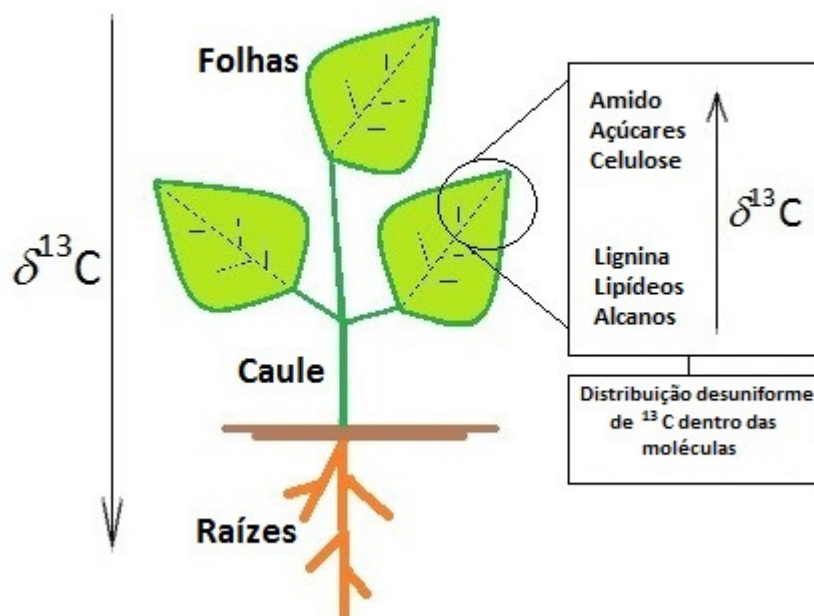
A rota fotossintética é o principal determinante da assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  das plantas. No entanto, condições ambientais podem afetar os valores de  $\delta$ , tais como estresse hídrico (seca), intensidade da radiação solar, alta/baixas temperaturas, baixa pressão atmosférica e estresse por ozônio (Yun; Ro, 2008). Estes estresses ambientais, como o aumento da temperatura global, afetam o balanço de fracionamento entre a condutância estomática (taxa de passagem de  $\text{CO}_2$ ) e a carboxilação (Hultine et al., 2013). O suprimento de N pode afetar diretamente o  $\delta^{13}\text{C}$  das plantas pelo aumento da taxa fotossintética e indiretamente pelos efeitos na eficiência no uso da água (Högberg et al., 1995). O genótipo é também uma importante fonte de variação para valores de  $\delta^{13}\text{C}$  das plantas (Serret et al., 2008) e a composição isotópica do  $\text{CO}_2$  atmosférico local tem forte influência nesses valores de  $\delta$  (por ex.: cultivo em casas de vegetação aquecidas com queima de gás natural; Rogers, 2008; Schmidt et al., 2005).

A distribuição de  $^{13}\text{C}$  dentro das plantas não é uniforme e diferenças fundamentais existem entre espécies C3 e C4 neste aspecto (Hobbie; Werner, 2004). As raízes de plantas C3 são invariavelmente enriquecidas em  $^{13}\text{C}$  de 1 a 4 ‰ em comparação com as folhas (Fig. 1.2), enquanto em plantas C4 essas diferenças são atenuadas. Grãos de trigo (C3) tem valores mais altos de  $\delta^{13}\text{C}$  que as folhas ou a palha (Serret et al., 2008; Senbayram et al., 2008). Essas diferenças são relacionadas à distribuição desuniforme de  $^{13}\text{C}$  entre os constituintes bioquímicos da planta. Por exemplo, a lignina é empobrecida em  $^{13}\text{C}$  em comparação com a celulose ou hemicelulose, ou o tecido vegetal inteiro (Benner et al., 1987).

O enriquecimento de  $\delta^{13}\text{C}$  da celulose em comparação com a lignina varia de 2,5 a 4,6 ‰ em vários órgãos em plantas C3 e de 4,6 a 6,2 ‰ em plantas C4 (Hobbie; Werner, 2004). Sendo assim, tecidos vegetais ricos em lignina (por ex. palha de cereais) terão valores mais baixos de  $\delta^{13}\text{C}$  que os grãos, os quais são pobres em lignina. Constituintes lipídicos também são empobrecidos em  $^{13}\text{C}$  em relação ao tecido vegetal inteiro devido ao fracionamento isotópico durante a oxidação da piruvato acetil CoA (enzima) na síntese lipídica (DeNiro; Epstein, 1977). Uma ordem geral de valores de  $\delta^{13}\text{C}$  parece ser alcanos < lipídios < tecido vegetal inteiro, onde alcanos e lipídios são empobrecidos 6 ‰ em plantas C3 e 8 a 10 ‰ em plantas C4 em comparação com o tecido vegetal inteiro (Collister et al., 1994). Além disso, a distribuição de  $^{13}\text{C}$  na cadeia de carbono de uma dada molécula orgânica pode não ser uniforme. A glicose derivada do amido de milho (C4) e da sacarose de beterraba açucareira (C3) apresenta o carbono 4 (posição na cadeia) relativamente mais enriquecido cerca de 5 a 6 ‰ e o carbono 6 empobrecido cerca de 5 ‰, os resultados foram consistentes para ambas as fontes (Rossmann et al., 1991).

A heterogeneidade na distribuição de  $^{13}\text{C}$  na cadeia de carbono tem sido demonstrada para diversos constituintes bioquímicos nas plantas, por ex. frutose, etanol, entre outros (Gilbert et al. 2011a, Gilbert et al. 2011b; Gilbert et al. 2012). A distribuição desuniforme de

$^{13}\text{C}$  entre constituintes bioquímicos dos tecidos vegetais bem como a distribuição heterogênea de  $^{13}\text{C}$  dentro das moléculas orgânicas (Fig. 1.2) são ambos explicados pelo efeito enzimático sobre o fracionamento, o qual irá ter também um papel no fracionamento isotópico de  $^{13}\text{C}$  durante a biodegradação de resíduos agrícolas (Chalk et al., 2015a)



**Figura 1.2** – Diagrama esquemático mostrando o fracionamento pós-fotosintético de  $^{13}\text{C}$  implicando em diferenças em valores de  $\delta$  em órgão e metabólitos em plantas. Setas sólidas ( $\uparrow$ ,  $\downarrow$ ) indicam o aumento no enriquecimento de  $^{13}\text{C}$  (Elaborado pelo autor e publicado em Chalk et al., 2015a).

#### 4.1.2 Decomposição de resíduos agrícolas

As condições nas quais ocorre a biodegradação de resíduos agrícolas podem variar largamente em termos de temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio. Ou seja, pode variar do armazenamento anaeróbico de esterco animal até a compostagem aeróbia e termofílica de resíduos vegetais e animais. A abundância relativa de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) tem se tornado uma ferramenta indispensável para estudos de decomposição de substratos orgânicos em ecossistemas naturais e agrícolas (Chalk et al., 2015a). Em particular, o isótopo estável  $^{13}\text{C}$  tem sido empregado para traçar e quantificar fluxos de C com o intuito de reconstruir a dinâmica da vegetação passada e mudanças no uso da terra, para determinar a respiração microbiana e para estudar a origem e a ciclagem da matéria orgânica do solo (Fernandez et al. 2003). No entanto, o potencial fracionamento de  $^{13}\text{C}$  durante o processo de biodecomposição constitui um complicador fundamental na interpretação desses dados (Chalk et al., 2015a).

Fungos saprófitas e ectomicorrízicos apresentam a assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  da biomassa enriquecida em comparação com o substrato. A média para o fator de fracionamento fungo/substrato foi determinada em:  $\epsilon_{\text{fungos ectomicorrízicos/madeira}} = + 1.4 \pm 0.8 \text{ ‰}$ ; e ,  $\epsilon_{\text{fungos decompositores/madeira}} = + 3.5 \pm 0.9 \text{ ‰}$ , em um estudo com 115 espécies e 88 gêneros de ectomicorrizas, fungos decompositores de madeira e liteira, no Japão e na Malásia (Kohzu et al., 1999). Mais recentemente, Boström et al. (2008) encontrou que tanto o  $\text{CO}_2$  respirado como os esporocarpos de 16 espécies de ectomicorrizas e fungos saprófitas, coletados em



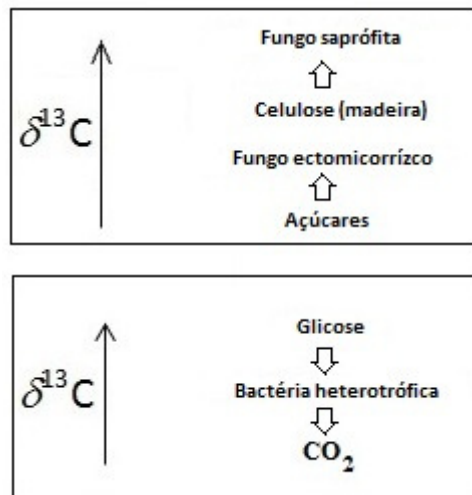
florestas da Noruega, foram sempre enriquecidos em  $^{13}\text{C}$  em comparação com o substrato (madeira, liteira ou raízes), sendo os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CO}_2$  e os esporocarpos positivamente correlacionados.

Diversos autores têm apontado que fungos ectomicorrízicos são naturalmente empobrecidos (2,5 ‰ a 4,0 ‰) em  $^{13}\text{C}$  em comparação com os fungos saprófitas, e ambos são, em geral, mais enriquecidos em  $^{13}\text{C}$  do que as folhas / substrato da espécie hospedeira (Högberg et al., 1999; Taylor et al., 2003) (Fig. 1.3). Estas diferenças podem refletir mais a incorporação do C da celulose enriquecida em  $^{13}\text{C}$  na biomassa do fungo saprófita do que a incorporação da lignina e lipídios que são naturalmente empobrecidos em  $^{13}\text{C}$  (Gleixner et al., 1993; Hobbie et al. 2012). Por outro lado, os açúcares transportados nas árvores e assimilados pelos fungos ectomicorrízicos são provavelmente empobrecidos em  $^{13}\text{C}$  em comparação com aqueles usados na síntese da celulose do tecido lenhoso (Hobbie; Werner, 2004; Hobbie et al. 2012).

A distribuição desuniforme de  $^{13}\text{C}$  dentro da cadeia da molécula orgânica (ex. glicose) e as diferenças de metabolismos entre táxons de fungos saprófitas podem contribuir com < 1 ‰ e >4 ‰ de fracionamento isotópico, respectivamente (Hobbie et al., 2004). Porém, Chalk et al. (2015a) ressaltam que apesar das diferenças nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre fungos saprófitas e ectomicorrízicos em relação ao substrato estarem bem documentadas, são necessários mais dados experimentais sobre a distribuição intramolecular de  $^{13}\text{C}$  usando substratos modelos para que as variações de  $^{13}\text{C}$  durante a decomposição sejam claramente atribuídas ao fracionamento devido ao metabolismo microbiano ou não.

A degradação microbiana de substratos simples com uma única fonte de C tem sido estudada empregando-se culturas de bactérias e fungos heterotróficos. No entanto, relativamente poucos estudos tem explorado o fracionamento de  $^{13}\text{C}$  durante a decomposição desses substratos com uma única fonte de C, e a maioria dos estudos tem empregado glicose e *E. coli*. Duas tendências aparecem nesses estudos: a biomassa da bactéria empobrecida em  $^{13}\text{C}$  em relação à glicose, bem como, o  $\text{CO}_2$  respirado durante a decomposição (Fig. 1.3), porém, os componentes intracelulares (por ex. lipídios vs. amino ácidos) da *E. coli* apresentam significativa heterogeneidade (Chalk et al., 2015a).

Fernandez e Cadisch (2003) observaram fracionamento de  $^{13}\text{C}$  bem como progressivas variações na assinatura do  $\text{CO}_2$  coletado durante a biodegradação de moléculas orgânicas (glicose, albúmen, ácido palmítico, lignina). Durante os estágios iniciais da decomposição o  $\text{CO}_2$  respirado foi empobrecido em  $^{13}\text{C}$  em relação ao substrato, mas nos estágios posteriores o  $\text{CO}_2$  respirado tornou-se progressivamente mais enriquecido em  $^{13}\text{C}$ . Este estudo não só mostrou que fungos podem discriminar seletivamente o  $^{13}\text{C}$  quando utilizando substratos simples, mas os resultados sugeriram fortemente que o  $^{13}\text{C}$  não estava uniformemente distribuído dentro da cadeia de C das moléculas dos substratos (Chalk et al., 2015a).



**Figura 1.3** – Diagrama esquemático mostrando as diferenças nas assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$  de fungos saprófitos e ectomicorrízicos e os respectivos substratos,  $\text{CO}_2$  respirado e metabólitos de bactérias heterotróficas usando glicose como substrato. Setas sólidas ( $\uparrow$ ,  $\downarrow$ ) indicam o aumento no enriquecimento de  $^{13}\text{C}$ . Setas abertas ( $\Downarrow$ ,  $\Uparrow$ ) indicam rotas metabólicas (Elaborado pelo autor e publicado por Chalk et al., 2015a).

#### 4.1.3 Carbono orgânico do solo

Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do carbono orgânico do solo reflete a vegetação residente mostrando variações conforme a predominância de espécies C3 ou C4 (Pessenda et al., 2001). Mas estas assinaturas podem sofrer variações no tempo com a mudança de vegetação devido à mudanças climáticas (geológicas) ou mudança de uso do solo devido à agricultura e pecuária. Mudanças nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  em profundidade, isto é, no perfil do solo, sugerem mudança da vegetação nativa neste solo. No Brasil, diversos estudos relacionam a introdução do cultivo de cana-de-açúcar (C4) aos valores menos negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  do carbono orgânico do solo na camada arável (30 cm) do que em profundidade (70 cm) (Urquiaga, 2006). Equações para o cálculo de C orgânico do solo que incluem, além da correção em função da densidade do solo, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  permitem estimar a fração derivada da vegetação nativa e/ou da vegetação recentemente introduzida (por ex. culturas agrícolas) (Sisti et al., 2004).

Sisti et al. (2004) utilizaram a abundância de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de solos (Latosolo Vermelho distrófico, Passo Fundo, -RS) sob diferente tipos de manejo agrícola (Plantio Direto - PD e Convencional - PC; diferentes rotações de cultura com/sem adubação verde e milho em comparação com trigo/soja) para estudar o efeito no estoque de carbono orgânico. Para as rotações com milho e leguminosas houve uma expressiva tendência de valores mais negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  abaixo de 40 cm (PD), indicando a contribuição maior do milho ( $\delta^{13}\text{C} = -11,06\text{‰}$ ) no perfil abaixo de 30 cm. Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do solo também indicaram que a decomposição do material orgânico do solo no PD não sofreu alteração com as diferentes rotações que incluíram leguminosas e milho, diferentemente dos tratamentos em PC onde a redução da matéria orgânica do solo foi estimulada comparada com a sequencia trigo/soja (Sisti et al., 2004).

Neste experimento, a diferença de valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do solo sob vegetação nativa (solo referência) entre a camada 0-5 cm e a camada 85-100 cm de profundidade foi

aproximadamente de 5 ‰ menos negativo. Estes dados sugerem que em tempos recentes nesta área a vegetação foi predominantemente C3, mas houve uma proporção muito maior de espécies C4 em tempos remotos, provavelmente pastagem tropical. Situação similar foi encontrada no estudo de Vitorello et al. (1989), em Piracicaba-SP, onde os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do solo foram 8 ‰ menos negativa em profundidade. Portanto, a assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  do carbono orgânico do solo pode não ser uniforme, variando com a profundidade, e, geralmente apresentando um aumento marcado nos valores (menos negativos) de  $\delta$  nas camadas superficiais com pequena mudança abaixo em maiores profundidades do perfil.

Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , quando associados às frações físicas do solo, permitem avaliar as taxas de decomposição e degradação das várias frações de carbono orgânico do solo. As frações leves, ou aquelas associadas à areia, refletem a  $\delta^{13}\text{C}$  do material vegetal que ingressou recentemente no perfil do solo, e a fração associada à argila (C orgânico mais ‘humificado’), os valores de  $^{13}\text{C}$  são em geral maiores devido aos processos de decomposição que envolve fracionamento isotópico de  $^{13}\text{C}$ . Assim pode-se dizer que as frações finas (argila e silte) conservam mais o carbono originado da vegetação nativa (anterior), e que os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  são indicadores potenciais para refletir a recalcitrância da matéria orgânica do solo (Campos, 2003).

O ingresso no solo de carbono orgânico via esterco de animais, composto orgânico, ou fertilizante orgânico, também pode modificar a assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  do solo, principalmente na camada superficial. O composto orgânico (de silagem de milho) apresentou prolongado armazenamento de C (>80 % do C aplicado após dois anos) nas frações não minerais de um solo arenoso (Espodosolo ferri-humilúvico órtico) em clima temperado (Lynch et al., 2006). A aplicação deste composto orgânico (-15,1 ‰) produziu uma maior alteração dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (-28,4 ‰) na fração leve (de 1,4 a 9,7 ‰) e na fração areia (de 1,3 a 6,1 ‰) que ocorreu no solo total ou na fração argila – silte (de 0,5 a 3,8 ‰), respectivamente. (Lynch et al., 2006). Estes mesmos autores ressaltam que a maior homogeneidade dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  presente nos compostos orgânicos em relação aos materiais originais e a recalcitrância do C do composto melhorou a sensibilidade da técnica de  $\delta^{13}\text{C}$  em rastrear o C proveniente da entrada de insumos orgânicos (C4) no solo (C3).

#### 4.1.4 Diferenciação de produtos de origem animal

Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  aparecem como o indicador mais promissor para o modo de criação de ruminantes (orgânico vs. convencional, pastagem vs. confinamento) em regiões temperadas devido à relação da composição isotópica com os componentes da dieta (C3 / C4). Isto é, diferenças entre o grão de milho C4 abundante na dieta de criações intensivas e confinadas e pastagens C3 e leguminosas disponíveis na criação não-confinada (Inácio; Chalk, 2015). No entanto,  $\delta^{13}\text{C}$  pode ser um indicador inapropriado sob condições tropicais onde pastagens C4 são abundantes (por ex. *Brachiaria* spp.) (Heaton et al. 2008), e onde a criação a base de pasto (C4) é predominante em ambos os sistemas convencional e orgânico (por ex. Irlanda, Schmidt et al., 2005).

Carne e leite (ruminantes) produzidos em sistema convencional e orgânico podem diferir significativamente em termos de valores  $\delta^{13}\text{C}$  porque os padrões de produção orgânica restringem o uso de concentrados, que podem conter milho, na dieta dos ruminantes já que é exigido em tempo mínimo de pastejo (USDA, 2016). Alguns autores têm sugerido o limite máximo de -20 ‰ em carne orgânica (Boner; Förstel, 2004), e -26,5 ‰ para gordura do leite orgânico (Molkentin, 2013). A proporção de milho (C4) na dieta pode explicar até 96 % da variação do  $\delta^{13}\text{C}$  no tecido capilar (Schwertl et al. 2005). Então, valores mais negativos de

$\delta^{13}\text{C}$  são esperados para produtos orgânicos do que produtos convencionais. Essas diferenças tendem a ser menores e não significativas para aves e suínos, onde o milho tem participação essencial na dieta. A maior parte dos dados científicos disponíveis é de produtos como carne, leite e ovos, bem como, tecido capilar; são escassos os dados sobre outros produtos, por ex. de origem suína (Inácio; Chalk, 2015).

## 4.2 $^{34}\text{S}$

A composição total de  $\delta^{34}\text{S}$  (S orgânico + sulfato) no solo superficial varia de +1,7 a +18,1 ‰ (Mizota; Sasaki, 1996) e usualmente aumenta com a profundidade (Novák et al., 2003). A assinatura de  $\delta^{34}\text{S}$  do solo pode ser influenciada pela aplicação de fertilizantes sintéticos contendo  $\text{SO}_4^{2-}$ , gesso agrícola e enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), bem como, pela deposição atmosférica (por ex. água da chuva, poluição industrial). Regiões costeiras são influenciadas pelo *spray* marítimo que possui valores de  $\delta^{34}\text{S}$  ao redor de +20 ‰ (Mizota; Sasaki, 1996). As plantas adquirem o S pela extração de  $\text{SO}_4^{2-}$  da solução ou pela absorção foliar de poluentes atmosféricos tal com o  $\text{SO}_2$ . As culturas agrícolas apresentam, em geral, valores totais de  $\delta^{34}\text{S}$  variando de -3,7 a +10,1 ‰ (Georgi et al., 2005; Rapisarda et al., 2010; Tanz; Schmidt, 2010; Camin et al., 2011). Porém, órgãos da planta, bem como, os produtos metabólitos podem diferir de 3 a 6 ‰ do valor total de  $\delta^{34}\text{S}$  (Tanz; Schmidt, 2010). Fertilizantes sulfatados são originados do ácido sulfúrico (de metais sulfídricos, gases sulfurosos e depósitos naturais  $\text{S}^0$ ) e fontes marinhas. Os primeiros apresentam uma faixa de valores de  $\delta^{34}\text{S}$  de -6,5 a +11,5 ‰, enquanto os fertilizantes derivados de fontes marinhas se aproximam de +21 ‰ (Mizota; Sasaki, 1996; Vitória et al., 2004). Os depósitos naturais de  $\text{S}^0$  têm valores de  $\delta^{34}\text{S}$  na faixa de -20 a +15 ‰ enquanto o  $\text{S}^0$  comercial varia de -5 a +30 ‰ (Coplen et al., 2002).

### 4.2.1 Origem geográfica

A assinatura de  $\delta^{34}\text{S}$  parece ser um indicador útil para determinar a origem geográfica de alimentos, particularmente quando combinado com técnicas analíticas complementares. Produtos de natureza vegetal ou animal produzidos em regiões próximas da costa oceânica tendem a apresentar valores de  $\delta^{34}\text{S}$  mais positivos devido à influência da deposição do *spray* marítimo, o qual contém sulfato com valores de  $\delta^{34}\text{S}$  ao redor de +23 ‰ (Camin et al., 2007).

Amostras de cereais na Europa apresentaram valores de  $\delta^{34}\text{S}$  mais altos em áreas de produção próximas ao Oceano Atlântico daquelas no interior, embora a concentração de sódio no grão tenha tido um maior impacto como variável (Asfaha et al., 2011). No entanto, a média mais positiva para  $\delta^{34}\text{S}$  do suco de laranja oriundo do Brasil do que da Flórida (US) (Rummel et al., 2010) parece ter outros fatores de influência porque a maior parte (74%) da produção brasileira de laranja está no Estado de São Paulo, onde as áreas de produção estão a muitos quilômetros da costa do Atlântico. Neste caso, a influência de outras fontes tais como o enxofre de fertilizantes e o enxofre das emissões das indústrias deveriam ser investigadas. Ressalta-se que não se encontra na literatura estudos sobre a influência de defensivos a base de sulfato de cobre, entre outros, que podem estar influenciando nos valores de  $\delta^{34}\text{S}$  dos produtos vegetais.

Por outro lado, a média relativamente baixa dos valores de  $\delta^{34}\text{S}$  do suco de laranja do México mostra uma “clara” influência vulcânica, segundo Rummel et al., (2010). A mesma influência vulcânica foi apontada para a média baixa de  $\delta^{34}\text{S}$  encontrados em amostras de carne de carneiro da Toscana e Sicília (Itália) (Camin et al., 2007).

Considerando que os valores de  $\delta^{34}\text{S}$  dos fertilizantes estão na faixa de -4,9 a +21,6 ‰ (Mizota; Sasaki, 1996) na maioria dos casos a influência do *spray* marítimo parece encobrir o

sinal de composição isotópica do fertilizante fonte de S nas plantas e produtos derivados. As taxas de aplicação de S em solos agrícolas são cerca de dez vezes menores que as taxas de nitrogênio as quais ajudam explicar a maior influência da composição isotópica dos fertilizantes nitrogenados nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  em plantas (veja próxima seção).

A influência do *spray* marítimo (proximidade com a costa) na variabilidade dos valores de  $\delta^{34}\text{S}$  tem sido observada em mel de abelha (Schellenberg et al. 2010), leite de vaca (Bontempo et al., 2011; Crittenden et al., 2007), queijo (Camin et al., 2012; Manca et al., 2006; Pillonel et al., 2005) e manteiga (Rossmann et al., 2000), carne de carneiro (Camin et al., 2007) e lã de ovelha (Zazzo et al., 2011). O leite da Austrália apresentou valores mais altos de  $\delta^{34}\text{S}$  (+9 a +15 ‰) daqueles oriundos da Europa (+3 a +8 ‰) (Crittenden et al., 2007) e o queijo de regiões alpinas da Europa apresentou valores menores (+3,8 ‰) que aqueles de áreas próximas ao oceano tais como, Sardenha (Itália) (+9,1 ‰) (Camin et al., 2004). No entanto, Zazzo et al. (2011) encontraram que a relação entre os valores de  $\delta^{34}\text{S}$  (lã de ovelha) e a distância da costa (em km) pode não ser significativa dependendo da direção do vento predominante da região, combinado com a influência das fontes atmosféricas de deposição de enxofre. Além disso, apesar da forte relação entre a variação da composição isotópica de produtos de origem vegetal e animal com a “distância da costa”, a literatura científica recente (por ex. Asfaha et al., 2011) tem ressaltado o papel da combinação da análise de multi-isotópica (por ex.  $^{18}\text{O}$  and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ) e/ou a análise da concentração de elementos químicos para designação da origem geográfica de produtos alimentícios.

#### 4.2.2 Modos de produção

Enquanto a aplicação de fertilizantes sulfatados industrializados é limitada na agricultura orgânica (exceto sulfato de potássio), enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ) de fontes nativa ou comercial é permitido para o controle de pragas e doenças e como insumo para o solo (USDA, 2016). Portanto, para que a assinatura de  $\delta^{34}\text{S}$  seja capaz de discriminar o modo de produção, cultivos convencionais teriam que usar fertilizantes sulfatados e/ou  $\text{S}^0$  que diferem de forma significativa nos valores de  $\delta^{34}\text{S}$  comparado com fontes orgânicas de S e/ou  $\text{S}^0$  usado nos cultivos orgânicos. Devido a sobreposição parcial em formas de S permitidas na agricultura orgânica e na convencional, bem como, a sobreposição das assinaturas de  $\delta^{34}\text{S}$  de várias fontes de  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{S}^0$ , junto com os fatores de confundimento da proximidade com oceanos ou áreas industriais, é altamente improvável que os valores de  $\delta^{34}\text{S}$  de produtos agrícolas diferenciem esses dois modos de produção (Inácio et al., 2015a; Inácio; Chalk, 2015).

Portanto, os valores de  $\delta^{34}\text{S}$  em plantas não podem distinguir entre modos de produção ou tipo de fertilizante aplicado (Rapisarda et al., 2010), mas apresentam relação com a origem geográfica devido às diferentes condições geológicas e da formação do solo (Camin et al., 2011; Georgi et al., 2005; Schmidt et al., 2005; Tanz e Schmidt, 2010). A mesma situação ocorreu para a assinatura de  $\delta^{34}\text{S}$  de leite de vaca (Molkentin; Giesemann, 2010, 2007). Poucos estudos (por ex. González-Martin et al., 2001) apontaram o isótopo  $^{34}\text{S}$  como um indicador útil do sistema de produção (Suíno Ibérico, alimentado com castanhas – *acorn nuts*) ou sob dietas experimentais (algas marinhas) (Bahar et al., 2009) e de dieta pré-abate em animais (Osorio et al., 2011). Novamente, Zazzo et al. (2011) encontrou que os valores de  $\delta^{34}\text{S}$  no pelo de animais foi um indicador da proximidade com o oceano. Porém, uma atenção especial deve ser dada a possibilidade da adição de conservantes contendo S nos alimentos e bebidas os quais podem variar de +2,5 a +13,7 ‰ (Kelly et al., 2002) e, assim, podem confundir a interpretação da assinatura de  $\delta^{34}\text{S}$  em produtos alimentícios.

### 4.3 $^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}$

A composição de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  da água meteórica (chuva) segue um padrão geográfico previsível que está relacionado à latitude, à altitude, à distância da costa e à quantidade de precipitação local (Dansgaard, 1964). A composição de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  da água meteórica é afetada por fenômenos físicos tais como a condensação e a evaporação. A temperatura é a principal variável que influencia inversamente o fracionamento isotópico de  $^2\text{H}$  and  $^{18}\text{O}$  (Dansgaard, 1964; Gat et al., 1996). A água dos oceanos é definida com valor 0 ‰ para cada isótopo, e valores empobrecidos (negativos) de  $\delta$  são medidos na água meteórica e no vapor de água dos oceanos, enquanto valores relativamente enriquecidos de  $\delta$  são esperados para corpos d'água tais como lagos (Gat, 1996). A média anual de  $\delta^{18}\text{O}$  na água meteórica varia de +2 a -2 ‰ nas regiões equatoriais até valores tão baixos quanto -22 ‰ nas regiões polares (Gat, 1996).

Durante a aquisição de água do solo pelas plantas terrestres não há fracionamento isotópico e, portanto, a água presente no caule apresenta a mesma composição isotópica da fonte de água – isto é, água superficial versus água de camadas mais profundas no solo (Dawson et al., 2002). No entanto, devido à transpiração nas folhas a água é enriquecida em  $^2\text{H}$  e  $^{18}\text{O}$  em comparação com a água superficial do solo (Dawson et al., 2002). Plantas C4 podem ser enriquecidas em  $\delta^{18}\text{O}$  em comparação com plantas C3, com pequenas diferenças (< 1 ‰) em climas frios e úmidos, mas com grandes diferenças (10 ‰) em climas quentes e regiões semiáridas (Kohn, 1996). Portanto, considerando a complexidade da distribuição dos isótopos estáveis de H e O no *continuum* solo-planta-atmosfera devido às diferenças na localização e clima, é altamente improvável que as assinaturas de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  em plantas possa diferenciar modos de produção (Inácio et al., 2015a). No entanto, esses marcadores isotópicos tem tido uma importante aplicação na verificação da origem geográfica (Luykx; van Ruth, 2008).

Por outro lado, Chesson et al. (2010) encontraram correlação altamente significativa ( $R^2 > 0.99$ ) para ambos valores de abundância relativa ( $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ ) entre amostras pareadas de leite de vaca e a água de bebedouros em oito localidades dos EUA, dentro de uma faixa de  $\delta^2\text{H}_{\text{milk}}$  de -11 a 0 ‰,  $\delta^2\text{H}_{\text{water}}$  de -12 a 0 ‰,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{milk}}$  de -12 a -1 ‰ e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$  de -15 a -2 ‰. Vários autores tem demonstrado que as assinaturas de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  de carne bovina são ferramentas potenciais para prever a origem geográfica, entre países (por ex. Heaton et al., 2008) e mesmo de regiões dentro de um mesmo país (por ex. Nakashita et al., 2008), como uma consequência da relação direta entre as assinaturas isotópica da água fornecida e a dieta dos animais aos padrões geográficos da água meteórica.

Os valores de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  de animais mantidos em pastagens ou alimentados com pastagem fresca refletem mais a água livre nas folhas dos vegetais (isto é, enriquecido em  $^{18}\text{O}$ ) que a assinatura isotópica da água bebida pelos animais (Biondi et al., 2013; Renou et al., 2004). Além disso, para a mesma origem geográfica, o alto enriquecimento de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  na água presente no tecido animal pode indicar o gado alimentado com biomassa de onde a composição isotópica é influenciada pelas variações (anuais ou sazonais) na precipitação (Boner; Förstel, 2004). O baixo conteúdo de água dos concentrados (por ex. milho), silagens e forragens secas, em comparação com as pastagens frescas resulta no aumento de ingestão de água pelos animais, o que irá influenciar a composição isotópica do tecido e produtos animais mais do que a os componentes de dieta (Biondi et al., 2013; Boner; Förstel, 2004).

## 5 ISÓTOPO ESTÁVEL DE NITROGÊNIO ( $^{15}\text{N}$ )

### 5.1 Aplicação Agronômica da Abundância Absoluta ( $x$ )

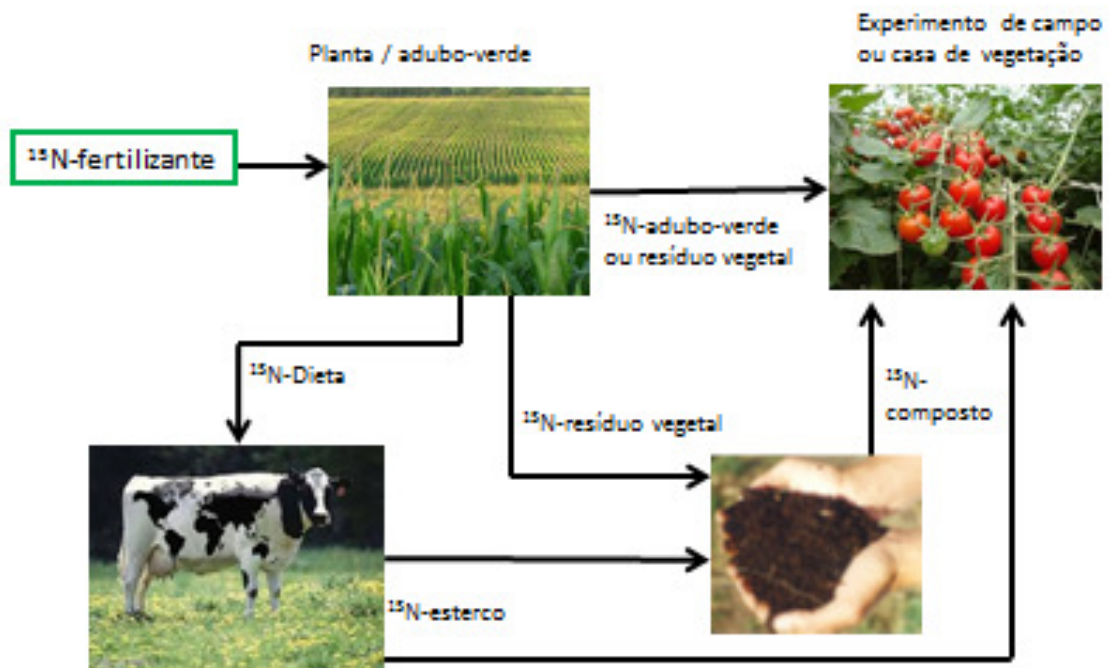
#### 5.1.1 Fertilizantes marcados com $^{15}\text{N}$

O uso de fertilizantes marcados com  $^{15}\text{N}$ , em geral  $^{15}\text{N}$ -ureia e  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, possibilita a determinação da recuperação do N no sistema solo-planta. A proporção de  $^{15}\text{N}$  do fertilizante enriquecido recuperada pela planta é calculada aplicando a seguinte equação:

$$\text{Proporção de N recuperado}_{\text{planta}} = \frac{\text{massa N}_{\text{planta}} \times x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{planta}}}{\text{massa N}_{\text{fertilizante}} \times x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{fertilizante}}}$$

Onde,  $\frac{x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{planta}}}{x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{fertilizante}}}$  é a fração do N da planta derivado do fertilizante.

O mesmo procedimento é utilizado para calcular a recuperação do fertilizante no solo, e a perda do fertilizante do sistema solo-planta pode ser calculada por balanço de massa. Os estudos de eficiência do uso do N também tem sido feitos com compostos orgânicos (Chalk et al., 2013), estercos de animais (Chalk et al., 2014) e com fertilizantes de liberação lenta ou controlada enriquecidos em  $^{15}\text{N}$  (Chalk et al., 2015b). A Figura 1.4 ilustra os passos para obtenção e uso de materiais orgânicos marcados com  $^{15}\text{N}$ , tais como esterco de animais, adubos-verdes e compostos orgânicos.



**Figura 1.4** Passos para obtenção de materiais orgânicos marcados com  $^{15}\text{N}$  e sua aplicação em estudos de eficiência como fertilizante (fonte de N). Fotos disponíveis no Google Image®.

Trabalhos envolvendo o isótopo estável de  $^{15}\text{N}$  para estudo da dinâmica de N no solo após a aplicação de fertilizantes orgânicos foram temas das revisões de Dittert et al. (1998) e Chalk et al. (2013). Técnicas envolvendo materiais marcados com  $^{15}\text{N}$  permitem separar o N do material orgânico, ou do fertilizante, do N do solo que é aproveitado (ou recuperado) pela planta.

Chalk et al. (2013) avaliaram a informação publicada sobre o valor como fonte de N de compostos orgânicos e encontraram uma variação muito grande nos resultados para a recuperação de N pela planta, cobrindo uma faixa de ~4 a 38 % de recuperação e  $^{15}\text{N}$  (Recp.  $^{15}\text{N}$ ). Dentre os trabalhos avaliados por estes autores, os desenhos experimentais, as diferentes culturas e as características do composto orgânico foram muito variáveis.

Os dados compilados por Chalk et al. (2013) mostram uma média de recuperação de  $^{15}\text{N}$  igual a 12,6 % (IC<sub>95%</sub> = 9,8 a 15,2 %) e uma ampla dispersão. A recuperação de N se mostrou inversamente relacionada à relação C:N do composto, porém, foi positivamente relacionada ao aumento da quantidade de N aplicado em forma de composto orgânico. As diferenças marcantes observadas entre os estudos dependem de vários fatores independentes ou fatores com interações, incluindo a uniformidade de marcação, a qualidade do composto, e a taxa de aplicação bem como as propriedades do solo e condições ambientais (Chalk et al. 2013). Alguns estudos envolveram cultivo em solo alagado, condição que representa marcadas diferenças na dinâmica de N. Em geral, as recuperações baixas (p. ex. < 10 %) estão associadas a compostos pobres em qualidade (alta C:N) tais como aqueles derivados de palha de arroz ou esterco compostado com serragem. A alta recuperação de N (27–29 %) foi observada quando o composto tinha boa qualidade (C:N  $\approx$  12) e foi aplicado em altas taxas (31–34 g N m<sup>-2</sup>) na cultura de arroz em cultivo inundado (Chalk et al. 2013).

Olesen et al. (2004) relataram resultados de experimentos com cevada e trigo conduzidos entre 1994 e 2002 (Dinamarca), os quais incluíram dejetos (fezes e urinas de ruminantes e suínos) marcados com  $^{15}\text{N}$ . A recuperação de  $^{15}\text{N}$  pelas culturas foi bastante variável conforme o tipo de esterco, variando de 9 a 47 % para o ano de aplicação, sendo menor nos dois anos seguintes, com aproveitamento residual de 2,5 a 6 % e 1,1 a 2,5 %, respectivamente.

O aproveitamento do N ( $^{15}\text{N}$ ) de esterco de gado leiteiro aplicado ao solo foi de 14 a 16 % no primeiro ano e 6 a 8 % no segundo ano de cultivo de milho (Munõz et al., 2004; Powell et al., 2005). Para 3 anos de cultivo uma média de 18 % do N ( $^{15}\text{N}$ ) do esterco foram aproveitados pela planta e 46 % permaneceram no solo. Diversos autores apontam que uma parcela significativa do N aplicado (30 a 80 %) na forma de esterco, composto ou adubos-verdes pode ficar retida no solo por até 3 anos (Thönnissen et al., 2000; Munõz et al., 2003; Garza et al., 2009; Celano et al., 2012; Araújo et al., 2011).

Em resumo, os estudos com  $^{15}\text{N}$  demonstram que os diferentes tipos de fertilizantes orgânicos apresentam grande variação de eficiência de uso, podendo ser < 10 % a > 40 % do N aplicado. O composto orgânico apresenta uma consistente, porém baixa, eficiência média de recuperação (8–12 %) e o aproveitamento de esterco de animais apresenta alta variação de valores de eficiência (14–47 %).



### 5.1.2 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio (FBN) por diluição isotópica

O método da diluição isotópica ou enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  (E) tem sido largamente utilizado para estimar a dependência proporcional de leguminosas da fixação biológica de  $\text{N}_2$  (FBN), em outras palavras, estimar a contribuição do N da fixação biológica à nutrição da planta. O método é baseado no enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  do solo com um fertilizante marcado e o uso de parcelas pareadas, uma contendo a leguminosa fixadora de  $\text{N}_2$  e outra com uma planta de referência não fixadora (Unkovich et al., 2008). As diferenças entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de leguminosas e as plantas de referência variam com a espécie, o grau de dependência à fixação de  $\text{N}_2$  e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  disponível no solo. No entanto, as diferenças registradas podem chegar a 16,4 ‰ para pastagens (Chalk et al., 2016). Já Oberson et al. (2007) apresentou diferenças entre plantas de soja (leguminosa) e plantas daninhas (referência) entre 4,4 a 7,5 ‰.

A dependência proporcional ( $P_{\text{atm}}$ ) da leguminosa da FBN é estimada conforme a equação:

$$P_{\text{atm}}(\text{E}) = 1 - \frac{x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{leguminosa}}}{x^{\text{E}}(^{15}\text{N})_{\text{planta de referência}}}$$

Os valores de  $P_{\text{atm}}$  estão numa escala de 0 a 1. Tem sido reportados estimativas de FBN ( $P_{\text{atm}}$ ) variando de 0.15 para soja (Oberson et al. 2007) até 0.99 para trevo-vermelho (Huss-Danell; Chaia, 2005) utilizando o enriquecimento com  $^{15}\text{N}$ .

## 5.2 Aplicação Agrônômica da Abundância Relativa ( $\delta$ )

### 5.2.1 Fracionamento de $^{15}\text{N}$ influenciando os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de fertilizantes orgânicos

Fertilizantes nitrogenados sintéticos (p. ex. sais de amônio e urea) são derivados da amônia ( $\text{NH}_3$ ) produzida pelo processo Haber-Bosch, o qual envolve a redução catalítica do  $\text{N}_2$  atmosférico a alta temperatura e pressão por  $\text{H}_2$  derivado do metano ou do gás natural. Portanto, os fertilizantes sintéticos possuem assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  próxima ao  $\text{N}_2$  atmosférico (por definição  $\delta^{15}\text{N} = 0$  ‰). Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para os fertilizantes sintéticos nitrogenados reportados na literatura se situam frequentemente entre  $-3.9$  a  $+5.9$  ‰ (Inácio et al., 2015a).

Fertilizantes orgânicos (que contém N) são naturalmente enriquecidos (mais positivos) no isótopo estável  $^{15}\text{N}$  quando comparados aos fertilizantes sintéticos. No entanto, as frações de N, como  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , podem ter valores diferentes devido ao fracionamento isotópico durante o armazenamento do esterco ou mesmo durante a compostagem.

Volatilização de amônia, nitrificação e a redução dissimilatória de  $\text{NO}_3^-$  (desnitrificação biológica) são os principais processos que afetam a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  dos principais fertilizantes orgânicos, esterco de animais e composto orgânico (Högberg, 1997; Robinson, 2001). A volatilização de  $\text{NH}_3$  que é a rota de perda de N mais importante de esterco armazenado ou depositado e na compostagem de resíduos orgânicos envolve várias etapas nas quais o fracionamento isotópico ocorre. Estas etapas (i – iv) foram descritas por Högberg (1997), como segue:

(i) Efeito do equilíbrio ( $A \leftrightarrow B$  na solução)



$\text{NH}_4^+$  é mais enriquecido em  $^{15}\text{N}$  que  $\text{NH}_3$  no equilíbrio químico ( $\alpha = 1.020\text{--}1.027$ )

(ii) Efeito cinético

1. Difusão da  $\text{NH}_3$  em solução para o local de volatilização ( $\alpha \approx 1\ 000$ )
2. Volatilização de  $\text{NH}_3$  ( $\alpha = 1.029$ )
3. Difusão da  $\text{NH}_3$  para fora do local de volatilização ( $\alpha \approx 1\ 000$ )

A primeira etapa da nitrificação, a oxidação enzimática do  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$ , mostrou ter forte efeito de fracionamento ( $\alpha = 1.015$  a  $1.036$ ) em culturas puras de *Nitrosomonas* (Högberg, 1997). Já a desnitrificação pode ser um importante processo de fracionamento isotópico no esterco depositado (p. ex. na pastagem) ou armazenado ou mesmo na compostagem. O processo completo de desnitrificação ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}\uparrow \rightarrow \text{N}_2\uparrow$ ) tem um fator de fracionamento entre  $1.028 - 1.033$  (Robinson, 2001) ou maior (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3.** Fatores de discriminação ( $\epsilon$ ) para os processos do ciclo do nitrogênio.

Process	Discrimination (‰)	
	Högberg (1997) <sup>1</sup>	Robinson (2001)
Ammonificação ( $\text{N orgânico} \rightarrow \text{NH}_4^+$ )	$\approx 0$	0–5
Nitrificação ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ )	15–35	15–35
Volatilização ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3\uparrow$ )	29	40–60
Desnitrificação ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}\uparrow \rightarrow \text{N}_2\uparrow$ )	0–33	28–33
Produção de $\text{N}_2\text{O}$ e $\text{NO}$ durante a oxidação de $\text{NH}_4^+$		35–60
Fixação biológica de $\text{N}_2$	0–2	0–6
Assimilação de $\text{N}$ inorgânico pelas plantas	0–20	0–19 ( $\text{NO}_3^-$ ) 9–18 ( $\text{NH}_4^+$ )

nota:  $\epsilon = (\alpha - 1) \times 1000$

Yun e Ro (2009) apresentaram valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  de  $+22,4$  e  $+16,5$  ‰, respectivamente, em um composto feito de serragem madeira e esterco de suíno. De modo similar, a excreção animal consiste de fração sólida (esterco) e líquida (urina), exceto para frangos onde não há urina. O esterco e a urina apresentam, em geral, diferenças grandes nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . Frequentemente, a urina é empobrecida em  $^{15}\text{N}$  em relação ao alimento que o animal ingeriu e ao esterco com valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre  $-1.6$  a  $+4.1$  ‰ (Chalk et al., 2014). Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  podem ser tanto positivos quanto negativos para urina, enquanto os valores foram sempre positivos, no esterco de gado leiteiro (Cheng et al., 2011). A urina foi invariavelmente empobrecida em  $\delta^{15}\text{N}$  em relação ao alimento dado ao gado, enquanto o esterco foi similar ou enriquecida em relação à dieta do animal. Além disso, relação linear e altamente significativa foi encontrada entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do alimento ( $+2$  a  $+8.5$  ‰) e as fezes ( $+4$  a  $+9$  ‰) (Cheng et al., 2011).

Os esterco de animais são naturalmente enriquecidos em  $^{15}\text{N}$  devido aos processos de fracionamento isotópico, tais como a volatilização e  $\text{NH}_3$  e a desnitrificação que ocorrem durante o armazenamento do esterco ou durante a compostagem de resíduos orgânicos (Chalk et al., 2014). Tanto a  $\text{NH}_3$  quanto o  $\text{N}_2\text{O}$  perdidos são empobrecidos em  $^{15}\text{N}$ . Hristov et al. (2009) encontrou valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para  $\text{NH}_3$  de  $-31\text{‰}$  (1 dia) a  $-15\text{‰}$  (14 dias) volatilizada do incubação em laboratório de esterco de bovinos. Igualmente, Maeda et al. (2010) encontrou valores de  $^{15}\text{N}$  para  $\text{NH}_3$  de  $-20\text{‰}$  (15 days) a  $-15\text{‰}$  (45 days) durante a compostagem de esterco bovino. Como consequência das perdas de N empobrecido em  $^{15}\text{N}$  (valores negativos de  $\delta^{15}\text{N}$ ), o N remanescente torna-se enriquecido em  $^{15}\text{N}$ . Por exemplo, os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da silagem de milho aumentaram  $+7.9\text{‰}$  durante a compostagem (Lynch et al., 2006) e aumentos similares foram observados para a compostagem de esterco de bovinos e serragem (Tabela 1.4)

**Tabela 1.4**  $^{15}\text{N}$  abundância de resíduos agrícolas e dos compostos derivados.

Referência	Resíduo	$\delta^{15}\text{N} / \text{‰}$
Kim et al., 2008	Esterco bovino	+7,6
	Composto de esterco bovino + casca de arroz <sup>a</sup>	+11,0
	Esterco bovino	+11,4
	Composto de esterco bovino + serragem <sup>b</sup>	+15,6
Lynch et al., 2006	Silagem de milho	$+0,3 \pm 1,3$
	Composto de silagem de milho	$+8,2 \pm 0,4$

<sup>a</sup>  $\delta^{15}\text{N}$  da casca de arroz =  $+4.9 \pm 0.1 \text{‰}$

<sup>b</sup>  $\delta^{15}\text{N}$  da serragem =  $+1.7 \pm 0.2 \text{‰}$

No entanto, relação linear fraca foi encontrada entre as concentrações de N e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do composto de esterco de gado ( $r^2 = 0.16$ ,  $p < 0.05$ ) numa faixa de 10 a 35 g N  $\text{kg}^{-1}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  de  $+9$  a  $+22 \text{‰}$  (Lim et al., 2010). De fato, o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  *per se* não é indicador de um esterco ou composto orgânico com alta ou baixa concentração de N. Somente, a diferença entre  $\delta^{15}\text{N}$  no tempo ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{inicial}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{final}}$ ) pode indicar a magnitude de perdas de N do esterco armazenado ou da compostagem.

### 5.2.2 Diferenciação de produtos de origem vegetal e animal

O valor de  $\delta^{15}\text{N}$  de produtos vegetais tem sido apontado como um marcador promissor para diferenciar hortaliças, frutas e grãos oriundos da agricultura orgânica ou convencional, já que os fertilizantes orgânicos (esterco e composto) e os nitrogenados sintéticos (p. ex. ureia) diferem acentuadamente quanto à assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$ . Quanto maior a diferença nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre os fertilizantes orgânico e sintético, mais robusta será a diferenciação dos produtos vegetais adubados com essas fontes de N. No entanto, diferentes culturas agrícolas mostram maiores ou menores diferenças entre valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de produtos orgânicos ou convencionais e certo grau de sobreposição pode ocorrer.

Tomates orgânicos mostraram grande diferença nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  comparados com a produção convencional ( $+8,1 \pm 3,2 \text{‰}$  vs.  $-0,1 \pm 2,1 \text{‰}$ , respectivamente) enquanto diferenças entre alfaces foram menores ( $+7,6 \pm 4,1 \text{‰}$  vs.  $+2,9 \pm 4,3 \text{‰}$ , respectivamente), embora ainda estatisticamente significativas; no entanto, valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de cenouras orgânicas e convencionais ( $+5,7 \pm 3,5 \text{‰}$  vs.  $+4,1 \pm 2,6 \text{‰}$ ) não diferiram estatisticamente (Bateman et al., 2007). Cultivos perenes, tais como frutos de laranja (orgânico =  $+7,3$  a  $+7,9$

‰ vs. convencional = +5.1 a +6.1 ‰), tendem a mostrar menores, porém significativas, diferenças nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , entre modos de produção (Camin et al., 2011). Contudo, vários fatores de produção ou externos podem confundir a designação do produto, p. ex., (i) produtos de leguminosas (soja) ou o uso de leguminosas como adubos-verde em cultivos orgânicos, (ii) culturas agrícolas com baixo requerimento de N, (iii) hábito de crescimento perene, anual ou ciclo curto, (iv) uso de fertilizantes orgânicos em cultivos convencionais, e (v) a venda de produtos orgânicos como produtos convencionais (Inácio et al., 2015a).

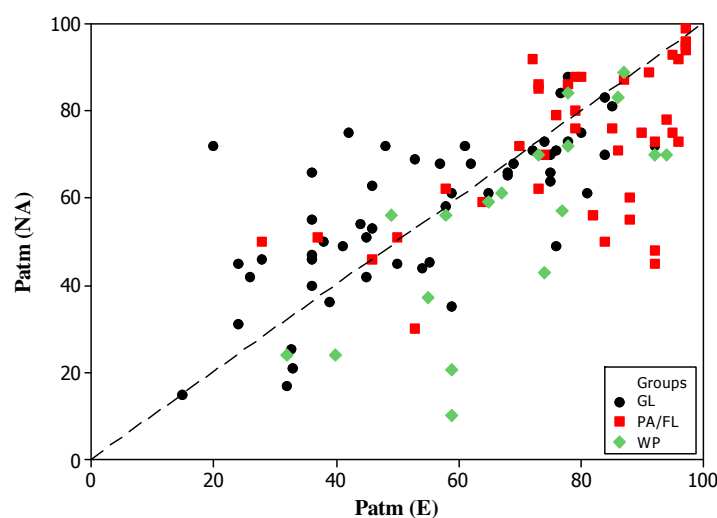
Para produtos de origem animal (carne, leite, ovos, etc.) o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  não é apontado como um marcador promissor para diferenciar produtos (leite e carne) orgânicos e convencionais (Inácio; Chalk, 2015), apesar de alguns autores terem reportado que o leite convencional apresentou predominantemente valores mais altos de  $\delta^{15}\text{N}$  que a contraparte orgânica (Europa) (Molkentin, 2013). São muitos os fatores que podem influenciar e confundir a diferenciação entre modos de produção, como a composição e a digestibilidade da dieta (C3 vs. C4, leguminosas, silagem, pasto, etc), especificidade do tecido animal (ou componente), ciclo metabólico, taxa de crescimento e idade do animal, e, por fim, o balanço de N no nível da propriedade agrícola (Inácio; Chalk, 2015). Por outro lado, os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  são indicadores da administração de rações com componentes de origem animal (que contenham N). Como componentes de ração de origem animal (por ex. farinha de osso e carne de bovinos) possuem valores de  $\delta^{15}\text{N}$  invariavelmente mais altos que os componentes de origem vegetal, a assinatura desta fonte de proteína (N) na ração é refletida diretamente nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  dos tecidos (p. ex. frango) e produtos do animal (p. ex. ovos e carne) (Carrijo et al., 2006, Denadai et al., 2008; Coletta et al., 2012).

### 5.2.3 Estimativa da FBN por abundância natural

O uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  (AN) para estimar a FBN em leguminosas é mais recente comparado com o método de enriquecimento. Este método não requer o uso de fertilizantes marcados, porém, também necessita do uso de uma planta de referência não fixadora. Adicionalmente, o método requer a determinação do fracionamento isotópico que ocorre durante a FBN (Unkovich et al., 2008). O fracionamento isotópico é determinado cultivando a espécie leguminosa (fixadora) em um meio livre de N. Este procedimento resulta no valor B / ‰ que é aplicado na equação abaixo:

$$P_{\text{atm}}(\text{AN}) = \frac{\delta(^{15}\text{N})_{\text{planta de referência}} - \delta(^{15}\text{N})_{\text{leguminosa}}}{\delta(^{15}\text{N})_{\text{planta de referência}} - \text{B}}$$

No entanto, Chalk et al., (2016) apontam para uma expressiva falta de consistência entre os métodos de diluição isotópica e o método da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para estimar a FBN, apesar da correlação significativa (Fig. 1.5), quando comparados em experimentos simultâneos.



**Figure 1.5** Gráfico de dispersão de  $P_{\text{atm}}(E)$  vs.  $P_{\text{atm}}(AN)$ . A linha tracejada representa a fronteira hipotética ao longo da qual as estimativas seriam iguais (isto é,  $P_{\text{atm}}(E) = P_{\text{atm}}(NA)$ ). A dispersão dos pontos ao redor da linha mostra a magnitude da discrepância entre as estimativas. GL, grãos leguminosas; PA/FL, pastagens e forragens leguminosas; WP, arbóreas perenes (Chalk et al., 2016)

Estes autores calcularam que a probabilidade dos métodos darem estimativas similares, isto é,  $-5$  a  $+5$  pontos percentuais de diferença entre as estimativas calculadas para três grupos de espécies (pastagens, grãos e arbóreas perenes), é aproximadamente de apenas 30 %. As principais razões para estas discrepâncias residem na obtenção do valor B, no uso das plantas de referência e na variação espacial e temporal da distribuição dos isótopos de N. Porém, os autores sustentam que a planta de referência deve ser eliminada e substituída por outras abordagens. Por exemplo, como as propostas que incluem a (i) acomodação de equações exponenciais aos dados experimentais do declínio temporal do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no solo (Chalk et al, 1996) e (ii) do uso da correlação linear entre a diferença ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) de valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da parte aérea (soja) e dos nódulos ( $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{parte aérea}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{raiz nodulada}}$ ) com as estimativas ( $P_{\text{atm}}$ ) utilizando plantas de referência (Wanek; Arndt, 2002). Anteriormente, Chalk e Ladha (1999) já haviam apontado a planta de referência como o “calcanhar de aquiles” da metodologia com  $^{15}\text{N}$ .

## 6 CONCLUSÕES

As variações na abundância natural dos isótopos estáveis dos principais elementos envolvidos nos ciclos biogênicos têm sido objeto de estudo por décadas e a aplicação desta técnica tem se ampliado com o aumento da precisão dos equipamentos para análise da razão isotópica. A análise de isótopos estáveis tem demonstrado ter aplicações de enorme relevância no campo da ciência básica (ex. fisiologia) ou no campo da aplicação com fins mercadológicos (ex. análises forenses, certificação). Especialmente na agricultura essa abrangência de aplicações, do conhecimento básico ao aplicado, ganha maior relevância já que a produção de alimentos passa por diversas mudanças para atender requisitos ambientais (sustentabilidade) e mercadológicos (globalização, aumento da produção, agregação de valor e denominação de origem). O estudo do N na agricultura sempre foi de extrema relevância, pela sua importância na nutrição de plantas e sua alta mobilidade nos ecossistemas. Neste sentido, os estudos com  $^{15}\text{N}$ , especialmente em abundância natural, são uma ferramenta de pesquisa que nos traz informações importantes sobre a dinâmica do N nos agroecossistemas e ecossistemas naturais. Portanto, a tendência é que as análises de isótopos estáveis se tornem cada vez mais corriqueiras nos trabalhos científicos e como serviço disponível à sociedade.

## **CAPÍTULO II**

### **USE OF $^{15}\text{N}$ NATURAL ABUNDANCE TO ESTIMATE TOTAL N LOSS DURING BENCH-SCALE COMPOSTING**

Partially published in:

INÁCIO, C.T.; URQUAIGA, S., CHALK, P.M., Alves, B.J.R. Nitrogen Loss ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) Patterns in Bench-Scale Composting. ANALS - IV Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management – SIGERA. Rio de Janeiro, 3 - 5 de May, 2015.

## 1 RESUMO

As perdas de nitrogênio (N) durante a compostagem reduzem o valor do produto final como fertilizante. O N é perdido na compostagem principalmente pela volatilização de amônia (NH<sub>3</sub>) durante a fase termofílica. Três biorreatores de bancada com sistema de controle por diferença de temperatura (CDT) foram utilizados como abordagem experimental para investigar o padrão de perdas de N (NH<sub>3</sub> e N<sub>2</sub>O) durante a compostagem (240 h). O pico de emissão de N<sub>2</sub>O ocorreu mais cedo (7 h) que o pico de volatilização de NH<sub>3</sub> (48-60 h) durante a fase termofílica (~55 °C). O pico da taxa de volatilização de NH<sub>3</sub> ocorreu logo em seguida à maior atividade e biológica (consumo de O<sub>2</sub>/emissão de CO<sub>2</sub>) a 40 °C, o qual coincidiria com a maior amonificação, porém a imobilização de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> também ocorre neste ponto, afetando a volatilização de NH<sub>3</sub>. De acordo com o método de balanço de massa a perda de N total foi 13 % do N inicial. No entanto, a quantidade máxima de NH<sub>3</sub>-N medida foi de 6 % do N inicial. As diferenças nas curvas de temperatura e na NH<sub>3</sub>-N acumulada estão relacionadas à atividade biológica em cada biorreator. Durante a compostagem houve variação no  $\delta^{15}\text{N}$  do composto devido às perdas de N. Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  aumentaram de 2,1 a 2,4 ‰ nas primeiras 120 h, e não houve variação significativa ( $p < 0.005$ ) entre 120 e 240 h. A razão entre a variação nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) do composto e o N total perdido e foi igual a 0,0032 (intervalo de confiança = 0,0024 a 0,0039). A variação nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  durante a compostagem pode ser igualmente utilizado como o balanço de massa para estimar as perdas de N. No entanto, a incerteza em ambos os métodos permanece alta e mais experimentos devem ser conduzidos para melhorar a exatidão das estimativas em diferentes escalas e materiais orgânicos.

**Palavras-chave:** Esterco de cavalo. Biorreatores. Respirometria



## 2 ABSTRACT

Nitrogen (N) losses during composting reduce the value of the end product as a fertilizer. Nitrogen is lost during composting mainly by ammonia (NH<sub>3</sub>) volatilization during the thermophilic phase. We used three bench-scale aerobic bioreactors with a controlled temperature difference (CDT) system as an experimental approach to investigate the pattern of N losses (NH<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O) during 240 h-composting. Peak N<sub>2</sub>O emission occurred much earlier (7 h) than peak NH<sub>3</sub> volatilization (48-60 h) during the thermophilic phase (~55 °C). The NH<sub>3</sub> volatilization peak rate occurred following the greater biological activity (O<sub>2</sub> consumed/CO<sub>2</sub> evolved) at 40 °C which could coincide with greater ammonification, but immobilization of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> also occurs at this point affecting NH<sub>3</sub> volatilization. According to the mass balance method total N loss was 13 % of the initial N. However, the maximum amount of NH<sub>3</sub>-N trapped was 6 % of the initial N. Differences in temperature curves and accumulated NH<sub>3</sub>-N were related to the biological activity in each vessel. During the composting process there was a shift in the  $\delta^{15}\text{N}$  of the compost due to the N losses.  $\delta^{15}\text{N}$  values increased about 2.1 to 2.4 ‰ in the first 120 h, and there was no significant ( $p < 0.005$ ) shift between 120 to 240 h. The ratio between the shift of  $\delta^{15}\text{N}$  values ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) of compost and the total N lost was equal to 0.0032 (confidence interval = 0.0024 to 0.0039). The use of the shift of  $\delta^{15}\text{N}$  values during composting can be used equally well as mass balance to estimate the N loss. However, the uncertainty on both N loss mass balance and  $\delta^{15}\text{N}$  values remain high and more experiments should be carried out to improve the accuracy of estimates across different scales and organic feedstocks.

**Keywords:** Horse manure. Bioreactors. Respirometry.

### 3 INTRODUCTION

Composting of agricultural/agro-industrial wastes is a major process in the production of organic and organo-mineral fertilizers, and compost is the major soil amendment for certified organic farming systems. However, the nitrogen (N) losses during composting reduce the value of the end product as a fertilizer. Nitrogen is lost during composting mainly by ammonia ( $\text{NH}_3$ ) volatilization in the thermophilic stage that can account for 60 to 99 % of total N losses (Liang et al., 2006), while nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) accounts for less than 5.0 % to 22 % of N losses (Fukumoto et al., 2011), depending on the composting conditions. Nevertheless, composting conditions can increase the relative amount of  $\text{N}_2\text{O}$  emitted (e.g. pile scale effect, Fukumoto et al., 2003). A much smaller part of N is potentially lost in the leachate as  $\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$  (nitrite/nitrate), solubilized  $\text{NH}_4^+$  or organic N (particles of organic matter), with few exceptions depending on composting conditions such as waste type and inadequate aeration (de Guardia et al., 2010).

$\text{NH}_3$  volatilization in composting of agricultural/agro-industrial wastes has been reported to account for less than 10 % (Hassouna et al., 2008; Raviv et al, 2004; Sommer; Dahl, 1999; Fukumoto et al, 2003) to more than 40-70 % (Barrington et al., 2002; Dias et al, 2010; Delaune et al., 2004; Paillat et al., 2005), and even can reach more than 80 % of total initial N (de Guardia et al., 2010). These wide variation of  $\text{NH}_3$  volatilization significance might be expected in both laboratory- (e.g. Barrington et al., 2002) and full-scale composting (e.g. Dias et al, 2010). However, laboratory-composting reactors are more similar to aerated composting pile and not to turning or static piles methods.

$\text{NH}_3$  volatilization during the composting process begins to be significant in the early stage (<10 days) of the process (> 40 °C) and reaches its peak during the thermophilic phase (>55°C), (Fukumoto et al., 2003; Fukumoto; Inubushi, 2009). The typical increase of pH values (> 7) during composting causes large and fast losses of  $\text{NH}_4^+$  by  $\text{NH}_3$  volatilization, as well as nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) accumulation after the thermophilic phase, which has been related to an increase in nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) emissions (denitrification) (Hao; Chang, 2001; Sasaki et al., 2006). Thus,  $\text{NH}_3$  volatilization tends to decrease before the end of the thermophilic phase to a very low level during the mesophilic/maturation phase (Sommer and Dahl, 1999; Osada et al., 2000; Hao; Chang, 2001; Hellenbrand; Halk, 2001; Paillat et al., 2005; Pagans et al., 2006).

$\text{NH}_3$  volatilization usually shows a sharp-curve in the first days of composting (e.g. Kader et al., 2007) or sometimes blunter-curve (e.g. Fukumoto et al, 2003), always tending to match the temperature curve of the composting process. Therefore, even in laboratory- and pilot- scale  $\text{NH}_3$  volatilization have shown a similar pattern to aerated composting piles and many authors have emphasized the importance of  $\text{NH}_3$  volatilization control during the initial phase of composting. In fact, many factors have been related in literature to affect the significance of  $\text{NH}_3$  emissions such as waste characteristics (e.g. stripping and nitrification ability), composting initial conditions (e.g. C and N content) and process management practices (e.g. turning and aeration rate). A quantitative simulation model of  $\text{NH}_3$  volatilization in composting was proposed by Liang et al. (2004) considering as main parameters substrate composition, temperature, aeration, pH and moisture content.

Various techniques have been proposed to reduce  $\text{NH}_3$  volatilization and to enhance the value of compost as fertilizer such as: acids application (Delaune et al., 2004), addition of

S<sup>0</sup> (Smith, 1924; Gu et al., 2011); struvite precipitation (Fukumoto et al., 2011; Jeong; Hwang, 2005; Ren et al., 2010a, 2010b; Zhang et al., 2007); mineral adsorbents (zeolite) and organics (coconut fibers, biochar) (Bernal et al., 1993; Hu et al., 2007; Dias et al., 2010; Steiner et al., 2010); management of labile C and C: N ratio (Liang et al., 2006; Matsumura et al., 2010); microbial inoculants (Delaune et al., 2004; Fukumoto et al., 2011; Gu et al., 2011); use of urease inhibitors (Zhang et al., 2010).

However, little attention has been given to a comparative assessment of the efficacy of NH<sub>3</sub> mitigation techniques. Diverse units used by different authors make direct comparisons difficult. However, in some cases, biological activity decreasing (lower ammonification rate) and consequently reducing NH<sub>3</sub> volatilization may be related to unfavourable ecological conditions (e.g. low moisture, de Guardia et al., 2010; high salt concentration, Kithome et al., 1999), mainly by limiting oxygen supply (de Guardia et al., 2008) that reduces ammonification rates. Thus, erroneous conclusions could be drawn when biological activity is not taken into account or comparisons are made between treatments having different biological activities or ammonification rates. An appropriate experimental approach seems to be crucial to assess the composting process. Bench-scale aerobic bioreactors have been used for many purposes (e.g. gas emissions and microbial community structure) in composting studies (Mason; Milke, 2005) and it seems to be useful for N loss comparisons.

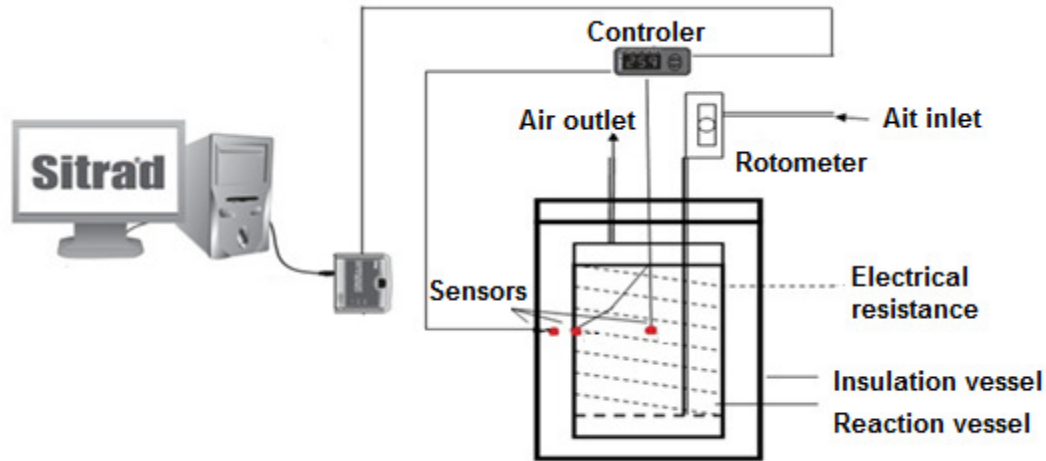
As discussed in chapter I, section 5.2.1, during composting <sup>15</sup>N isotope fractionation occurs due to N losses by chemical and physical processes. Volatilization of <sup>15</sup>N depleted-NH<sub>3</sub> leaves the remaining N in storage manure enriched in <sup>15</sup>N (Lee et al., 2011). Kim et al. (2008) also observed an increase in the  $\delta^{15}\text{N}$  values of cattle manure composted with sawdust (from +11.4 to +15.6‰) and cattle manure composted with rice hulls (from +7.6 to +11.0‰). Hristov et al. (2009) found a highly significant positive linear relationship between cumulative ammonia loss and the  $\delta^{15}\text{N}$  value of stored manure over the range of +4.5 to +7.5‰. Thus, we expect that techniques applied to minimize N losses during composting (i.e. NH<sub>3</sub> losses) should affect the  $\delta^{15}\text{N}$  value of the end product, which could be used as an indicator of the magnitude of N losses and as a tracer of the N-source for NH<sub>3</sub> volatilized and N<sub>2</sub>O emitted (Chalk et al., 2014). Therefore, the objective of this research was to determine (i) the pattern of N losses (NH<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O) and (ii) its relationship to  $\delta^{15}\text{N}$  values in compost, using a bench-scale apparatus to contain the composting process.

## 4 MATERIAL AND METHODS

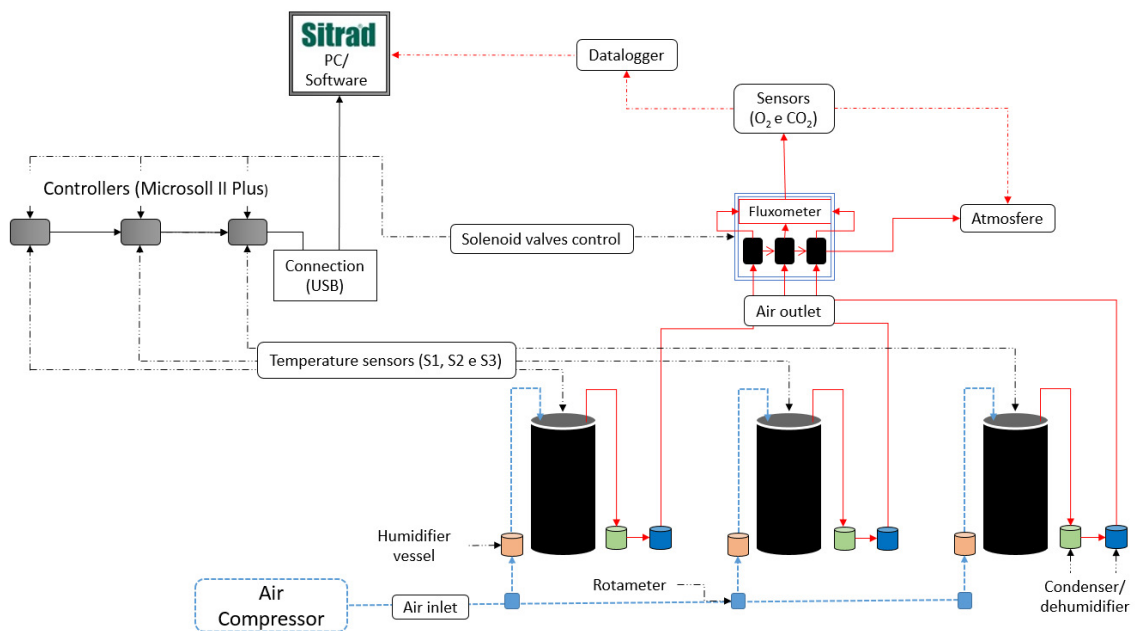
### 4.1 Experiment

Three bench-scale cylindrical bioreactors of polypropylene were used to contain the composting process. Each bioreactor was comprised of a reaction vessel (3.0 L), which contains the feedstock, and an insulating vessel, equipped with insulation and electrical resistance tape (Fig. 2.1A). Forced aeration was controlled by a rotometer coupled with a pressure regulator (ASA<sup>®</sup>) and monitored by a digital fluxometer (Omega<sup>®</sup>) at 150 and 50 ml min<sup>-1</sup> during the first 0-120h (0-5d) and 121-240h (6-10d), respectively. Temperature was controlled by a temperature differentials method (Magalhães et al., 1993) using Microsoll<sup>®</sup> II plus and Sitrad<sup>®</sup> software (FullGauge<sup>®</sup>) which also programmed the sampling of the exhaust air (every 2 h for 15 minutes) by a multi-sampler equipped with solenoid valves (Fig. 2.1B). Temperature control is based on the difference of temperature between the two sensors inside the reaction vessel. The electrical resistance tape inside the insulating vessel is on / off when

the difference between center and wall sensors is  $>1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  and temperature is above the upper limit set (e.g.  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), respectively. Biological activity within each reaction vessel was monitored by a respirometric method using an in-line  $\text{O}_2$ -zirconia sensor and  $\text{CO}_2$  infra-red sensor (SST® Sensing). The air inlet was humidified prior to entry into the vessel and the air outlet was passed through an acid trap (0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100ml, renewed every 6 hours) and a silica gel filter prior to gas sensing. Respirometry and flow meter data were stored in a datalogger (Campbell®).



**Figure 2.1A** Bench-scale composting bioreactor.



**Figure 2.1B** Bench-scale composting apparatus scheme.

Aerobic-thermophilic composting was carried out for 10 days. Each vessel contained approximately 1000 g wet weight with 70 % moisture of a 2:1 mixture (wet basis) of horse bedding manure and hydroponic lettuce (chopped leaves). Each vessel was weighed before and after sampling (0, 120, 240 h) using a one decimal digital scale (g) to follow mass reduction during composting. Mass reduction was corrected considering the samples taken.

The maximum temperature was set at 55°C. Volatilized NH<sub>3</sub> was determined by a distillation/titration method. Gas samples were collected with syringes at 25, 30, 40, 50, 55 °C for N<sub>2</sub>O analysis by gas chromatography. Solid samples were taken at 0, 1, 5 and 10 days for further chemical analysis.

#### 4.2 Analytical Methods

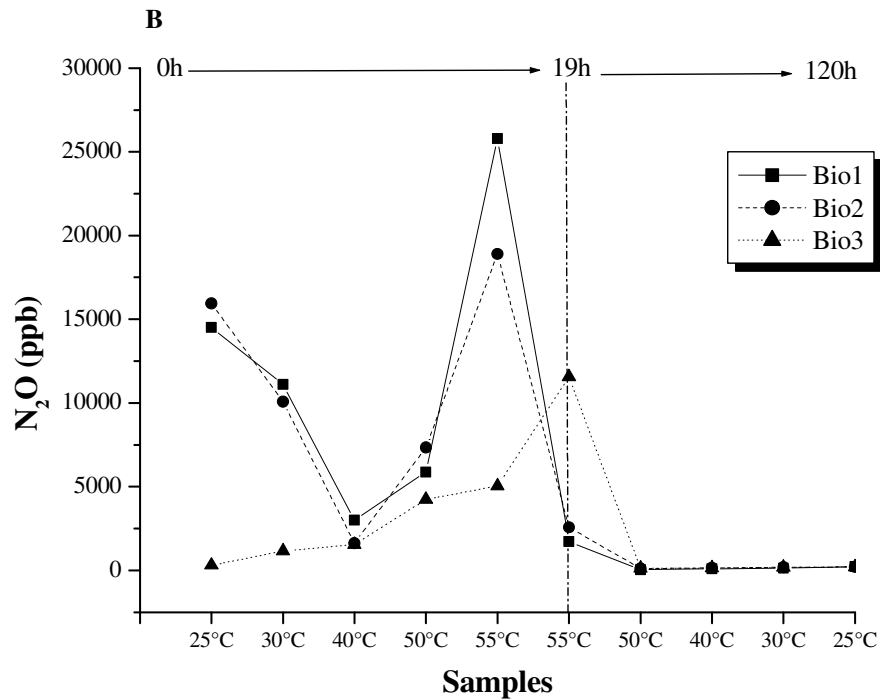
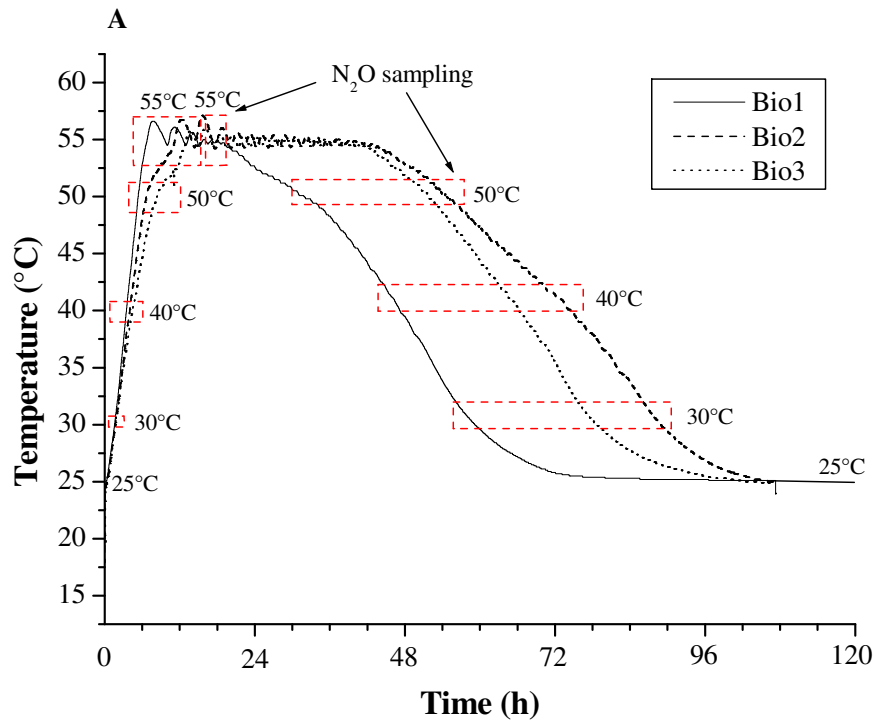
Solid samples were dried at 60°C and homogenized and milled to a fine powder in a ball mill. Before drying 2 ml of sulfuric acid solution (0.5 M) was applied to the samples to reduce pH and avoid NH<sub>3</sub> volatilization. Total nitrogen and total carbon of samples were determined by an elemental combustion analyzer (Perkin-Elmer CHNS/O Series II 2400) and pH was measured in solid:water 1:2.5 suspension with a 3 g sample. Distillation and titration to measure NH<sub>3</sub>-N (acid trap) were performed using FOSS Kjeltec 8100 and MS Tecnozon, respectively. Boric acid 4%, indicators metyl red and bromocresol green indicators, and hydrochloric acid 0.01 mol L<sup>-1</sup> were used in titration (Araújo et al., 2009).

Analyses of N<sub>2</sub>O concentrations were performed using a Perkin Elmer Auto System XL gas chromatograph equipped with an electron capture detector and a back-flush system with a Porapak Q GC column (Jantalia et al. 2012). Stable isotopes analysis ( $\delta^{15}\text{N}$ ) methodology was previously described in Chapter IV, section 3.3.

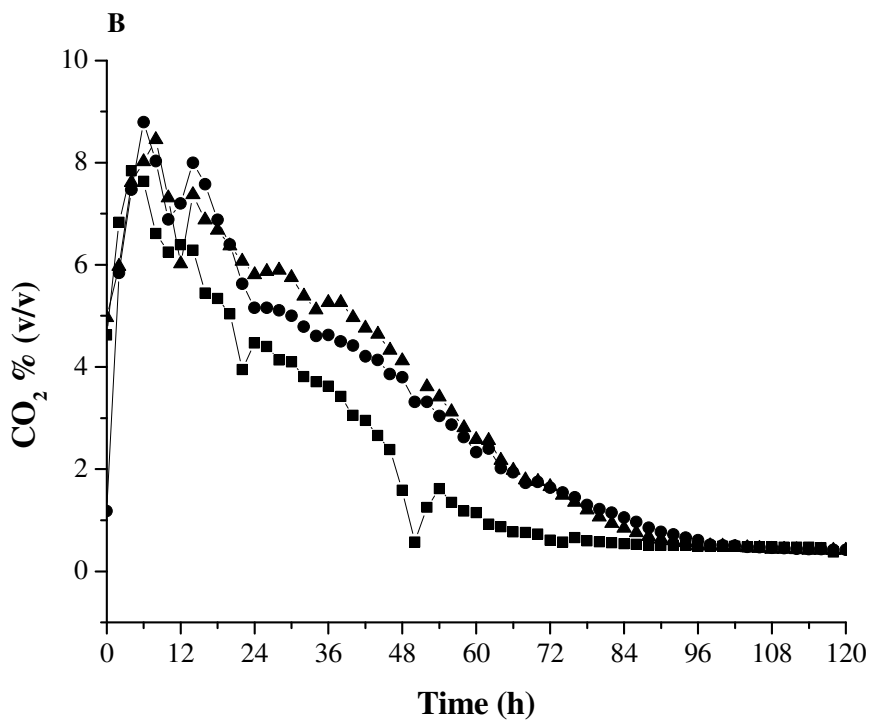
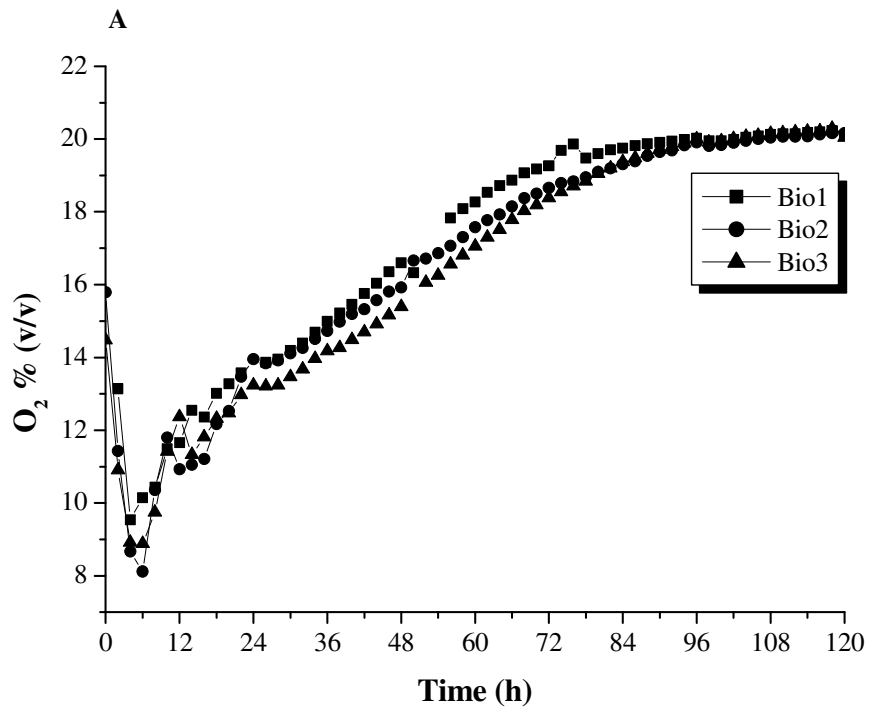
## 5 RESULTS AND DISCUSSION

### 5.1 N Loss (NH<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O) During Composting

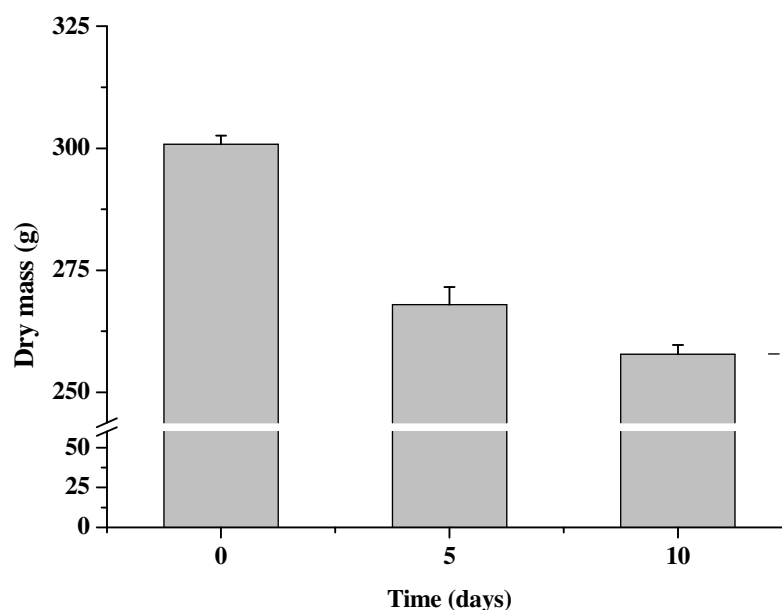
The three simultaneous composting runs showed typical temperature curves, with an exponential increase of temperature reaching 56.0 – 57.1 °C within 18 hours (h). Despite the similarity in temperature curves, bioreactor #1 had a faster temperature increase and a shorter thermophilic phase than the other two vessels (Fig.2.2A). Biological activity was intense and similar among replicates, but with slight differences. Oxygen (O<sub>2</sub>) consumption reached its peak at 40 °C (6 h) within a range of 8 to 10 % (Fig. 2.3A). O<sub>2</sub> consumption/CO<sub>2</sub> evolved data showed that the smaller biological activity coincided with the shorter thermophilic phase of bioreactor #1 (Fig.2.2 and Fig.2.3). After 10 days the organic material showed different visual and odor characteristics than the feedstock, and the lettuce leaves were totally decomposed. The loss of total dry mass was around 43.0 g ± 0.7 or 14.3 % ± 0.3 of the initial dry mass and the greater proportion of dry mass was lost in the first 5 days (Fig. 2.4).



**Figure 2.2** Temperature curves and sampling strategy of gas samples (A) and N<sub>2</sub>O emission results (B) of bench-scale composting of horse bedding manure and lettuce leaves.



**Figure 2.3.** Biological activity of bench-scale composting of horse bedding manure and lettuce leaves. Respirometry by in-line sensor of (A)  $O_2$  consumed and (B)  $CO_2$  evolved.

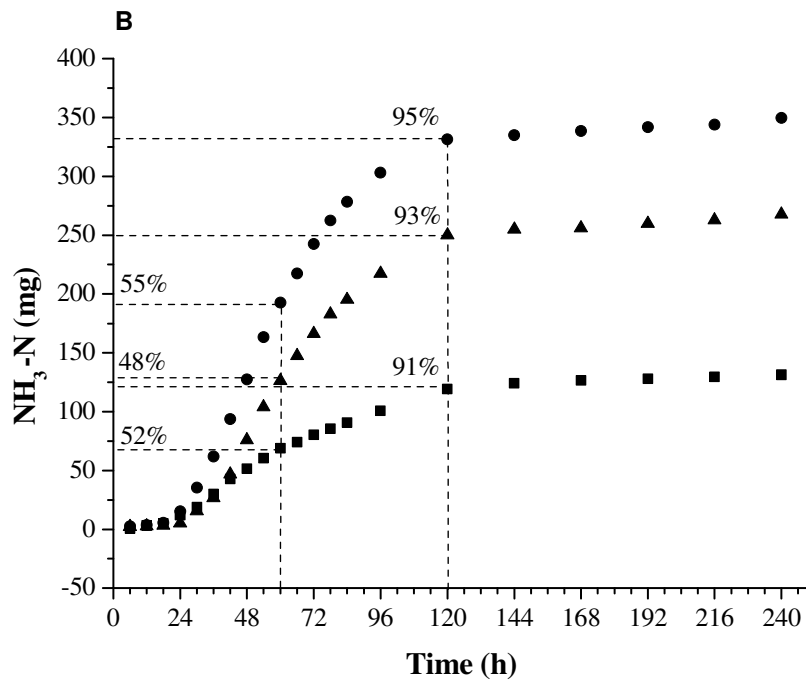
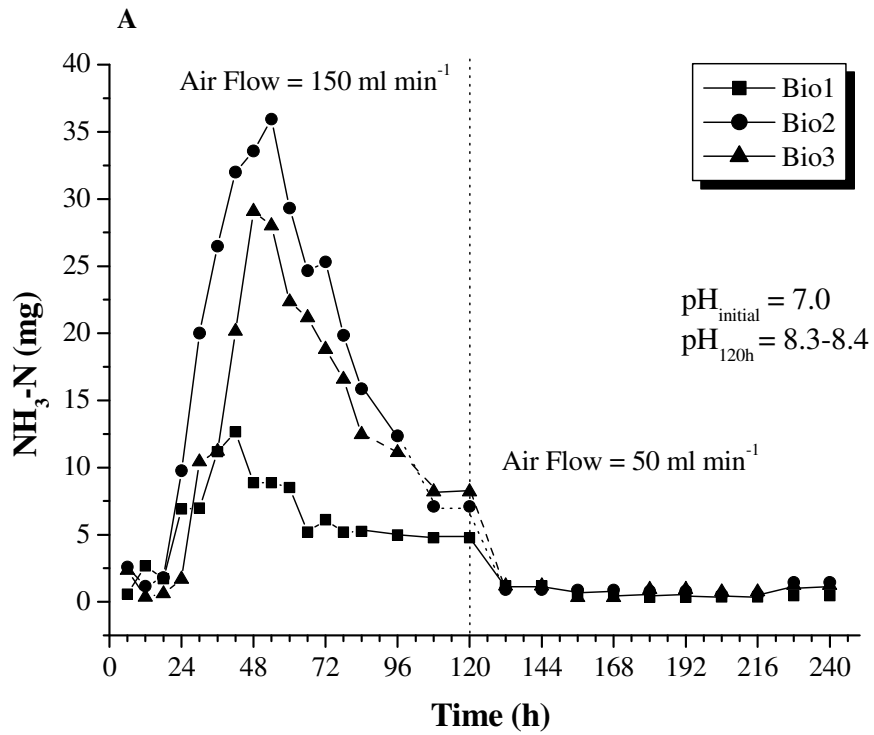


**Figure 2.4** Bars graph (mean and standard deviation) of dry matter (DM) loss during bench-scale composting of horse bedding manure + lettuce leaves ( $n = 3$ )

Nitrous oxide peak emission occurred much earlier (7 h) than peak ammonia volatilization during composting (48-60 h) (Fig. 2.2 and 2.5A). Nitrous oxide ( $N_2O$ ) emission was inversely related to  $O_2$  consumption and initial temperature increase (20 to 40 °C). The initial emission rate may be mainly related to the emission of  $N_2O$  previously formed, emission being favored by forced aeration. Rapidly increasing  $N_2O$  emission occurred at >40°C at the highest  $O_2$  consumption rate and the peak emission rate occurred just when the temperature reached 55 °C (Fig. 2.2B). Therefore, the peak  $N_2O$  concentration was probably due to denitrification of nitrite/nitrate produced by the biodegradation of organic material and dead microbial biomass. Bioreactor #3 showed a different emission pattern (Fig. 2.2B) for which there is presently no apparent explanation. Nitrite accumulation has been related to  $N_2O$  emissions during the mesophilic (maturation) phase (Fukumoto et al., 2011). However, this pattern of emission was not observed in our bench-scale experiment, most likely due to the aerobic conditions (aeration) or the absence of nitrite accumulation.

The  $NH_3$  volatilization curves were similar with rapidly increasing rates between 12 and 60h during the thermophilic stage (Fig. 2.5A), except for bioreactor #1. However, the cumulative amount of N- $NH_3$  trapped was different among replicates (Fig. 2.5B). This difference might be attributed to the different temperature curves (shorter thermophilic phase) and biological activity (lower  $O_2$  consumption/ $CO_2$  evolved), which was pronounced for bioreactor #1. Nevertheless, 50 and 90 % of the  $NH_3$  volatilized was measured around 60 and 120h for all replicates (Fig. 2.5B). The pH rose from 7 to 8.3-8.4 (Fig. 2.5A) which favors  $NH_3$  volatilization. The pH also varied consistently (7 to 7.2-7.3) during the initial thermophilic temperature increase (40-55 °C).





**Figure 2.5** Ammonia volatilization in bench-scale composting of horse bedding manure and lettuce leaves. (A) N-NH<sub>3</sub> volatilization rate (6h intervals), (B) Cumulative N-NH<sub>3</sub> losses.

The NH<sub>3</sub> volatilization peak rate occurred following the greater biological activity i.e. the peak O<sub>2</sub> consumed/CO<sub>2</sub> evolved which could coincide with greater ammonification, but immobilization of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> also occurs at this point affecting NH<sub>3</sub> volatilization (Sasaki et al., 2005). Therefore, the peak volatilization rate was at 55 °C (48-60 h) when pH was higher (>8) but thermophilic biological activity was less intense than the mesophilic biological activity (<40 °C). We hypothesize that most of the NH<sub>3</sub> volatilized came from the dead microbial biomass during the mesophilic/thermophilic temperature transition. However, the effect of temperature (>50 °C) on the diffusion coefficient of gases must be taken in account. The high pH drives the relatively high NH<sub>3</sub> volatilization during the mesophilic (maturation) phase and the reduced air flow (low O<sub>2</sub> demand) sharply reduced NH<sub>3</sub> volatilization during this stage.

According to the mass balance method on average 722.8 mg of N was lost during the composting process or 13 % of the initial N (Table 2.3). However, the maximum NH<sub>3</sub>-N trapped was 350.0 mg or 6 % of the initial N. Total N-NH<sub>3</sub> trapped on average was 35 % of N lost. Excluding bioreactor #1 trap as an outlier (Table 2.3), total N-NH<sub>3</sub> trapped on average reaches 45 % (309 mg) of N lost. The proportion of total N lost (13 %) found is within the range of reported data (1 to 21 %) for bench- and pilot-scale composting of agricultural wastes (Bernal et al., 1993; Fukumoto et al., 2011; Hu et al., 2011; Liang et al., 2006; Ren et al., 2010a). Only Kithone et al. (1999) reported NH<sub>3</sub>-N losses in a range of 24-31 % of initial N during the bench-scale composting of poultry manure. Higher N losses (2 to 56 % of initial N) have been reported for full-scale composting (DeLaune et al., 2004; Dias et al., 2010; Hassouna et al., 2008; Raviv et al., 2004), with the highest N loss for poultry manure composting.

Although NH<sub>3</sub>-N volatilization can account for up to 80 % of total N losses during composting, as previous discussed, we found an average of 35 to 45 % only. The magnitude of NH<sub>3</sub>-N volatilization (in composting or animal manure storage) appears to be strongly linked to the urinary- N (urea-N) content in the initial feedstock (e.g. animal manure) (Hristov et al., 2009; Lee et al., 2011). Reported data by these authors suggest the higher the urea-N content the higher the proportion of NH<sub>3</sub>-N volatilization in total N loss. However, the acid trap methodology efficiency should be considered carefully because recovery of NH<sub>3</sub>-N can be low when emissions are most intensive (Lee et al., 2011) and when the forced air rate is too high (e.g > 1.0 L min<sup>-1</sup>). On the other hand, nitrogenous gases other than NH<sub>3</sub>-N (e.g. specially N<sub>2</sub>) may account for up to 25% of N losses during (cattle) manure storage (Lee et al., 2011).

## 5.2 <sup>15</sup>N Fractionation During Composting

During the composting process there was a shifting in the δ<sup>15</sup>N of the compost due to the N losses. δ<sup>15</sup>N values increased about 2.1 to 2.4 ‰ in the first 120 h, and there was no significant (p < 0.005, ANOVA for δ<sup>15</sup>N mean values and Fisher mean test) shifting between 120 to 240 h, except for bioreactor #3 (Fig. 2.6). The higher shifting of δ<sup>15</sup>N mean values was 2.8 ‰ in bioreactor #3 between 0 to 240 h. Within the data set of 120 and 240 h two samples, one from bioreactor #1 and another from bioreactor #3 were identified as outliers (Mean ± 1.5xStandard Deviation) (Fig. 2.7A). The mean δ<sup>15</sup>N values and the confidence intervals of mean (95%) are shown in Fig. 2.7B. More than 90% of the total NH<sub>3</sub>-N volatilized during the composting process was trapped between 0 and 120 h (Fig. 2.5B), which coincides with the large shifting in the δ<sup>15</sup>N values (Fig. 2.7B).

**Table 2.3** Variations of dry matter (DM), carbon (C) and nitrogen (N), and N loss estimates during bench-scale composting of horse bedding manure and lettuce leaves.

Parameter <sup>a</sup>	Time <sup>b</sup>	Unit	Bioreactors <sup>c</sup>			Means <sup>d</sup>
			#1	#2	#3	
DM	Initial	g	302.9	299.6	300.0	300.8 ±1.8
	Final	g	259.9	257.3	256.3	257.8 ±1.9
C	Initial	g kg <sup>-1</sup>				404.7 ±4.4
	Final	g kg <sup>-1</sup>	381.9 ±6.6	369.6 ±5.6	369.2 ±2.9	372.1 ±6.8
N	Initial	g kg <sup>-1</sup>				18.6 ±1.1
	Final	g kg <sup>-1</sup>	18.4 <sup>e</sup>	18.4 ±1.1	19.7 ±0.5	18.9 ±1.1
C:N	Initial					21.8
	Final		20.8	20.1	18.7	19.7
C <sub>total</sub>	Initial	g	122.6	121.2	121.4	121.7
	Final	g	99.3	95.1	94.6	95.9
C <sub>loss</sub>		g	23.3	26.2	26.8	25.8
C <sub>loss</sub> /C <sub>total</sub>		%	19	22	22	21
N <sub>total</sub>	Initial	mg	5,634	5,573	5,580	5,596
	Final	mg	4,782	4,734	5,049	4,873
N <sub>lost</sub> <sup>b</sup>		mg	851.6	838.6	531.7	722.8
N-NH <sub>3</sub> <sup>a</sup>		mg	132	350	268	250 ±110
N <sub>lost</sub> /N <sub>total</sub>		%	15	15	10	13
N-NH <sub>3</sub> /N <sub>total</sub>		%	2	6	5	5

Note: mean ± standard deviation

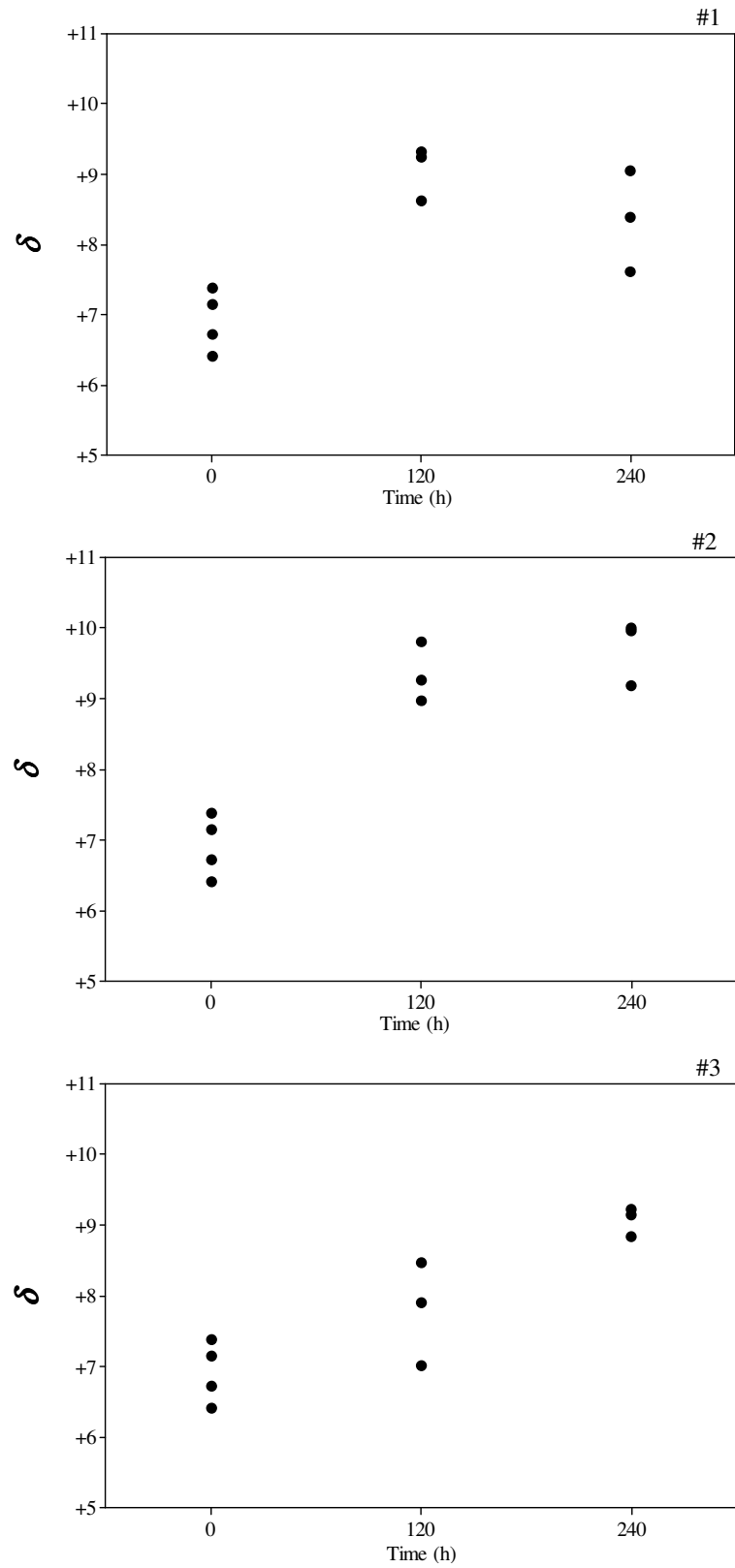
a N<sub>lost</sub>, total N lost according to mass balance; N-NH<sub>3</sub>, amount of N volatilized as ammonia and trapped in acid solution

b 0 - 240 hours

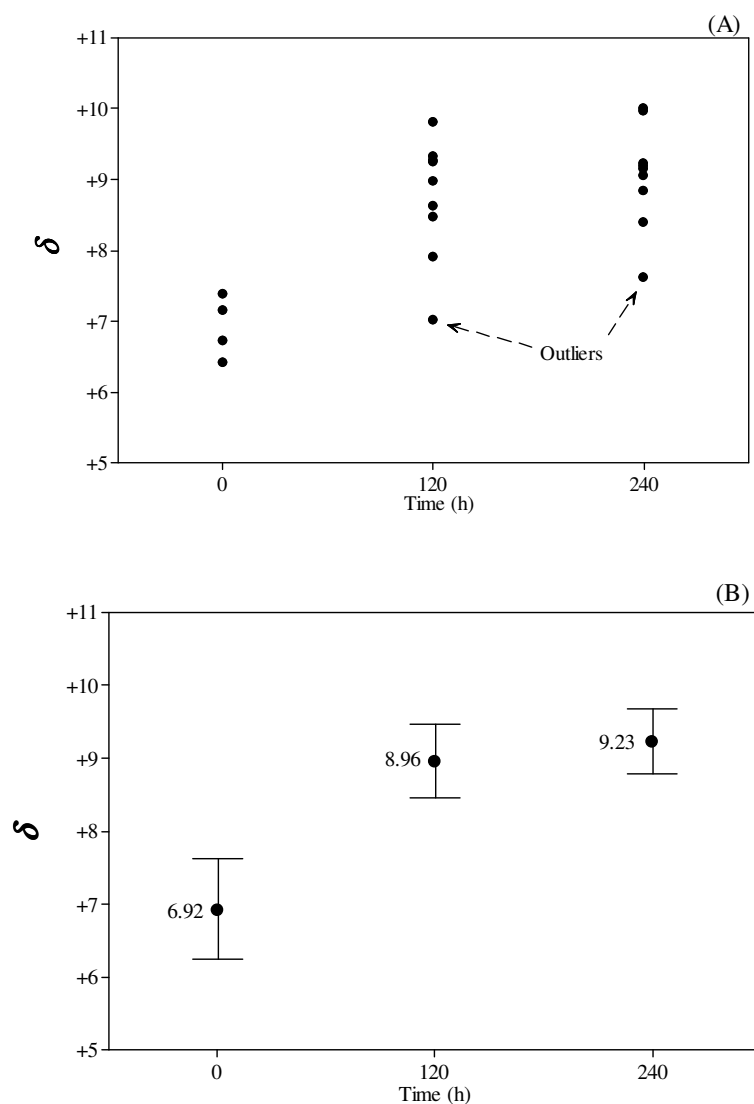
c 3.0 L vessels with forced aeration and temperature control

d DM and N-NH<sub>3</sub> are means of the three bioreactors results; C and N are means of all samples excluding one outlier; C:N, C<sub>total</sub>, C<sub>loss</sub>, N<sub>total</sub> and N<sub>lost</sub> were calculate using C, N and DM values of the Means column.

e One outlier (Mean ± 1.5xSD) was removed.



**Figure 2.6** Shifting of  $\delta^{5N} / \text{‰}$  during bench-scale composting of horse bedding manure + lettuce leaves. Dispersion of  $\delta$  values of the organic matter, sampling in time 0, 120 and 240 hours. Bioreactors #1, #2 and #3 are replicates.



**Figure 2.7** Shifting of  $\delta^{15}\text{N}$  / ‰ during bench-scale composting of horse bedding manure + lettuce leaves. (A) Dispersion of  $\delta$  values of the organic matter, sampling in time 0, 120 and 240 hours, grouping of three replicates (bioreactors). (B) Means and bars of the confidence interval (95%) of means of  $\delta$  values. Outliers, Mean  $\pm 1.5 \times$  Standard Deviation within the each data set of time.

We found a ratio between the total N lost and the shifting of  $\delta^{15}\text{N}$  values ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) of organic matter (solid samples) during bench-scale composting (Table 2.4)

**Table 2.4** Ratio between the total N loss and the shifting of  $\delta^{15}\text{N}$  values ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) of organic matter during bench-scale composting of horse bedding manure and lettuce leaves.

$\text{N}_{\text{lost}} / \text{mg}^{\text{a}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{initial}} / \text{‰}^{\text{b}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} / \text{‰}^{\text{b}}$	$\Delta^{15}\text{N} / \text{‰}^{\text{c}}$	Coefficient $b^{\text{d}}$
722.8	6.92	9.23	2.31	0.0032

<sup>a</sup> Mean of three bioreactors

<sup>b</sup> Mean of the three bioreactors

<sup>c</sup>  $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{initial}}$

<sup>d</sup>  $\Delta^{15}\text{N} / \text{N-NH}_3, \text{‰ mg}^{-1}$

Therefore, considering the values from Table 2.4, the ratio between total N lost (g) and the shifting in  $\delta^{15}\text{N}$  values ( $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{initial}}$ ) can be express by the equations below (Eq. 4.1 and 4.2):

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} = 6.9 + 0.0032 \times \text{N}_{\text{lost}}, \quad (4.1)$$

or

$$\text{N}_{\text{lost}} = (6.9 - \delta^{15}\text{N}_{\text{final}})/0.0032 \quad (4.2)$$

or

$$\text{N}_{\text{lost}} = (\Delta^{15}\text{N})/b \quad (4.3)$$

Therefore, the total N lost during the composting process can be estimated by  $\Delta^{15}\text{N}$  ( $=\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{initial}}$ ) between the initial feedstock and the end product, using Equation 4.2. However, the variability of experimental data exerts a degree of uncertainty to the estimates. The uncertainty of the estimate was calculated combining the confidence intervals of means  $\delta^{15}\text{N}$  (Fig. 2.7B). Thus, between 0 and 240 h we have  $\delta^{15}\text{N}_{0\text{h}}$  mean equal 6.92 ‰ and CI (95%) from 6.23 to 7.61 ‰, and  $\delta^{15}\text{N}_{240\text{h}}$  mean equal 9.23 ‰ and CI (95%) from 8.78 to 9.68 ‰. All combinations ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{initial}}$ ) of these  $\delta^{15}\text{N}$  values yield nine possible values for  $\Delta^{15}\text{N}$  / ‰, which were divided by 722.8 g of N (Table 2.4) yielding a confidence interval of mean (95%) for the coefficient  $b$  between 0.0024 and 0.0039 ( $\Delta^{15}\text{N} / \text{N-NH}_3$ , ‰  $\text{mg}^{-1}$ ). Therefore, the total N loss during the composting experiment would be estimate from 592 to 962 mg with 95% of confidence (Table 2.5).

**Table 2.5** Estimative of total N loss during composting process according to confidence interval (95%) of  $b$  values for the relationship found between total N loss and  $\delta^{15}\text{N}$  values.

$\delta^{15}\text{N}_{\text{final}} (\Delta^{15}\text{N}) / \text{‰}^a$	Coefficient $b^b$	Equation	$\text{N}_{\text{lost}} / \text{mg}$	$\text{N}_{\text{lost}} / \text{N}_{\text{total}} \text{‰}^c$
	0.0024		962	17.2
9.23 (2.31)	0.0032	$\text{N}_{\text{lost}} = \Delta^{15}\text{N}/b$	722	12.9
	0.0039		592	10.6

<sup>a</sup>  $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{final}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{initial}}$

<sup>b</sup>  $b = \Delta^{15}\text{N} / \text{N}_{\text{lost}}$ , IC 95% of the mean

<sup>c</sup>  $\text{N total} = 5,596 \text{ mg}$

Using the equation to calculate the amount of N lost between 0 – 120 h ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{mean}} = 2.04$ ) it yields 637 mg of N which is 88% of the mean of total N lost. Considering that around 91 to 95 % of the  $\text{N-NH}_3$  was measured within 0 – 120 h (Fig. 2.5), the experimental relationship between  $\delta^{15}\text{N}$  variation of compost and the total N loss was satisfactory and the coefficient obtained was corrected. Additionally, the coefficient of variation found for total N loss (28 %) using mass balance (Table 2.3) was similar to the variation of the estimates using  $\delta^{15}\text{N}$  values (25 %) (Table 2.5).

For general use Equation 4.3 can be written as follow:

$$N_{\text{lost}} = \Delta^{15}\text{N}/0.96 \quad (4.4)$$

Where  $N_{\text{lost}}$  is the amount of N loss in mg per g of DM ( $\text{mg g}^{-1}$  or  $\text{g kg}^{-1}$ ), and coefficient  $b$  is  $[0.0037 \times 300.8 \text{ g}] = 0.96$  (0.72 to 1.17). Where 300.8 g is the average DM contained in each bioreactor.

For example, a 3 ‰ increase in a 300 kg DM compost pile of manure with N content equal  $2.0 \text{ g kg}^{-1}$  corresponds to estimate of N loss equal to 936 g (767 – 1247 g) or 15.6 % (12.8 – 20.8 ‰) of initial N, according to Equation 4.4 and the uncertainty of coefficient  $b$  reported in Table 2.5.

In a similar experiment, Hristov et al. (2009) incubated 300 g (DM) of cattle manure (85% of moisture) during 14 days and found cumulative  $\text{NH}_3\text{-N}$  losses increasing exponentially ( $r^2 = 0.98$ ) to an average of 447 mg ( $n = 8$ ), and the  $\delta^{15}\text{N}$  of manure increasing quadratically ( $r^2 = 0.96$ ) from +4.5 to +7.5 ‰, approximately. These patterns were different from the sigmoid fashion cumulative  $\text{NH}_3\text{-N}$  losses (Fig. 2.5) and  $\delta^{15}\text{N}$  variation (Fig. 2.7) found in our bench-scale composting. Also, the cumulative  $\text{NH}_3\text{-N}$  losses and the  $\delta^{15}\text{N}$  variation were slightly greater than our findings (Table 2.3 and 2.4), however, the ratio  $\delta^{15}\text{N}$ :cumulative ammonia losses was similar. The different patterns of variation found by Hristov et al. (2009) may result from a more constant  $\text{NH}_3$  volatilization and denitrification process ( $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emission) during cattle manure incubation than in the bench-scale composting carried out, which had more intense  $\text{NH}_3$  volatilization and  $\text{N}_2\text{O}$  emission in the first 3 days (Fig. 2.2 and 2.5). In two similar experiments, Lee et al. (2011) found intense  $\text{NH}_3\text{-N}$  losses in the first 5 days of cattle manure incubation which coincides with rapid increasing in  $\delta^{15}\text{N}$  of manure. However,  $\delta^{15}\text{N}$  values reached a plateau after 5 days, showing the same pattern found in the bench-scale composting and different from Hristov et al. (2009) findings. Lee et al. (2011) also found a ratio between  $\delta^{15}\text{N}$ :Total N loss (around 0.003), similar to our finding (Table 2.5).

Manure N and especially urea-N are major factors determining  $\text{NH}_3\text{-N}$  losses. Urinary N is the principal source of  $\text{NH}_3\text{-N}$  volatilized from cattle manure accounting for an average of 90% of the emitted  $\text{NH}_3\text{-N}$  in the first days (Lee et al. (2011). Horse bedding manure had a lower N content than cattle manure (1.8 to 1.9 % vs. 5.0 to 7.0 % of DM, respectively), and, in the case of those experiments, also may have lower urea-N content. The initial  $\delta^{15}\text{N}$  values of the horse bedding manure (+7.0 ‰) and the cattle manure (-1.1 to 0.1 ‰, Lee et al., 2011; and +4.5 ‰, Hristov et al., 2009) may be evidence of N losses (mostly urinary N) before the use of the first in the bench-scale composting. However, the  $\delta^{15}\text{N}$  value of the animal diet is unknown for horse manure which is the relevant factor to determine the  $\delta^{15}\text{N}$  of animal excreta. The lower initial  $\delta^{15}\text{N}$  values of cattle manure is also evidence of higher urea-N content which is highly depleted in  $^{15}\text{N}$  (Lee et al., 2011; Hristov et al., 2009). The different urinary N content in the cattle manures could be an important source of difference in the emissions patterns, but  $\text{NH}_3\text{-N}$  volatilization is also affected by temperature and air flow rate which were different among the experiments referred here.

Lee et al. (2011) states that the variation on the  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) values (e.g.  $-22.5 \pm 0.7$  at day 1, to  $-16.5 \pm 0.1$  at day 5, and  $-1.3 \pm 2.6$  at day 20) of depleted ammonia volatilized (sigmoid fashion pattern) during cattle manure incubation is a complicated factor for the usefulness of  $\delta^{15}\text{N}$  values of manure storage to estimate N or ammonia losses in field

conditions. This statement can be extended to a full-scale composting process. However, uncertainty due to the lack of linearity between  $\delta^{15}\text{N}$  values and N loss in the last stage of composting (Lee et al., 2011) may be ignored because ammonia volatilization and nitrous oxide emissions occurred mostly in the first days of the process. This statement is supported by the pattern of  $\delta^{15}\text{N}$  values during composting (Fig. 2.7).

## 6 CONCLUSIONS

We propose that the use of the shifting of  $\delta^{15}\text{N}$  values during composting can be used as well as mass balance to estimate N loss. However, the uncertainties on both N loss mass balance and  $\delta^{15}\text{N}$  values remain high and more experimental trials using more replicates and a careful sampling plan should be carried out to improve the accuracy of estimates. Despite these findings, the  $\delta^{15}\text{N}$  variations during composting still need more experimental data considering different scales and feedstocks (e.g. manures and plant residues).

$\text{NH}_3$  volatilization and  $\text{N}_2\text{O}$  emission occurred during the thermophilic phase of bench-scale composting as expected. However, an unexpectedly high variation of accumulated N losses was found among replicates. Differences in temperature curves and accumulated  $\text{NH}_3\text{-N}$  were related to the biological activity in each vessel. Therefore,  $\text{O}_2$  consumed/ $\text{CO}_2$  evolved measurements were a useful parameter for evaluation of the composting process, which should be part of further studies for comparisons of techniques to reduce  $\text{NH}_3$  volatilization during composting. The N loss ( $\text{NH}_3$  and  $\text{N}_2\text{O}$ ) patterns found suggest that  $\text{NH}_3$  volatilization and denitrification were the two main isotopic fractionation processes to drive the large shifting in the  $\delta^{15}\text{N}$  values during the thermophilic phase.



## **CAPÍTULO III**

### **ISOTOPE ABUNDANCE ( $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ) OF ORGANIC AND ORGANO-MINERAL FERTILIZERS**

Published in:

INÁCIO, C.T., URQUIAGA, S., CHALK, P.M. Nitrogen and Carbon Isotope Composition of Organic Fertilizers. Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. v.4. Florianópolis, Maio, 2013.

## 1 RESUMO

Fertilizantes sintéticos e orgânicos diferem acentuadamente quanto a composição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , e quanto maior a diferença entre o fertilizante sintético e o orgânico mais robusta será a diferenciação de hortaliças e outros cultivos em diferentes sistemas de produção. O objetivo deste estudo foi comparar a composição isotópica de nitrogênio e carbono dos fertilizantes orgânicos e esterco disponíveis para agricultura orgânica e convencional no Brasil. Sete amostras de fertilizantes orgânicos, duas de fertilizantes organominerais e duas de diferentes esterco de animais (frango e cavalos) foram analisadas para a composição isotópica de nitrogênio e carbono ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ). Fertilizantes orgânicos e esterco se mostraram enriquecidos em  $\delta^{15}\text{N}$  como esperado (+2.5 a 14.8 ‰). O uso de fertilizantes sintéticos como um dos constituintes do fertilizante organomineral pode imprimir valores baixos de  $\delta^{15}\text{N}$  no produto final (p.ex. +0.6 ‰). Fertilizantes orgânicos, organominerais e esterco podem ter seus materiais de origem orgânicos diferenciados usando  $\delta^{13}\text{C}$ . Estes são dados preliminares da composição isotópica de fertilizantes orgânicos no Brasil. Portanto, um levantamento mais amplo dos fertilizantes e uma abordagem experimental para a produção de fertilizantes orgânicos e organominerais é necessária para elucidar a variação isotópica natural da variedade de produtos disponíveis.

**Palavras-chave:**  $\delta^{15}\text{N}$ .  $\delta^{13}\text{C}$ . Variação isotópica natural.

## 2 ABSTRACT

Synthetic and organic fertilizers differed markedly in N isotopic composition and the greater the difference between organic and synthetic fertilizer the more robust will be the differentiation of crops and vegetables grown under different farming systems. The objective of this study was to compare nitrogen and carbon isotopic composition of organic fertilizers and manures available for conventional and organic farming in Brazil. Seven samples of organic fertilizer, two of organo-mineral fertilizers and two of different animal manures were analyzed for nitrogen and carbon isotopic composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ). Organic fertilizers and manure samples were enriched in  $\delta^{15}\text{N}$  as expected (+2.5 to 14.8 ‰). Using synthetic fertilizers as the primary material of organo-mineral fertilizer can imprint a low  $\delta^{15}\text{N}$  value on the final product (e.g. +0.6 ‰). Organic fertilizers, organo-mineral fertilizers and manures can have their organic feedstock differentiated using  $\delta^{13}\text{C}$ . These are preliminary data of the isotopic composition of organic fertilizers in Brazil. Therefore, a wider survey of fertilizers and an experimental approach for organic- and organo-mineral fertilizer production is needed to elucidate the natural isotopic variation of the array of available products.

**Keywords:**  $\delta^{15}\text{N}$ .  $\delta^{13}\text{C}$ . Natural isotopic variation.

### 3 INTRODUCTION

Stable isotope analysis of fertilizers has been identified as a tool for environmental studies (Vitòria et al., 2004) and for studies of nitrogen (N) dynamics in the soil-plant-atmosphere continuum (Chalk et al., 2013). Special attention has been given to the potential application of N isotope analysis in discriminating between organic and conventional plant products (Inácio et al., 2015a). Synthetic (e.g. urea) and organic fertilizers (e.g. compost) differed markedly in N isotope composition (Bateman; Kelly, 2007). The greater the difference between organic and synthetic fertilizer the more robust will be the differentiation of crops and vegetable grown under different farming systems.

Synthetic N fertilizers (ammonium salts and urea) are derived from ammonia ( $\text{NH}_3$ ) produced by the Haber-Bosch process, which involves the catalytic reduction of atmospheric  $\text{N}_2$  at high temperature and pressure by  $\text{H}_2$  derived from methane or natural gas. Therefore the  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of synthetic fertilizers are expected to be close to that of atmospheric  $\text{N}_2$  (0 ‰ by definition). Synthetic N fertilizers have slightly positive or negative  $\delta^{15}\text{N}$  values within the range of  $-3.9$  to  $+5.9$  ‰ (Inácio et al., 2015a).

Organic N fertilizers are generally naturally enriched in the stable isotope  $^{15}\text{N}$  compared with synthetic N fertilizers. Total N in manures and composts varies within the range of  $\delta^{15}\text{N}$  of  $+2.0$  to  $+16.7$  and  $+4.9$  to  $+45.2$  ‰, respectively (Inácio et al., 2015a). However,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in compost may have different signatures due to the isotopic fractionation during composting. For instance, Yun and Ro (2009) showed  $\delta^{15}\text{N}$  values for N-organic,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , equal  $+16,2$ ,  $+22,4$  e  $+16,5$  ‰, respectively, from a pig manure and sawdust compost.

Plants show the nitrogen isotope composition from the N source, and degradation of plant residues causes discrimination of  $^{15}\text{N}$  resulting in variation of isotope composition of the product i.e. soil N moieties. Carbon isotope composition of organic fertilizers and manure is a potential tool to determine the identity of the organic source material (C3 and C4 plant sources have markedly different carbon isotope composition) and to study post-application organic fertilizer degradation in soil. The objective of this study was to compare the nitrogen and carbon isotope composition of organic fertilizers and manures available for conventional and organic farming in Brazil.

### 4 MATERIAL AND METHODS

Commercial organic fertilizer samples were sent by manufacturers from São Paulo State to Embrapa. Three out of nine brands received were certified for organic farming and two brands were a mix of synthetic fertilizer with organic material, and most products were from a composting process. Information was given by manufacturers. Horse manure sample were obtained from Teresópolis, in Rio de Janeiro State, and poultry litter sample from Rio Verde, in Goiás State, Brazil. These manures have been used as organic amendments by farmers. Horse bedding manure has been used by conventional vegetable growers and organic certified growers to make compost. Poultry litter is one of the most available organic amendments in Brazil, and is a source to organic fertilizer manufacturing by composting or

themo-physical process.

Samples were dried at 60°C and homogenized and milled to a fine powder in a ball mill. Total nitrogen and total carbon of samples were determined by an elemental combustion analyzer (Perkin-Elmer CHNS/O Series II 2400). Dried samples were weighed into tin capsules, and internal laboratory reference material and samples matched to give 40 µg N (±5%) per isotope composition analysis. The isotope ratio analysis was performed in an isotope ratio mass spectrometer (Delta Plus, Thermo/Finnigan) coupled to an elemental analyzer for carbon and nitrogen (ECS 4010, Costech Instruments) by the John Day Laboratory, Embrapa Agrobiologia, located at Seropédica, RJ, Brazil. Samples were analyzed in triplicate.

The relative isotopic composition of nitrogen is

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = 1000 \left[ \left( \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}}_{\text{sample}} - \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}}_{\text{standard}} \right) / \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}}_{\text{standard}} \right]$$

where the international standard is atmospheric N<sub>2</sub> ( $\delta^{15}\text{N} = 0 \text{ ‰}$ , by definition). The delta value can be either negative or positive depending whether it is depleted or enriched in <sup>15</sup>N relative to the standard. The same units of isotopic composition apply to carbon, i.e. atom % <sup>13</sup>C or  $\delta^{13}\text{C} (\text{‰})$ . The international standard for carbon is V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite). Internal laboratory reference material gave N = 1.96 ‰;  $\delta^{15}\text{N} = +4.5 \text{ ‰}$ ; C = 39.73 ‰;  $\delta^{13}\text{C} = -24.99 \text{ ‰}$ .

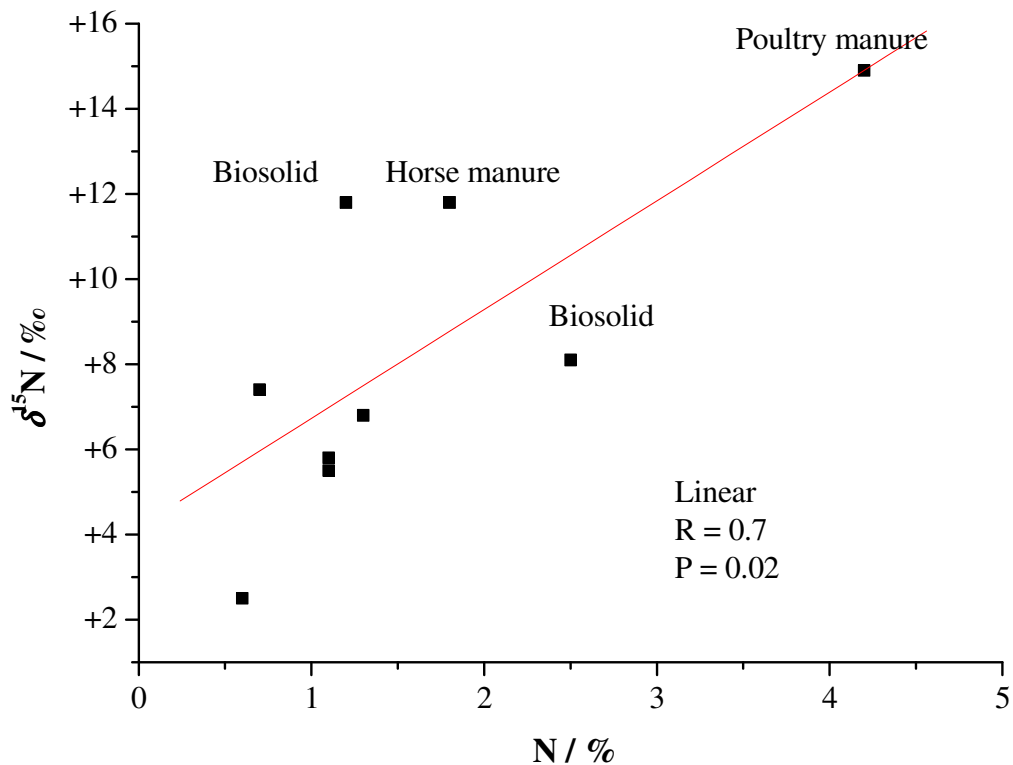
## 5 RESULTS AND DISCUSSION

Results of N and C total content and  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values of samples analyzed are reported in Table 3.1. Total N contents of manufactured organic fertilizers were low (<3 ‰), and only organo-mineral fertilizers which have ammonium sulfate in the mixture show higher N content (>3 ‰). Poultry manures show the N content as high as organo-mineral fertilizers (Fig. 3.3). Total carbon content shows a wide range between the samples. However, carbon content below or near 10 ‰ was shown by products with rock powder as a component of the mixture. The highest carbon content (>30 ‰) was shown by manures. C:N ratio around 20 or less is expected for organic fertilizer, however, one sample shows a high C:N ratio (45) which is undesirable for organic fertilizers.

Delta nitrogen-15 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) values of the samples show natural enrichment (positive values) of the organic fertilizers and manures, except the one organo-mineral fertilizer (Table 2.1). This natural enrichment may be attributed to two main factors: (i) N loss during organic material storage, mainly manures which are susceptible to ammonia volatilization, (ii) N loss during the composting process, mainly as ammonia (Chalk et al., 2013). Ammonia volatilization has a high discrimination factor of <sup>15</sup>N in the N cycle (Robinson, 2001); therefore, ammonia volatilized, e.g. from stored manure, is depleted in <sup>15</sup>N (Lee et al., 2011). There is a highly significant positive linear relationship between cumulative ammonia loss and the  $\delta^{15}\text{N}$  value of stored manure over the range of +4 to +8 ‰ (Hristov et al., 2009).

**Tabela 3.1.** Total nitrogen and carbon and isotope abundance of organic fertilizers and animal manures.

	<b>Fertilizer</b>	<b>Source</b>	<b>N / %</b>	<b>C / %</b>	<b>C:N</b>	<b><math>\delta^{15}\text{N} / \text{‰}</math></b>	<b><math>\delta^{13}\text{C} / \text{‰}</math></b>
F1	Organic	Not informed	0.6 ±0.0	27.0 ±0.7	45.0	+2.5 ±0.1	-27,8 ±0.1
F2	Organic		1.1 ±0.0	12.3 ±0.2	11.2	+5.5 ±0.4	-22,5 ±0.1
F3	Organic-mineral	Sugarcane bagasse + phosphate rock + composting	0.7 ±0.0	6.3 ±0.1	9.0	+7.4 ±0.0	-14,0 ±0.0
F4	Organic-mineral	Sugarcane mil cake and bagasse + ash + phosphate rock + composting	1.3 ±0.0	11.5 ±0.1	8.8	+6.8 ±0.0	-13,6 ±0.0
F5	Organic	Peat	1.1 ±0.1	20.9 ±0.5	19.0	+5.8 ±0.6	-17,2 ±0.2
F6	Organo-mineral	Peat + ammonium sulfate + potassium chloride	5.2 ±0.1	5.8 ±0.3	1.1	+0.3 ±0.0	-18.3 ±0.1
F7	Organo-mineral	Sugarcane mil cake + phosphate rock + ammonium sulfate + potassium chloride + composting	3.6 ±0.1	4.8 ±0.1	1.3	+6.3 ±0.3	-14,5 ±0.1
F8	Organic	Biosolid	1.2 ±0.0	16.4 ±0.1	13.7	+11.8 ±0.5	-19.1 ±0.3
F9	Organic	Biosolid +composting	2.5 ±0.1	27.7 ±0.8	11.8	+8.1 ±0.1	-25.8 ±0.4
F10	Manure	Horse bedding manure	1.8 ±0.1	44.5 ±0.7	24.7	+11.8 ±0.2	-27.5 ±0.1
F11	Manure	Poultry manure	4.2 ±0.2	31.5 ±1.1	7.5	+14.9 ±0.3	-15.5 ±0.6

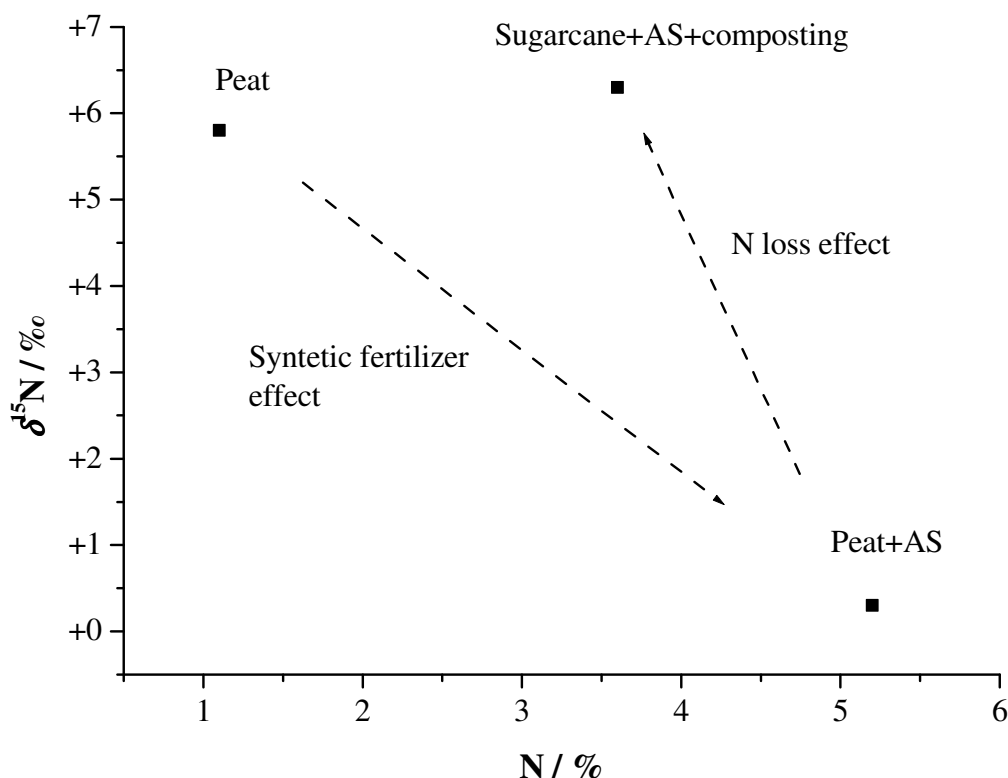


**Figura 3.1.** N total / % e  $\delta^{15}\text{N} / \text{‰}$  of organic fertilizers and manures.

Similarly, Kim et al. (2008), observed an increase in the  $\delta^{15}\text{N}$  values of cattle manure composted with sawdust (from +11.4 to +15.6 ‰) and cattle manure composted with rice hulls (from +7.6 to +11.0 ‰). Kim et al. (2008) attributed the discrimination to N loss by ammonia volatilization and nitrification, in the early stage of the thermophilic phase of composting, and denitrification of nitrate in the latter stage. Bateman and Kelly (2007) reported values between +3.5 to +16.2 ‰ for farmyard manure, compost and chicken manure. These results were similar to ours. However,  $\delta^{15}\text{N}$  values of chicken manure were lower (+4.8 to +8.4 ‰) than the value found for poultry litter (+14.9 ‰) which suggests a greater N loss. Lim et al. (2010) reported  $\delta^{15}\text{N}$  values of manure in the range of +5.3 to 7.2 ‰ and cattle manure composts in the range of +9.3 to +20.9 ‰.

Bateman and Kelly (2007) also reported synthetic fertilizers (urea, ammonium salts, nitrates)  $\delta^{15}\text{N}$  values in the range of -2.4 to +2.1, and extreme values of -5.9 and +6.6 ‰ for one urea sample and one ammonium sulfate sample, respectively. Similar ranges of  $\delta^{15}\text{N}$  values (-1.7 to +3.9 ‰) for synthetic fertilizers used in Spain was reported by Vitòria et al. (2004). Lim et al. (2010) reported synthetic fertilizers  $\delta^{15}\text{N}$  ranged from -3.8 to +0.5 ‰. Therefore, synthetic fertilizers have  $\delta^{15}\text{N}$  slightly depleted or enriched in relation to atmospheric  $\text{N}_2$  ( $\delta^{15}\text{N} = 0$  ‰).

The use of ammonium sulfate to increase the N content of organo-mineral fertilizer may explain the  $\delta^{15}\text{N} = +0.3$  found in sample F6 (Fig. 3.2). Bateman and Kelly (2007) reported ammonium sulfate  $\delta^{15}\text{N}$  values in the range of -1.2 to 0.8 ‰, for example. However, although ammonium sulfate was present in sample F7,  $\delta^{15}\text{N}$  was +6.3 ‰. There are three hypotheses for this contrasting result: (i) the composting process may explain the enrichment of  $\delta^{15}\text{N}$  values. If the N loss was not controlled during the composting process, it would have led to an increase in the  $\delta^{15}\text{N}$  of the product. The low N content of the organo-mineral + composting may constitute support this hypothesis; (ii) the  $\delta^{15}\text{N}$  of the feedstock is being expressed over the synthetic fertilizer. Sample F3 also had sugarcane mill cake as feedstock and shows a close  $\delta^{15}\text{N}$  (+6.8 ‰) to sample F7 (+6.3 ‰). However, the proportional content of different materials was not informed by the manufacturers; (iii) the ammonium sulfate used to compound product F7 has a high  $\delta^{15}\text{N}$ , being not the same straight fertilizer present in sample F6. Although, the first hypothesis seems more likely than others, it would be necessary to know the  $\delta^{15}\text{N}$  values of all singles components of organic- and organo-mineral fertilizer and their mixtures to draw a conclusion.

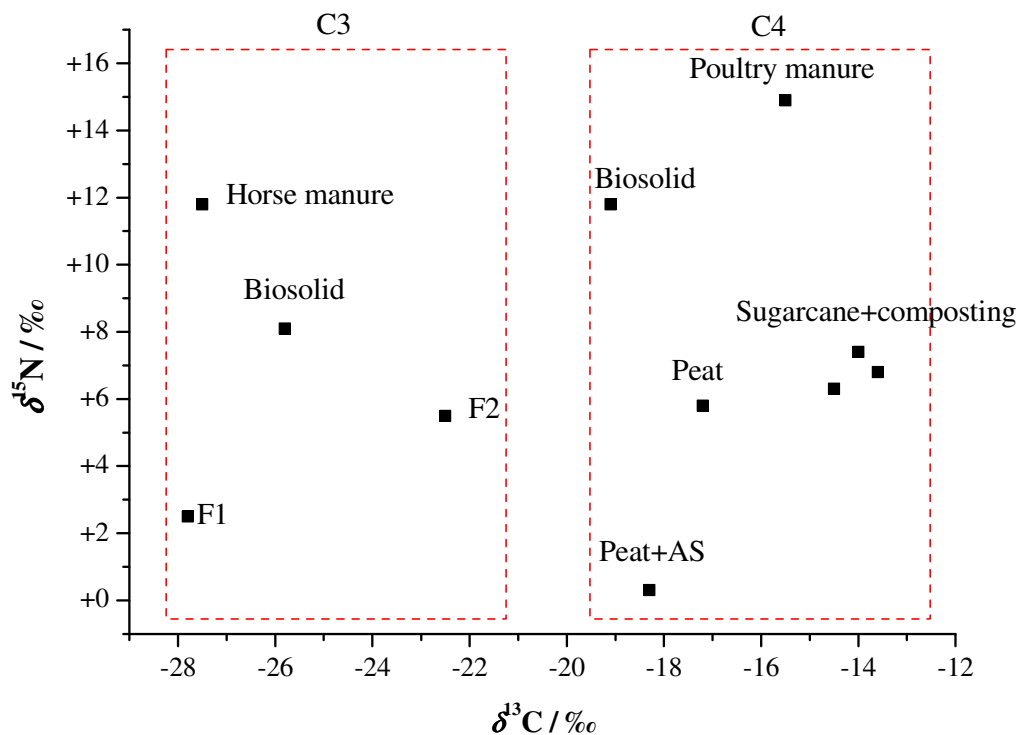


**Figure 3.2.** N total / % e  $\delta^{15}\text{N} / \text{‰}$  of organo-mineral fertilizers and peat.

Delta nitrogen-15 values of organic- and organo-mineral fertilizers and manures also show an overlapping between fertilizer certified or permitted and organic fertilizer not permitted by organic farming standards. Besides organo-mineral sample F6 the two bio-solids (F10 and F11) show  $\delta^{15}\text{N}$  values within the range found for organic fertilizers and manures. However, the use of bio-solids is not allowed by organic farming standards as well as synthetic fertilizers.

Organic fertilizers and manures can have specific carbon isotope compositions ( $\delta^{13}\text{C}$ ) depending on the origin of the feedstock or the animal diet e.g.  $\delta^{13}\text{C}$  around  $-12.0 \text{‰}$  and  $-26.0 \text{‰}$  for crop residues having the C4 and C3 photosynthetic pathways, respectively. Our data show that it is possible to distinguish the use of C4 feedstock such as sugarcane residues to manufacturing the organic- or organo-mineral fertilizer. Samples of organic fertilizers which contain sugarcane residues showed  $\delta^{13}\text{C}$  ranging from  $-13.6$  to  $-14.5 \text{‰}$ . Poultry litter also shows a  $\delta^{13}\text{C}$  value ( $-15.5 \text{‰}$ ) which suggests that the animals were corn fed (C4 plant). And/or the presence of *Brachiaria* (C4 pasture) as bedding material. *Brachiaria* is a widespread C4 pasture in Brazil. In contrast, horse bedding manure sample shows a typical C3 signature ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Intermediate  $\delta^{13}\text{C}$  values of organic fertilizers may be result of a mixture of C3 and C4 source materials (Fig.3.3).





**Figura 3.3.** Isotope abundance of <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C ( $\delta / \text{‰}$ ) of organic and organo-mineral fertilizers. Dash-line boxes are groups of similar isotopic signatures of feedstock source (C3 and C4 plants).

## 6 CONCLUSIONS

The  $\delta^{15}\text{N}$  values of organic fertilizers, organo-mineral fertilizers and manures measured in this study are similar to published data. Some organic- and organo-mineral fertilizers not allowed by organic farming standards can show  $\delta^{15}\text{N}$  values within a range of permitted organic fertilizers and manures. Using synthetic fertilizer as primary material of organo-mineral fertilizers can imprint a low  $\delta^{15}\text{N}$  value to the final product; however, composting can alter the  $\delta^{15}\text{N}$  value of organo-mineral fertilizer by N loss. Organic fertilizers, organo-mineral fertilizers and manures can have their organic feedstock (e.g. plant residue) differentiated using  $\delta^{13}\text{C}$  value.

These are preliminary data of the isotopic composition of organic fertilizer in Brazil. Therefore, a wider survey of fertilizers and an experimental approach for organic- and organo-mineral fertilizer production (e.g. increasing proportions of different feedstocks) is needed to elucidate the natural isotope variation of the array of available products and soil amendments.

## **CAPÍTULO IV**

### **IDENTIFYING NITROGEN FERTILIZER REGIME AND LETTUCE PRODUCTION SYSTEM**

Published in:

INÁCIO, C.T.; URQUIAGA, S.; CHALK, P.M; MATA, M.G.F.; SOUZA, P.O . Identifying N fertilizer regime and vegetable production system in tropical Brazil using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 3025-3032, 2015.

## 1 RESUMO

Este estudo foi conduzido em áreas de produção de hortaliças no Estado do Rio de Janeiro, em clima Tropical, com o objetivo de (i) medir as variações nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no solo, fertilizantes orgânicos e alface (*Lactuca sativa* L.) de diferentes sistemas de produção, (ii) testar se a assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  pode diferenciar alface orgânica da convencional e (iii) identificar os fatores que afetam o  $\delta^{15}\text{N}$  da alface. Amostras de solo, alface e insumos orgânicos foram coletadas de duas áreas de produção orgânica, uma convencional e uma hidropônica. As duas produções orgânicas tinham diferentes fontes de nitrogênio (N) com valores de  $\delta^{15}\text{N}$  variando de 0,0 a +14,9 ‰ (por ex. adubos verde e composto de esterco de animais, respectivamente), e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da alface ( $+9,2 \pm 1,1\%$  e  $+14,3 \pm 1,0\%$ ) diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ). O  $\delta^{15}\text{N}$  da alface convencional ( $+8,5 \pm 2,7\%$ ) diferiu da alface hidropônica ( $+4,5 \pm 0,2\%$ ) devido à fonte orgânica. O N dos adubos-verdes (leguminosas) teve uma contribuição pequena para a nutrição de N da alface na produção com múltiplas fontes de N. Para diferenciar a produção orgânica da convencional usando o  $\delta^{15}\text{N}$  os vários subgrupos de modo de adubação devem ser considerados. Comparações do  $\delta^{15}\text{N}$  do solo, dos insumos orgânicos e da alface permitiram fazer uma análise qualitativa da importância relativa das diferentes fontes de N.

**Palavras-chave:** Fertilizantes orgânicos. Agricultura orgânica. Alface hidropônica.

## 2 ABSTRACT

This study was conducted in areas of vegetable production in tropical Brazil, State of Rio de Janeiro, with the objectives of (i) measuring the variation in  $\delta^{15}\text{N}$  in soils, organic nitrogen (N) fertilizer sources and lettuce (*Lactuca sativa* L.) from different farming systems, (ii) testing whether plant  $\delta^{15}\text{N}$  signatures can differentiate organic versus conventional lettuce and (iii) identifying the factors affecting lettuce  $\delta^{15}\text{N}$  signatures. Samples of soil, lettuce and organic inputs were taken from two organic, one conventional and one hydroponic farm. The two organic farms had different N-sources with  $\delta^{15}\text{N}$  values ranging from 0.0 to +14.9 ‰ (e.g. leguminous green manure and animal manure compost, respectively), and lettuce  $\delta^{15}\text{N}$  differed significantly ( $p < 0.05$ ) ( $+9.2 \pm 1.1$  ‰ and  $+14.3 \pm 1.0$  ‰, respectively). Conventional lettuce  $\delta^{15}\text{N}$  ( $+8.5 \pm 2.7$  ‰) differed from hydroponic lettuce  $\delta^{15}\text{N}$  ( $+4.5 \pm 0.2$  ‰) due to manure inputs. The N from leguminous green manure made a small contribution to the N nutrition of lettuce in the multi-N-source organic farm. To differentiate organic versus conventional farms using  $\delta^{15}\text{N}$  the several subsets of mode of fertilization should be considered. Comparisons of  $\delta^{15}\text{N}$  of soil, organic inputs and lettuce allowed a qualitative analysis of the relative importance of different N inputs.

**Keywords:** Organic fertilizers. Organic agriculture. Hydroponic lettuce.

### 3 INTRODUCTION

The market of organic food has increased around the world in the last decades with trade value of US\$63.8 billion in 2012; most of this market is in North America and Europe (Willer; Lenoud, 2014). The organic market in Brazil has also increased, with recent support to farmers by governmental programs and research institutions. Consumers usually link the organic food to health, high quality and environmental friendly agriculture (no chemicals/pesticides) in contrast to conventional practices (Tobin et al., 2011). Increasing international trade from Latin America to Europe, the USA and Japan (Willer; Lenoud, 2014) underlines the need for analytical tools to verify authenticity or designation of origin of organic foodstuffs. Thus, besides the analytical tools to test for pesticide residues in foodstuffs, there is no standard analytical tool to identify the use of prohibited synthetic N fertilizers by organic farmers.

Crops and agricultural soils show variations in  $\delta^{15}\text{N}$  values, reflecting inputs of N fertilizers having different  $^{15}\text{N}$  signatures (Yun et al., 2006). Synthetic fertilizers are slightly depleted or slightly enriched in  $^{15}\text{N}$  (e.g.  $\delta^{15}\text{N}=-3.9$  to  $+0.5$  ‰), while organic fertilizers such as manures (e.g.  $\delta^{15}\text{N}=+5.3$  to  $+7.2$  ‰) and composts (e.g.  $\delta^{15}\text{N}=+9.3$  to  $+20.9$  ‰) are enriched in  $^{15}\text{N}$  (Lim et al. 2010). On the other hand, leguminous green manures, which fix atmospheric  $\text{N}_2$ , are slightly depleted or slightly enriched in  $^{15}\text{N}$ . Therefore, different farming systems may show different  $\delta^{15}\text{N}$  signatures in plant products and soils regarding the type of N source. Thus the  $\delta^{15}\text{N}$  signature of plants has been suggested as a tool to differentiate conventional versus organic foodstuffs (Bateman et al., 2005). On the other hand,  $\delta^{13}\text{C}$  of plants did not reflect the  $\delta^{13}\text{C}$  signature of fertilizer applied (organic or synthetic) (Flores et al., 2007; Nakano et al., 2003) although the bulk  $\delta^{13}\text{C}$  of topsoil may be significantly modified by organic fertilizers (Nakano et al., 2003) such as composts (Lynch et al., 2006).

We reviewed the scientific literature regarding the role and limitations of stable isotopes to differentiate organic and conventional plant products (Inácio et al. 2015a), which revealed that there are some factors that could confound identification, e.g. the use of animal manure by conventional farmers or the use of leguminous green manures by organic farmers. Additionally, there is a lack of data from farming systems under tropical and subtropical climates.

Therefore, the objectives of this study was (i) to make a first exploratory study about the nitrogen isotope composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ) variation in vegetable production soils, organic N-sources and vegetables grown under different farming systems in Brazil, and (ii) test the plant  $\delta^{15}\text{N}$  signature to differentiate organic vs. conventional lettuce, (iii) to elucidate the confounding factors affecting the  $\delta^{15}\text{N}$  values of vegetables.

### 4. MATERIAL AND METHODS

#### 4.1 Farming Systems

Four vegetable production farms located 80 (Seropédica, S) to 130 (Teresópolis, T) km from the city of Rio de Janeiro were selected to represent different farming systems. Three of the farms are located within 5 km of each other (22° 18' 11" S, 42° 52' 33" W) and

comprise a first-year in-conversion organic farm (Org.T), a conventional farm (Conv.T), and a hydroponic farm (Hydrop.T). The other farm at Seropédica (22° 46' 38" S, 42° 41' 57" W) is an experimental organic farm (Org.S).

Location and climatic data are given in Table 4.1 and production system details and soil fertility data are given in Table 4.2. All farms produce vegetables, with lettuce (*Lactuca sativa* L.) being the main commercial product. The Org.S farm is managed by three research institutions to demonstrate alternative agro-ecological practices to growers who have limited access to animal manure as a soil amendment. The others are commercial farms located in the traditional and important vegetable production area of the State which supply the metropolitan regions.

**Table 4.1.** Location and climate data from field sites.

Farm	Location and elevation (m)	Climate zone <sup>a</sup>	Annual precip. (mm)	Oct-March precip. (mm)	Temp. mean max. (°C)	Temp. mean min. (°C)
Org.T Conv.T Hydrop.T	Teresópolis (900)	Humid subtropical (Cwa)	1880	1241	27 to 14	20 to 7
Org.S	Seropédica (28)	Tropical savanna (Aw)	1213	800	32.8 to 21.3	26.6 to 15.7

<sup>a</sup> Köppen–Geiger classification

Source: <http://www.inmet.gov.br> (Instituto Nacional de Meteorologia – INMET)

**Table 4.2.** Vegetable production system and total nitrogen (N) and carbon (C), pH, cation-exchange capacity (CEC) and base saturation (BS) of soil samples.

Farm	Type	Texture	N (g kg <sup>-1</sup> )	C (g kg <sup>-1</sup> )	pH	CEC (cmol dm <sup>-3</sup> )	S (cmol dm <sup>-3</sup> )
Org.T	Green-house	Clay	1.9(0.3)	18.4(3.5)	6.0(0.2)	14.3(1.3)	10.7(1.7)
Org.S	Field	Sandy/S. loam	0.8(1.9)	9.2(2.6)	6.2(0.6)	5.9 (0.9)	4.5 (0.6)
Conv.T	Field	Clay sandy loam	2.4(0.6)	16.3(6.8)	6.3(0.1)	11.8(2.4)	8.5(1.9)

Mean (standard deviation)

The synthetic fertilizers used in the Conv.T farm were mainly ammonium nitrate, NPK compound and urea (top dressing); animal manure (horse bedding manure and poultry manure) was the organic amendment. Vegetables are grown during the year and the rates of N applied were not recorded in a reliable manner for the Conv.T farm. The organic fertilizers used in the Org.T farm were compost made from horse bedding manure, poultry manure and vegetable waste, mainly lettuce leaves. In the Org.S. farm an array of organic sources was used, with the main sources being the summer leguminous green manures (e.g. *Mucuna aterrima* Piper & Tracy and *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp) and the fermented product (wheat bran+castor bean mill cake, called 'Bokashi'). In the Org.S farm vegetables were grown following *Mucuna* (green manure), which grows during the summer, and *Gliricidia* leaves were used as a mulch during the growing season (April to November). The fermented product and leguminous green manures represented 70 % and 24–29 %, respectively, of total annual N inputs (~850 kg ha<sup>-1</sup>). Among the top dressing N sources, the

fermented product represented 90 % of N applied ( $\sim 650 \text{ kg ha}^{-1}$ ). In the Hydrop.T farm the N source was calcium nitrate (N nitric=14.4 % and N ammoniac=1.1 % of total N).

Vegetable farming in the Org.T farm is under greenhouses (plastic and unheated), with drip irrigation. The Conv.T farm uses open fields with sprinkler irrigation. Greenhouses (plastic) are also used in the Hydrop.T farm, which grows lettuce in a hydroponic continuous-flow system. Plastic channels support lettuce plants where the mineral nutrient solution without soil passes through and is recycled into storage tanks. These storage tanks contain the mineral nutrient solution (synthetic fertilizers), which is pumped to the channels.

## 4.2 Sampling

Samples of soil, lettuce and organic inputs (composts, manures, green manures, cover crops) were taken from the field sites (Table 4.3). In the Conv.T farm random soil (0–10 and 10–20 cm depth) composite samples ( $2 \times 4$ ) were taken once from four plots before planting. In the Org.T farm soil (0–20 cm depth) was sampled three times ( $2 \times 3$ ); the first random soil composite samples were taken 1 month before conversion to organic farming (i.e. under conventional farming – 0 month). There were two more samplings at 6 and 12 months, always in the same four greenhouses ( $2 \times 3 \times 4$ ). In the Org.S farm nine random soil samples (0–20 cm depth) were taken from the vegetable production plot at the end of the growing season. Most samplings were taken during the growing season of lettuce and some before planting (soil preparation). The whole shoot of lettuce was sampled at least 40 days after planting (DAP) or at final harvest.

**Table 4.3.** Summary of sampling of soil (0 – 10 and 0 – 20 cm), plant (lettuce) and organic inputs (compost, manures, green manures, cover crops) from four vegetable production fields with different farming systems (organic with compost manure, organic without manure, conventional and hydroponic).

Farm	Sample	Period	<i>n</i>	Area (ha)
Org.T	Soil	March 2012 to March 2013	24	3.0
	Inputs		4	
	Plant		16	
Org.S	Soil <sup>a</sup>	September 2012	9	0.25
	Inputs	February 2013 to July 2013	11	
	Plant	March 2013 to September 2013	6	
Conv.T	Soil	June 2013	8	10
	Inputs		4	
	Plant		9	
Hydrop.T	Plant	January 2014	8	0.5

<sup>a</sup> 0 – 20 cm only

## 4.3 Isotope Ratio Analysis

Subsamples of inner, middle and outer leaves of lettuce were taken from the harvest and combined to make a composite sample for analysis. Plant, fertilizer and soil samples were dried at 60 °C during 72 h with forced-draft air circulation and then homogenized and ball-milled to a fine powder. Total nitrogen and total carbon of soil, plant, manure and compost samples were determined using an elemental combustion analyzer (PerkinElmer CHNS/O Series II 2400) with 0.2 % and 0.1 % accuracy for C and N, respectively. Dried and milled

samples were weighed into tin capsules to give 40 µg N (±5 %) for isotope ratio analysis ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ), using a mass spectrometer (Delta Plus, Thermo Finnigan) coupled to an elemental analyzer for C and N (ECS 4010, Costech Instruments). Relative values of  $^{15}\text{N}$  abundance ( $\delta^{15}\text{N}$ ) were expressed according to Eq. (1):

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{R\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}\right)_{\text{sample}}}{R\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}\right)_{\text{standard}}} - 1 \quad (1)$$

where  $R (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$  is the isotope ratio according to Eq. (2):

$$R (^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) = \frac{x(^{15}\text{N})}{1-x(^{15}\text{N})} \quad (2)$$

and  $x(^{15}\text{N})$  is the atom fraction  $^{15}\text{N}$ .

The international standard for N stable isotope ratio is atmospheric  $\text{N}_2$ , where  $R (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}} = 0.0036764710$ . The  $\delta^{15}\text{N}$  value of a sample can be either negative or positive, depending on whether it is depleted or enriched in  $^{15}\text{N}$  relative to the standard.  $\delta^{13}\text{C}$  values are expressed relative to Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) international standard (current VPDB-L-SVEC normalized curve) (Coplen et al., 2006). Working in-house, standards (finely ground wheat seed ( $\delta^{15}\text{N}=+4.5\text{‰}$  and  $\delta^{13}\text{C}=-24.9\text{‰}$ ) and soil ( $\delta^{15}\text{N}=+11.6\text{‰}$  and  $\delta^{13}\text{C}=-23.25\text{‰}$ ) were calibrated against international reference materials IAEA-600 caffeine ( $\delta^{15}\text{N}=+1.0$  and  $\delta^{13}\text{C}=-27.7\text{‰}$ ) and IAEA-CH-6 sucrose ( $\delta^{13}\text{C}=-10.4\text{‰}$ ). The calibrations were single point. When plant material was being analyzed, the mass spectrometer was calibrated for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  using the finely ground wheat standard, and when soil was being analyzed the in-house soil sample was used. Precision for plant and soil material was  $\pm 0.2\text{‰}$  for both isotopes.

#### 4.4 Statistical Analysis

Data are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). Prior one-way analyses of variance (ANOVA) of  $\delta$ -value data were tested for normal distribution (Anderson–Darling test) and equality of variances (Barnett and Levene tests). The Tukey–Kramer test was used to check significant differences between means of lettuce  $\delta$ -values. We used the Kruskal–Wallis non-parametric test to perform comparisons among  $\delta$ -values of soil, organic inputs and lettuce samples within each farm due to the unequal variances of data. The significance level chosen was  $\alpha = 0.05$  if not stated otherwise. We used the software Minitab 17 (Minitab Inc., Pennsylvania, PA, USA) to perform statistical analysis.

## 5 RESULTS AND DISCUSSION

### 5.1 Isotope Signatures of Organic Inputs and Soil

The array of N sources available for different organic farms shows a wide range of  $\delta^{15}\text{N}$  signatures, from +0.0 to +14.9 ‰, and Org.T and Org.S farms differed markedly in terms of organic inputs (Table 4.4). Legume green manure  $\delta$ -values were close to 0 ‰ as



evidence of biological N<sub>2</sub> fixation (BNF) (Oberson et al., 2007). Livestock manure and manure compost had higher  $\delta^{15}\text{N}$  values than all other organic sources, even plant residues and the fermented product. The high  $\delta^{15}\text{N}$  values of manures are evidence of N loss, e.g. NH<sub>3</sub> volatilization during storage prior to on-farm use (Hristov et al., 2009). The  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of manure also varied during the 12 months in the Org.T farm (Table 4.4) and the compost signature reflected this variation of the primary source. In contrast to data reported in the literature (Chalk et al., 2014) compost did not have higher values of  $\delta^{15}\text{N}$  than the feedstock (manure). Thus we assume that NH<sub>3</sub> volatilization during composting was minimal. The manures in the conventional farm came from the same sources as the Org.T farm.

**Table 4.4.** Total nitrogen (N) and carbon I content and relative isotopic abundance ( $\delta$ ) of organic inputs from two organic farming of vegetables in Rio de Janeiro State, Brazil.

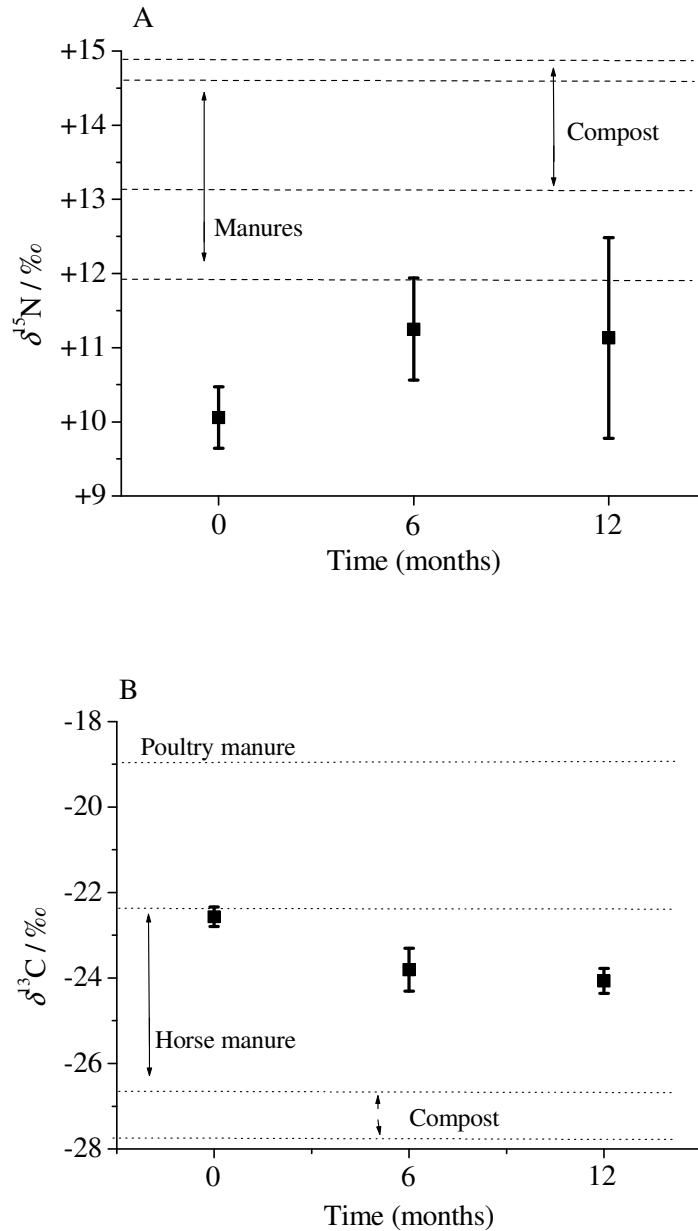
Farm	Input <sup>a</sup>	<i>n</i>	N (g kg <sup>-1</sup> )	C (g kg <sup>-1</sup> )	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Org.T	Horse manure	2	18	275	+ 11.8 and +14.6	-27.2 and -22.6
	Poultry manure	1	30	263	+13.9	-18.8
	Compost	3	17	240	+14.5 ±0.63	-26.4 ±1.96
Org.S	Gliricidia	1	45	445	+0.0	-29.0
	Mucuna	1	62	428	+2.5	-29.2
	Crotalaria	1	46	410	+1.4	--
	Elephant grass	1	6	437	+4.3	-11.9
	Maize	1	30	426	+10.0	-12.6
	Fermented product	1	40	401	+7.9	-24.1
	Castor bean	1	60	439	+9.4	-26.5
	Vermicompost	1	27	266	+8.8	-15.9
	Mulch	2	36	406	+6.5 and +7.6	-21.8 and -26.3
	Green-manure	2	21-43	243	+4.6 and +5.4	-25.0 and -20.4

<sup>a</sup> Horse manure, samples of march and September 2012; Compost made from manures + vegetables residues + straw; Fermented product made from wheat bran + castor bean mill cake; Vermicompost made from dairy manure; Mulch is a mixture of chopped residues of Gliricidia (*Gliricidia sepium*) + Elephant grass (*Pennisetum purpureum*); Green-manure is a mixture of Mucuna (*Mucuna aterrima*) + Maize (*Zea mays*) residues incorporated into soil at the end of summer before vegetables growing.

Org.T and Org.S farms differed significantly ( $P < 0.05$ ) in soil  $\delta^{15}\text{N}$  values;  $+11.1 \pm 1.4$  ‰ (mean of 0–10 and 10–20 cm composite samples,  $n = 8$ ; samples of March 2013, 12 months; Fig. 1) and  $+8.7 \pm 0.4$  ‰ ( $n=9$ , 0–20 cm), respectively. However, soil  $\delta^{15}\text{N}$  values were not significantly different between Org.T and Conv.T farms ( $+11.4 \pm 0.9$  ‰, mean of 0–10 and 10–20 cm composite samples,  $n = 8$ ). Thus soil  $\delta^{15}\text{N}$  signatures reflected organic source inputs such as manure, compost and the product derived from plant residues (fermented product). Considering the use of different N sources the data show that the soil  $\delta^{15}\text{N}$  signatures reflected more the organic N sources (Org.T) than the BNF input (leguminous green manures) (Org.S) or synthetic fertilizers (Conv.T). The amounts (rates) of organic amendments are high ( $\sim 20$ – $100$  Mg ha<sup>-1</sup>) in vegetable farming, and as a consequence total organic N (N-org) applied is high. A large part (32–46 %) of manure N and compost N applied remains as N-org in the soil (Celano et al., 2012; Munõz et al., 2003). On the other hand, N from synthetic fertilizers (e.g. urea) is highly soluble and as a consequence a small

amount of applied N remains as N in the soil, and a substantial part (e.g. 49 %) may be lost by  $\text{NH}_3$  volatilization in a tropical climate with split application (de Moraes et al., 2013).

Soil  $\delta^{15}\text{N}$  values of the Org.T farm increased during the first year of conversion to organic farming, reflecting the  $\delta^{15}\text{N}$  values of compost applied to the soil (Fig. 4.1A). Additionally, soil  $\delta^{13}\text{C}$  values decreased (Fig. 4.1B) in the first year of conversion to organic, also reflecting the  $\delta^{13}\text{C}$  values of compost applied to soil.



**Figure 4.1.** Values  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  (mean and standard deviation bars) of soil samples (0–20 cm) and organic inputs (manures and compost) from a first year in-conversion organic farming (Org.T).

Thus changes in soil  $\delta^{13}\text{C}$  values mirrored the increase in total soil C in the first year from  $129 \pm 27$  to  $158 \pm 8$  g  $\text{kg}^{-1}$  (0–10 cm) and from  $107 \pm 29$  to  $124 \pm 21$  g  $\text{kg}^{-1}$  (10–20 cm) due to compost application. The  $\delta^{15}\text{N}$  of compost (naturally enriched) supported the interpretation of soil  $\delta^{13}\text{C}$  data (Lynch et al., 2006) as shown in Fig. 4.1. According to Lynch et al. (2006) composts are highly recalcitrant, with prolonged C storage in non-mineral soil fractions. Soil  $\delta^{13}\text{C}$  value of the Conv.T farm ( $-21.7 \pm 0.99\text{‰}$ ) is in the range of animal manure signatures (Table 4.4). In the Org.S farm soil  $\delta^{13}\text{C}$  value ( $-18.8 \pm 1.2\text{‰}$ ) was out of the range of  $\delta^{13}\text{C}$  signatures (less negative) of both (C3) green manures and fermented product. Besides the influence of the C4 mulch (e.g. elephant grass) on soil  $\delta^{13}\text{C}$ , past land use (C4 pasture) is a relevant factor influencing soil  $^{13}\text{C}$  abundance in the Org.S farm.

Our data are consistent with Choi et al. (2003b) who reported that the soil  $\delta^{15}\text{N}$  signature was higher under long-term compost applications ( $+8.8 \pm 2.0 \text{‰}$ ) than in the inorganic fertilizer treatments ( $+5.9 \pm 0.7 \text{‰}$ ), as indicated by a positive correlation ( $R = 0.62$ ) between N content and soil  $\delta^{15}\text{N}$ . The  $\text{NO}_3^-$  pool of compost-amended soils ( $+11.6 \pm 4.5 \text{‰}$ ) was enriched in  $^{15}\text{N}$  compared to inorganic fertilized soils ( $+4.7 \pm 1.1 \text{‰}$ ), while the  $^{15}\text{N}$  composition of the  $\text{NH}_4^+$  pool was not different between the fertilizer treatments (Choi et al., 2003b).

## 5.2 Differentiation of Production Systems

Comparison of  $\delta^{15}\text{N}$  values of the lettuce samples from the different farming systems (Fig. 4.2) showed several important trends. The two organic farms (Org.T and Org.S) differed significantly ( $P < 0.01$ ) in mean  $\delta^{15}\text{N}$  values of lettuce (Fig. 4.2). Org.T showed higher  $\delta^{15}\text{N}$  values for lettuce than Org.S due to differences in  $\delta^{15}\text{N}$  values of the N sources applied (Table 4.4). Therefore, the variable adoption of organic N sources available, i.e. manure/compost and leguminous green manure among organic farms, may imprint a wide range on  $\delta^{15}\text{N}$  signatures, which could even form different subsets of organic vegetables.

The hydroponic farm, which has only synthetic fertilizer as an N source with no influence of soil N, showed the least positive  $\delta^{15}\text{N}$  values of lettuce. Thus the hydroponic system was differentiated by the mean  $\delta^{15}\text{N}$  values of lettuce ( $P < 0.01$ ) from the conventional and the two organic farms. We did not measure the  $\delta^{15}\text{N}$  values of the fertilizers from the Hydro.T farm. Nevertheless, the  $\delta^{15}\text{N}$  signature of lettuce in the hydroponic farm is in accordance with the range of  $\delta^{15}\text{N}$  of synthetic fertilizers reported in the literature, e.g.  $-1.5$  to  $-1.6 \text{‰}$  (potassium nitrate) and  $-1.7$  to  $+5.7 \text{‰}$  (calcium nitrate) for hydroponic farming (Inácio et al., 2015a).

Hydroponic tomatoes in the UK and New Zealand showed  $\delta^{15}\text{N}$  values very close to  $0.0 \text{‰}$  (Bateman et al., 2007; Rogers, 2008). However, Bateman et al. (2007) did not find a significant difference between the  $\delta^{15}\text{N}$  values for tomatoes from hydroponic culture (UK, Netherlands) and soil-based conventional tomatoes (Mediterranean countries). Crops under fertigation with synthetic N fertilizers may show  $\delta^{15}\text{N}$  signatures more similar to the hydroponic product than to a conventional soil-based product. For example, Nakano et al. (2003) reported  $\delta^{15}\text{N}$  values of  $+3.2 \pm 1.3 \text{‰}$ ,  $+0.3 \pm 0.6 \text{‰}$ , and  $+7.1 \pm 0.7 \text{‰}$  in tomatoes grown with a basal dressing of synthetic fertilizer ( $+0.8 \pm 0.5 \text{‰}$ ), compared with those grown under inorganic fertigation ( $+0.0 \pm 0.04 \text{‰}$ ), and in those grown under organic fertigation with corn steep liquor ( $+8.5 \pm 0.7 \text{‰}$ ), respectively. The fertigation with highly soluble N fertilizer showed closer  $\delta^{15}\text{N}$  signatures to the N source than the basal dressing treatment due to the better fertilizer use efficiency and the smaller  $^{15}\text{N}$  isotopic fractionation (volatilization/denitrification) in the inorganic fertigation system (Nakano et al., 2003). Therefore, plant uptake of N from soil (enriched  $\delta^{15}\text{N}$  values) was small or negligible in the

daily fertigation treatment (Nakano; Uehara, 2007). These overall conditions in fertigation might place it close to hydroponic systems.

The use of synthetic N fertilizers and manure as N sources in the conventional farm resulted in  $\delta^{15}\text{N}$  values of lettuce in an intermediate position between the hydroponic farm and Org.T farm (Fig. 4.2). Furthermore, the overlap between  $\delta^{15}\text{N}$  values of lettuce from Org.S farm and Conv.T farm (Fig. 4.2) was driven more by the use of manure than by the use of leguminous green manure in Org.T farm (Fig. 4.4; see further discussion in the next section). In other words, the N from BNF did not affect the nitrogen isotope signature of lettuce enough to be considered as a confounding factor, i.e. to imprint less positive  $\delta^{15}\text{N}$  values in organic lettuce which would overlap with conventional farm samples. This suggests a low N use efficiency (NUE) from green manures in the Org.S farm (see discussion in the next section).

Therefore, in a vegetable production region where the use of manure among farmers is widespread, the use of synthetic N fertilizer will lower the  $\delta^{15}\text{N}$  values of conventional vegetables against organic vegetables. This condition is clearly demonstrated by comparing Org.T and Conv.T farms, where the mean  $\delta^{15}\text{N}$  values were significantly different and the probability of intersection of  $\delta$ -values of lettuce samples taken from the two farms was 6.2 % (95 % confidence interval) (Fig. 4.3). On the other hand, in a vegetable production region where animal manure is scarce for organic farmers, an overlapping between organic (fertilized with green manure) and conventional plant product  $\delta^{15}\text{N}$  signatures would be expected.

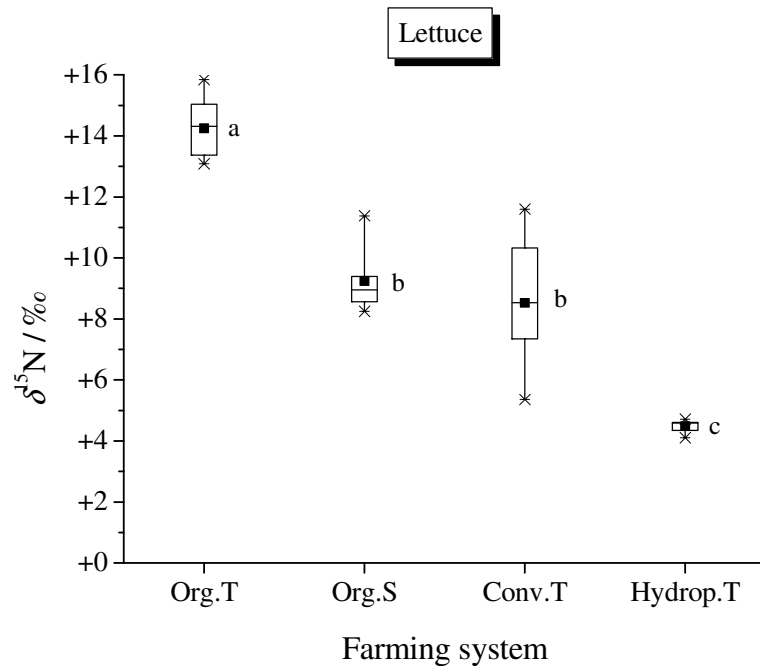
$\delta^{15}\text{N}$  mean values of organic lettuce were higher than (Org.T) or similar to (Org.S) published values (Table 4.5). Similarly, in our study conventional lettuce showed much higher  $\delta^{15}\text{N}$  signatures than lettuce from temperate climates and overlapped with organic lettuce values. The reason for this may be the greater potential for N loss or N availability in tropical agro-ecosystems which increase the  $\delta^{15}\text{N}$  composition of native vegetation and soil (Martinelli et al., 1999; Craine et al., 2009 e 2015).

Nitrogen isotope signatures of organic and conventional lettuce from commercial farms and retail samples were significantly different ( $P < 0.01$ ) (Bateman et al., 2007), but showed higher mean standard deviations than the data reported from experimental trials (Table 4.5). Actually, Bateman et al. (2007) found different degrees of overlap of values between organic and conventional vegetables (carrots>lettuce>tomato) from farms and retail sources. Although the majority of data reported in the literature (Inácio et al., 2015a; Georgi et al, 2004 e 2005) show significant differences between organic and conventional lettuce and other vegetables, Schmidt et al. (2005) found no significant differences between  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of lettuce and other vegetables from organic and integrated farming (Germany), where both systems use manures while the latter also uses synthetic N fertilizer.

The effect of combined usage of synthetic and organic fertilizers (single or split application) on nitrogen isotope composition of plants (Chinese cabbage) can be easily detectable, i.e. cause significant alteration of plant  $\delta^{15}\text{N}$  values (Yun et al., 2006). However, Šturm et al. (2011) maintained that when the difference in  $\delta^{15}\text{N}$  signatures between N sources is low, e.g.  $<9.1\%$ , the discriminant power decreases, and the effect of added synthetic fertilizer to the basal organic dressing could not be detected (lettuce). It is probable that the 'minimum' difference might be smaller under commercial production involving long-term application of organic fertilizers than in a short-term pot experiment.

Bateman et al. (2007) pointed out that the  $\delta^{15}\text{N}$  analysis provides information as to whether synthetic N fertilizers have been applied to a crop. However, there is the issue of a false positive, when the stable isotope test would indicate that a synthetic fertilizer had been used when in fact it had not. The  $\delta^{15}\text{N}$  analysis was not able to differentiate the Org. S from

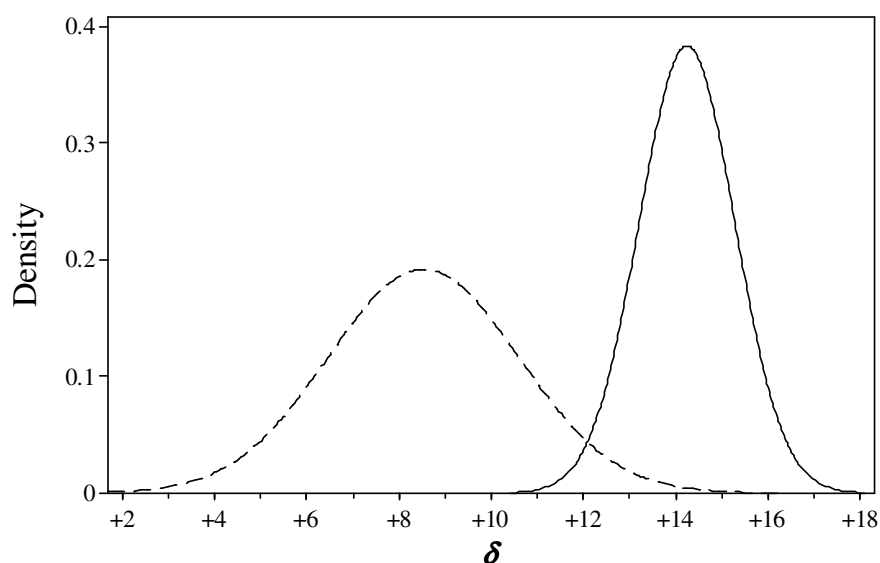
the Conv. T farm, and therefore we had a ‘false positive’ because of the with / without manure farming and not because of synthetic fertilizer use. Bateman et al. (2007) also explained that in terms of classical set theory the organic farms use a ‘subset’ of the fertilizers available to conventional farms, and therefore it might be expected that the range of  $\delta^{15}\text{N}$  values for organic plant products is also a subset of the observed range for conventional plant products. In fact, our data suggest that the use of nitrogen isotope analysis to differentiate organic versus conventional plant products is a more complex scenario because of the several sets or subsets of production systems or fertilization methods to be considered, e.g. organic with/without manure, hydroponic/soil-based, fertigation/basal dressing.



**Figure 4.2.** Box-plot and means (■) of  $\delta^{15}\text{N}$  of lettuce samples from an in-conversion organic farm (Org.T,  $n=7$ ); an experimental organic farm (Org.S,  $n=6$ ); a conventional farm (Conv.T,  $n=9$ ); and a hydroponic farm (Hydrop.T,  $n=8$ ). Different letters indicate statistical different means (Tukey-Kramer test,  $P < 0.05$ ).

### 5.3 N in the Farming Systems

By comparing the  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of soil, organic inputs and lettuce in each farm (Fig. 4.4) it was possible to make a qualitative analysis of the relative importance of different N inputs. In the Org.T farm the mean values of  $\delta^{15}\text{N}$  of organic inputs and lettuce were similar (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ) and suggest the N from manure/compost sources was dominant. Yun and Ro (2009) showed that N uptake and  $\delta^{15}\text{N}$  values of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) increased with compost application rates, and  $\delta^{15}\text{N}$  values of leaves tended to be constant after excessive compost addition (over-fertilization), reflecting the soil  $\text{NO}_3^-$  isotope signature. In the Org.S farm the mean values of  $\delta^{15}\text{N}$  of organic inputs and lettuce were different (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ). This mismatch of  $\delta^{15}\text{N}$  values suggests that legumes used as mulches or green manure, with high BFN inputs, were not the main N source despite the high N content, while other N sources were available with higher  $\delta^{15}\text{N}$  signatures, such as the fermented product (Table 4.4).



**Figure 4.3.** Normal distribution curves for  $\delta^{15}\text{N}$  ‰ values of lettuce from the conventional farm (Conv.T, dashed line) and an organic farm (Org.T, solid line). The probability of intersection of  $\delta$ -values is 6.2 % (95 % confidence interval).

**Table 4.5.** Differences in  $\delta^{15}\text{N}$  ‰ signatures between organic and conventional lettuce, published data

Origin	Type of sample	$\delta^{15}\text{N}$ signatures		$p^a$	Reference
		Organic	Conventional		
UK	Experimental plot	+5.5	+2.2	*	Bateman et al., 2005
Germany	Experimental plot	+7.5 to +8.0	+6.5 to +7.5	ns	Schmidt et al., 2005
Germany	Experimental plot	+8.2	+6.6	*	Georgi et al., 2005
UK and EU	Farms and Retails	+7.6 (4.1)	+2.9 (4.3)	*	Bateman et al., 2007
Slovenia	Experimental plot	+8.0 to +9.6	+5.2 to +7.2	-	Šturm et al., 2011

<sup>a</sup> \*  $P < 0,05$ ; ns = not significant.

In the Conv.T farm the mismatch between  $\delta^{15}\text{N}$  values of organic inputs and lettuce indicates the influence of synthetic N fertilizers with very low  $\delta^{15}\text{N}$  signatures. The statistical differences (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ) among all three means (soil, organic input, lettuce) confirm the input of an N source (synthetic N fertilizers) with a lower  $\delta^{15}\text{N}$  signature than an organic input. Therefore, even without previous knowledge of the contribution of each source to the total N input, we could infer which N source was more important. The conventional lettuce showed a wide range (+5.4 to +11.6 ‰), as evidence of the two N-sources, i.e. manure and synthetic N fertilizer. The lowest values may be attributed to the top

dressing with urea. A variation may be found intra-plant i.e. specific  $\delta^{15}\text{N}$  signals of basal N dressing would be reflected in outer parts of the plant (e.g. cabbage or other leafy vegetable) formed in the early growth stage, while those of top dressing N would be reflected in inner parts of the plant formed in the latter growth stage (Yun et al., 2006).

Considering the proportions for each N source in the Org.S farm (see 'Farming systems' section, above) the weighed means of  $\delta^{15}\text{N}$  were +6.2 ‰ and +7.4 ‰ for the annual total N input and the top dressing N input, respectively. Therefore, we can infer that almost all of the N uptake by lettuce ( $+9.2 \pm 1.1$  ‰) came from the top dressing with the fermented product (+7.9 ‰) and soil N ( $+8.7 \pm 0.4$  ‰), while the N from BNF legumes (+0.0 to +2.5 ‰) had a very low contribution to the N nutrition of lettuce. Also, the more positive N isotope composition of lettuce than the two main N sources (soil and organic fertilizers) is most likely due to  $^{15}\text{N}$  isotopic fractionation processes in soil, i.e. volatilization, nitrification and denitrification, which increase the  $\delta^{15}\text{N}$  values of the remaining N in the soil solution available for plant uptake (Yun; Ro, 2009).

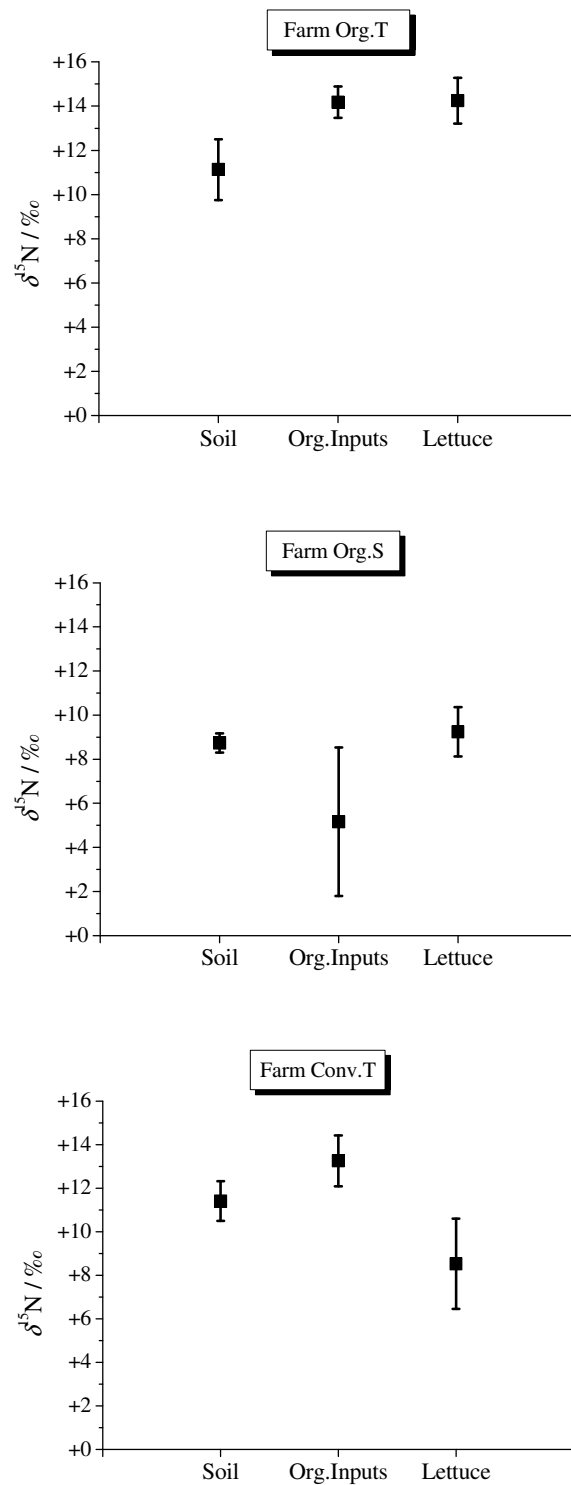
In a field experiment at the same location as the Org.S farm,  $^{15}\text{N}$  recoveries ranged from 9% to 16 % from  $^{15}\text{N}$ -labelled leguminous green manures (*Mucuna cinereum* (Piper & Tracy) and *Canavalia ensiformis* (L.) DC, respectively) applied as a mulch to a cabbage (*Brassica oleracea* L.) crop (Araújo et al., 2011). Thus, even for a high-BNF legume such as *Mucuna*, the vegetable N recovery was very low. Douxchamps et al. (2011) also reported a  $^{15}\text{N}$  recovery of 12% by a maize crop following *Canavalia brasiliensis* (Mart. Ex Benth) under tropical climates. High N losses (30–57 % of total N input) have been reported from legume mulch due to  $\text{NH}_3$  volatilization and denitrification (Thönnissen et al., 2000). The N recovery by vegetables from BNF green manure depends on synchrony of N release with crop demand and the rooting depth of the main crop (Thönnissen et al., 2000; Thorup-Kristensen, 2006).

Published data on recoveries of different organic N sources by annual crops show wide variation, from <10 to >40 % of total N input. Composts show a consistently low average of plant N recovery of 8–10% (Chalk et al., 2013). Manures are more variable, with a range of 14–47% in the first year and residual effects in the second and third years of 2.5–6% and 1.1–2.5 %, respectively (Olesen et al., 2004).

The signature of other vegetable species from the Org.S farm showed a wider range of  $\delta^{15}\text{N}$  values than lettuce–cucumber (*Cucumis sativus* L.), +12.0 ‰; salad rocket (*Eruca sativa* Mill.), +10.8 to +12.5 ‰; chicory (*Chicorium endivia* L.), +9.4 to +9.8 ‰; radish (*Raphanus sativus* L.), +4.2 ‰. However, only for leafy vegetables were the range and mean of  $\delta^{15}\text{N}$  close to lettuce. This variation of  $\delta^{15}\text{N}$  values might be attributed to (i)  $^{15}\text{N}$  isotopic fractionation by assimilation of N, i.e. due to nitrate or ammonium uptake preference (Ariz et al., 2011); (ii)  $^{15}\text{N}$  isotopic fractionation by N loss, e.g.  $\text{NH}_3$  volatilization, which increases the  $\delta$ -values of the remaining N for plant uptake; (iii) the contribution of multiple N sources with different  $\delta$ -values; and (iv) the different plant organs (del Amor et al., 2008). Therefore, it is important to investigate the  $\delta^{15}\text{N}$  signatures that each vegetable species and plant organ would show with a single N source, e.g. green manure or compost. Also, the  $\delta^{15}\text{N}$  signature of plants with a longer growth cycle (e.g. maize) than lettuce may not be a good test crop of the N-source isotope signature, owing to the larger contribution of soil N (Choi et al., 2002).

The hydroponic farm (Hydrop.T), which was based solely on synthetic fertilizer, showed the narrowest range of  $\delta^{15}\text{N}$  signatures for lettuce samples (Fig. 4.2). Despite the large variation of N inputs in the Org.S farm, lettuce showed a narrow range of  $\delta^{15}\text{N}$  signatures, with a mean standard deviation similar to Org.T samples which had manure compost as the sole N source. Therefore, the smaller mean standard deviation the more likely

the plant N uptake is based on a single N source, despite the multiple N inputs with different  $\delta^{15}\text{N}$  values applied to soil.



**Figure 4.4.** Mean and standard deviation (bars) of  $\delta^{15}\text{N}$  of soil, organic inputs and lettuce samples from a first year- in-conversion organic farm based on the use of compost of animal manure (Org.T); an experimental farm based on the use of green manure



(legumes) and a fermented product without the use of manure (Org.S); and a conventional farm based on the use of synthetic N fertilizer and animal manure.

## 6 CONCLUSIONS

We found a slightly more positive trend in  $\delta^{15}\text{N}$  values of vegetables grown under tropical field conditions than those from temperate climates. Although the  $\delta^{15}\text{N}$  analysis alone is not enough to detect organic products, the  $\delta^{15}\text{N}$  signatures seem to be more suitable as a marker of mode of fertilization than mode of production. Our data strongly suggest that using plant  $\delta^{15}\text{N}$  values to differentiate organic and conventional plant products, we must also consider the several subsets represented by the different modes of fertilization within the certified organic farming and conventional farming systems, e.g. organic farming with/without manure, conventional farming with/without manure, hydroponic farming, conventional with fertigation, commercial organic fertilizers available by region, and the efficiency of green manure (BNF legume) inputs at the farm level. Additionally, the differentiation of mode of fertilization is a matter of (i) what type of N source is applied and (ii) in the case of multiple sources what N source has the higher potential N recovery by the crop. In this context, we suggest that vegetables from controlled hydroponic farming or inorganic fertigation (i.e. soilless) could fit as a standard sample  $\delta^{15}\text{N}$  value for comparisons with other modes of fertilization. These samples may represent the lowest nitrogen isotope composition for a specific plant species under inorganic fertilization. Similarly, controlled vegetable production in pot culture over-fertilized (N surplus) with different organic fertilizers (single N source) could be used for the same propose, i.e. to produce standard or reference samples. Finally, another point is that a high soil-N contribution to plant nutrition may be a limiting factor of the technique.

## **CAPÍTULO V**

### **ESTIMATIVA DE RECUPERAÇÃO DE N EM HORTALIÇAS FERTILIZADAS COM COMPOSTO ORGÂNICO EMPREGANDO A ABUNDÂNCIA NATURAL DE <sup>15</sup>N**

## 1 RESUMO

Os compostos orgânicos (compostagem) são naturalmente ‘enriquecidos’ apresentando valores de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) mais elevados que os solos, em geral. A marcante influência da adubação orgânica sobre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas cultivadas sugere a possibilidade do uso da abundância natural em  $^{15}\text{N}$  de compostos orgânicos como traçador do destino do N, incluindo a estimativa quantitativa de recuperação de N aplicado, em alternativa ao uso de materiais marcados, de obtenção laboriosa. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade do uso dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para estimar a recuperação pelas plantas cultivadas do N do composto. O experimento consistiu no cultivo em sequência de alface americana, cenoura e brócolis ramoso sob doses crescentes (0, 7, 14, 21, 28, e 35 kg N m<sup>-2</sup>) de composto orgânico ( $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$ ). O delineamento experimental foi em blocos completos ao acaso. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  variaram com as doses crescentes para cenoura (+11,7 a +13,4 ‰) e do brócolis (+11,9 a +13,1 ‰), exceto para alface (+12,4 a +14,3 ‰), porém nem sempre o maior valor de  $\delta^{15}\text{N}$  correspondeu à maior dose. As assinaturas das plantas no controle não diferiram estatisticamente dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo ( $12,3 \pm 0,4 \text{ ‰}$ ). Neste caso, o  $\delta^{15}\text{N}$  da planta refletiu o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo e qualquer efeito do fracionamento isotópico solo-planta pôde ser ignorado. Portanto, assume-se que o  $\delta^{15}\text{N}$  da planta maior que o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo reflete o aproveitamento do N do composto em alguma proporção pela planta. Adicionalmente, as correlações de Pearson entre valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas e a produção foram positivas e significativas para cenoura-raiz (R = 0,88 e P = 0,02) e cenoura-folha (R = 0,76 e P = 0,08), porém foi menos significativa para brócolis (R = 0,62 e P = 0,19), e não significativo para alface (R = -0,43 e P = 0,40). Aplicando-se a equação proposta, %NRec =  $[(\delta_{\text{planta}+} - \delta_{\text{planta}-}) \div (\delta_{\text{composto}} - \delta_{\text{solo}})] \times [N_{\text{colhido}} \div N_{\text{aplicado}}]$ , onde  $\delta_{\text{planta}+}$  é o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta com composto;  $\delta_{\text{planta}-}$  é o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta sem composto;  $\delta_{\text{composto}}$  é o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do composto;  $\delta_{\text{solo}}$  é o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo;  $N_{\text{colhido}}$  é o N total colhido na matéria seca da planta teste, e  $N_{\text{aplicado}}$  é o N total do composto aplicado ao solo; as estimativas médias de recuperação de N do composto foram 3,4 (2 a 8 %) para alface, 5,8 % (4 a 9 %) para cenoura e 13 % (9 a 18 %) para brócolis. Valores irrealis (>100 % ou negativos) foram desconsiderados e atribuídos, principalmente, a amostragem não representativa devido às variações intra-planta de  $\delta^{15}\text{N}$ . Este estudo apresenta as bases (teórica e experimental) para o uso de valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para estimar a recuperação do N do composto orgânico. Não obstante, a metodologia precisa ser testada em experimentos simultâneos com ambas as técnicas, abundância natural de  $^{15}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$  enriquecido (composto marcado).

**Palavras-chave:**  $^{15}\text{N}$ .  $\delta^{15}\text{N}$ . Fertilizante orgânico.

## 2 ABSTRACT

Composts (composting) are naturally ‘enriched’ showing  $^{15}\text{N}$  natural abundance values ( $\delta^{15}\text{N}$ ) more positives than soils, in general. The remarkable influence of organic inputs on  $\delta^{15}\text{N}$  values of growing plants suggests the possible use of  $^{15}\text{N}$  natural abundance of composts as a tracer of the fate of N, including quantitative estimates of N recovery, as an alternative to the use of  $^{15}\text{N}$ -enriched materials. Therefore, the objective of this study was to verify the feasibility of using  $\delta^{15}\text{N}$  value to estimate compost-N recovery by plants. An experiment was carried out with head lettuce, carrots and broccoli cultivated in sequence under increasing levels of compost ( $\delta^{15}\text{N} = +15.5 \pm 0.2 \text{‰}$ ) application (0, 7, 14, 21, 28, and 35 kg N m<sup>-2</sup>). The experimental design was randomized blocks.  $\delta^{15}\text{N}$  values varied with the increasing levels of compost for carrots (+11.7 to +13.4 ‰) and broccoli (+11.9 to +13.1 ‰), except for lettuce (+12.4 to +14.3 ‰), although the highest value of  $\delta^{15}\text{N}$  did not always correspond to the highest dose of compost. Plant signatures without compost were not statistically different from soil  $\delta^{15}\text{N}$  values ( $12.3 \pm 0.4 \text{‰}$ ). In that case,  $\delta^{15}\text{N}$ -plant reflected the  $\delta^{15}\text{N}$  of bulk soil, and any soil-plant isotopic fractionation effect could be ignored. Therefore, we assume that  $\delta^{15}\text{N}$ -plant higher than  $\delta^{15}\text{N}$ -soil reflects the plant uptake of compost-N in some proportion. Additionally, Pearson correlations were significant and positive between plant  $\delta^{15}\text{N}$  and yield for carrot-roots (R = 0.88, P = 0.02) and carrot-shoots (R = 0.76, P = 0.08), but the correlation was less significant for broccoli (R = 0.62, P = 0.19) and was not significant for lettuce (R = -0.43, P = 0.40). Using the proposed equation,  $\% \text{NRec} = [(\delta_{plant+} - \delta_{plant-}) \div (\delta_{compost} - \delta_{soil})] \times [N_{harvested} \div N_{applied}]$ , where  $\delta_{plant+}$  is the  $\delta^{15}\text{N}$ -plant values with compost;  $\delta_{plant-}$  is the  $\delta^{15}\text{N}$ -plant values without compost;  $\delta_{compost}$  is the  $\delta^{15}\text{N}$  of compost;  $\delta_{soil}$  is the  $\delta^{15}\text{N}$  of soil,  $N_{harvested}$  is the total N harvested in test plant dry mass, and  $N_{applied}$  is the total N-compost applied to soil; the average compost-N recoveries were 3.4 (2 to 8 %) for lettuce, 5.8 % (4 to 9 %) for carrots, and 13.0 % (9 to 18 %) for broccoli. Unrealistic values (> 100 % or negative estimates) were disregarded and assigned primarily to non-representative sampling because of intra-plant  $\delta^{15}\text{N}$  variations. This study shows the basis (theoretical and experimental) of using  $\delta^{15}\text{N}$  values to estimate N-compost recovery by test plants. Nevertheless, the methodology needs to be tested in simultaneous experiments using both  $^{15}\text{N}$  natural abundance and  $^{15}\text{N}$  enrichment techniques (labeled compost).

**Key-words:**  $^{15}\text{N}$ .  $\delta^{15}\text{N}$ . Organic fertilizer.

### 3 INTRODUÇÃO

O composto orgânico de restos vegetais, com ou sem a mistura com esterco de animais, é a principal fonte de nutrientes em cultivos de hortaliças dentro das normas de produção orgânica certificada, e seu uso é recomendado mesmo associado a adubos-verdes para a manutenção de bons níveis de produtividade (Resende et al., 2007). Além disso, a compostagem tem se tornado uma prática recomendável para tratar grandes quantidades de resíduos orgânico originados dos setores agrícolas e agroindustriais, além de promover a redistribuição de nutrientes localmente e regionalmente (Westermann; Bicudo 2005). No entanto, o valor agrônomico do composto orgânico como fonte de nitrogênio (N) pode ser considerado baixo, com recuperações de nitrogênio (N) pela cultura em torno de 10 % em média (Chalk et al., 2013). Adicionalmente, uma fração relevante de N pode ser perdida na forma de amônia volatilizada durante a compostagem (ver capítulo II).

O enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  do material orgânico ou do solo se colocam entre as principais técnicas utilizadas para se estimar o aproveitamento do N do composto orgânico e esterco de animais. A obtenção de materiais orgânicos (restos vegetais, esterco ou composto) marcados em  $^{15}\text{N}$  é trabalhosa, e a falta de uniformidade da marcação com  $^{15}\text{N}$  tem sido apontada como uma fonte de erro de magnitude desconhecida durante a estimativa da recuperação de N de fontes orgânicas aplicadas ao cultivo (Chalk et al., 2013). De fato, há um número limitado de trabalhos na literatura com composto enriquecido em  $^{15}\text{N}$  em comparação com o uso direto de fertilizantes sintéticos marcados (p. ex. ureia- $^{15}\text{N}$ ). No entanto, compostos orgânicos e esterco de animais são naturalmente ‘enriquecidos’ registrando valores de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) marcadamente mais positivos, isto devido às perdas de N via volatilização de amônia e desnitrificação que ocorrem tanto na estocagem do esterco quanto durante a compostagem (Lee et al., 2011; Lim et al. 2010). Esses valores de  $\delta^{15}\text{N}$  são em geral diferentes dos solos (Nishida; Sato, 2015) e dos fertilizantes sintéticos (Batemann; Kelly, 2007). Por exemplo, compostos orgânicos possuem abundância de  $^{15}\text{N}$  mais elevadas ( $\delta^{15}\text{N} = +9.6$  a  $+45.2$  ‰) que os materiais iniciais da compostagem (Kim et al., 2008; Lynch et al., 2006; Choi et al. 2003a, 2006, 2007a, 2007b; Lim et al. 2010; Nishida et al. 2007). Assim, a assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  tem sido apontada como uma ferramenta analítica promissora para diferenciar produtos cultivados com fertilizantes orgânicos ou fertilizantes sintéticos (Inácio et al. 2015a; Inácio; Chalk, 2015).

Esta marcante influência da adubação orgânica sobre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas cultivadas sugere, portanto, a possibilidade do uso da abundância natural em  $^{15}\text{N}$  de compostos orgânicos e esterco de animais como traçador do destino do N (Inácio et al., 2015a; ver capítulo IV), incluindo a estimativa quantitativa de recuperação de N aplicado. Yun e Ro (2009) sugeriram o uso dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas e do solo como evidência de aplicações excessivas de composto orgânico (consumo de luxo), baseado na alta similaridade entre o  $\delta^{15}\text{N}$  do nitrato do solo e das plantas e na estabilização deste sinal isotópico nas doses mais elevadas de composto.. Como o  $\delta^{15}\text{N}$  da planta reflete a contribuição relativa de cada fonte de N, quanto maior a contribuição do N do composto para o N da planta maior seria o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta (Högberg, 1997; Yun; Ro, 2009). Craine et al. (2015) também relacionaram o aumento dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de plantas nativas com a disponibilidade maior de N no solo.

No entanto, é preciso uma abordagem experimental e de cálculo diferente do que preconizado para fertilizantes marcados em  $^{15}\text{N}$ . A definição de uma metodologia que estima

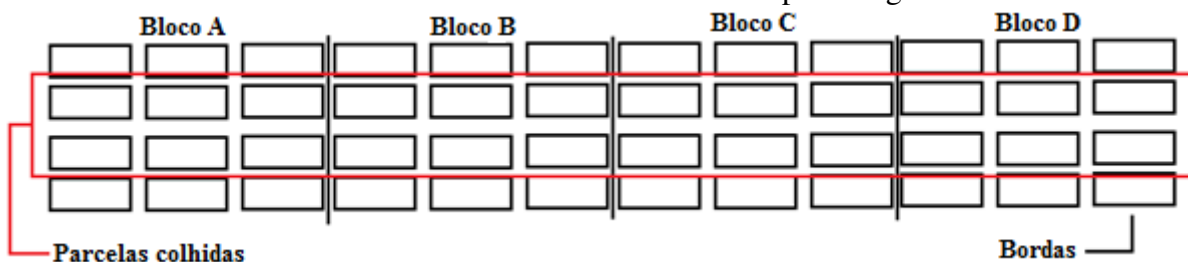
a recuperação do N de fontes orgânicas utilizando a abundância natural em  $^{15}\text{N}$  pode tornar tais estudos mais simples, rápidos e de mais ampla utilização. Em cultivos de hortaliças, que em geral, se utilizam de fontes orgânicas, o desenvolvimento de tal técnica seria de grande aplicação. Porém, o fracionamento isotópico durante as transformações de N no solo é um fator limitante reconhecido quando se tenta empregar a abundância natural em estimativas quantitativas precisas, sugerindo que apenas estimativas qualitativas ou semi-quantitativas seriam admitidas (Chalk et al., 2013, 2014).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade do uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) do composto orgânico para estimar a recuperação pelas plantas cultivadas do N do composto, usando como plantas teste alface americana, cenoura e brócolis ramoso.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Experimento

O experimento consistiu no cultivo em sequência de alface americana (*Lactuca sativa* L.) cultivar Raider Plus, cenoura (*Daucos carota* L.) cultivar Brasília e brócolis ramoso (*Brassica oleracea* L., grupo *Italica*) cultivar Piracicaba com a incorporação de diferentes doses de composto orgânico a 20 cm de profundidade. As doses de composto foram 0,0 (D0); 0,5 (D1); 1,0 (D2); 1,5 (D3); 2,0 (D4); e 2,5 (D5)  $\text{kg m}^{-2}$ , base seca, que corresponderam a 0, 7, 14, 21, 28, e 35  $\text{g N m}^{-2}$ . O delineamento experimental foi em blocos completos ao acaso, totalizando 24 parcelas (4 blocos x 6 doses), cada parcela retangular com 2  $\text{m}^2$  (2 x 1 m), em cultivo protegido (estufa com cobertura plástica) e irrigação por aspersão (plantio de mudas) e gotejamento durante o restante do ciclo vegetativo. Foram feitos quatro canteiros de 1,0 m de largura e 24,0 m de comprimento utilizando enxada rotativa. Os dois canteiros laterais de cada parcela foram usados como bordadura. A Figura 5.1 mostra o desenho experimental. As mudas de alface foram transplantadas em espaçamento de 30 x 30 cm (duas fileiras por canteiro) e as mudas de brócolis em espaçamento o 60 x 60 cm (duas fileiras por canteiro). A cenoura foi semeada em três sulcos por canteiro com espaçamento de 30cm, com desbaste feito com 20 dias após a emergência, e aproximadamente 5 cm entre plantas. As mudas de alface e brócolis foram crescidas em substrato a base de composto orgânico.



**Figura 5.1** Desenho esquemático da disposição das parcelas e blocos, destacando as parcelas colhidas do experimento.

Os cultivos foram conduzidos entre Junho 2013 e Maio de 2014, na região de Teresópolis, Estado do Rio de Janeiro, no Rancho São Francisco de Paula (22° 18' 11" Sul, 42° 52' 33" Oeste), à altitude de 900 m, clima subtropical úmido (Cwa, Classificação Köppen–Geiger), com precipitação média anual de 1880 mm, médias de temperaturas

máximas e mínimas entre 14 a 27 e 7 a 20 °C, respectivamente (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia; www.intemet.gov.br).

As colheitas da alface, cenoura e brócolis foram realizadas aos 61 (29/08/2013), 66 (03/12/2013), e 92 (02/05/2014) dias, respectivamente, após plantio das mudas (alface e brócolis) ou sementeira (cenoura). As plantas foram colhidas para determinação da produtividade, com pesagem em balança digital, desconsiderando as bordas extremas (35 cm de cada extremidade da parcela), resultando em uma área colhida por parcela de 1,30 m<sup>2</sup>. Os valores de produtividade (massa fresca e matéria seca) apresentados foram corrigidos para g ou kg m<sup>-2</sup>. Apenas uma planta por parcela foi utilizada como amostra para análise de tecido foliar (N total em analisador elementar) e determinação de  $\delta^{15}\text{N}$ . Folhas novas e velhas foram coletadas para formar uma amostra composta da parte aérea das plantas. Para cenoura amostra foi o terço médio da raiz cônica, escolhida aleatoriamente. Amostras de solo (0-20 cm) foram coletadas com trado tipo holandês antes do plantio da alface.

Um defeito na irrigação forçou a eliminação de um bloco do cultivo de Alface. A ocorrência de fortes chuvas durante o cultivo de cenoura, com subsequente alagamento de um dos blocos e sua eliminação, forçou a colheita antecipada para evitar a perda total. No cultivo de brócolis a ocorrência de formigas também forçou a eliminação de um bloco inteiro, e outras parcelas foram perdidas nos demais blocos, o que resultou em apenas duas informações ( $n = 2$ ) por dose.

O composto orgânico produzido a partir da compostagem de cama de esterco de cavalo e sobras de hortaliças, principalmente folhas de alface apresentou 370 kg m<sup>-3</sup> de densidade (base úmida), 50 % de umidade (g g<sup>-1</sup>), N-total = 1,4 ± 0,1 % e C:N = 12,8 ± 0,6 ( $n = 5$ ). A análise química do composto é apresentada na Tabela 5.1. A incorporação do composto ao solo foi feita apenas uma vez dois dias antes do plantio da alface (29/06/2013). A Tabela 5.2 apresenta os resultados da análise física e química do solo da área do experimento. As composições isotópicas do solo e do composto foram  $\delta^{15}\text{N} = 12,3 \pm 0,4 \text{ ‰}$  e  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$ , respectivamente.

**Tabela 5.1** Análise química e umidade do composto orgânico ( $n = 3$ ).

Parâmetros	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	P	K
	mg kg <sup>-1</sup>							g kg <sup>-1</sup>
Média	21388	4750	74	5621	399	218	10146	25,9
CV (%)	8	4	9	11	10	8	5	4
Parâmetros	C	N	C:N	Umidade	pH H <sub>2</sub> O			
	g kg <sup>-1</sup>			% (g g <sup>-1</sup> )				
$n = 5$								
Média	179	14	12,8	50	8,0			
CV (%)	7	7						

**Tabela 5.2** Características químicas e granulometria de amostras de solo (0-20 cm) do experimento, textura franco-argiloarenosa ( $n = 4$ ).

Parâmetros	Ca	Mg	H+Al	Al	S	T	V	pH H <sub>2</sub> O
	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>						%	
Média	4,79	1,65	1,28	0	8,01	9,28	86,28	6,51
CV (%)	15	28	21	0	12	12	2	4
Parâmetros	K	P	N total	C total	C-org	Areia	Silte	Argila
	mg dm <sup>-3</sup>				g kg <sup>-1</sup>			
Média	501	16,94	0,94	7,3	5,14	470	242	287
CV (%)	36	12	13	10	8	11	16	19

## 4.2 Métodos Analíticos

As amostras de solo foram processadas (terra fina) e secas a 40°C em estufa e as amostras e composto orgânico e plantas foram secas em estufa com circulação de ar a 60°C por 72 horas ou até peso constante. As análises químicas foram realizadas pelo Laboratório de Análise de Plantas Solo e Água (LASP), na Embrapa Solos, exceto a determinação de  $\delta^{15}\text{N}$  que foi realizada pelo Laboratório John Day de Isótopos Estáveis, na Embrapa Agrobiologia.

As amostras de solo foram analisadas conforme os métodos descritos no Manual de Análise de Solo da Embrapa (Donagemma et al., 2011), sendo: pH em suspensão solo:água 1:1,25; Al trocável por extração com solução KCl 1 mol L<sup>-1</sup> e determinação volumétrica com solução diluída de NaOH; Ca, Mg por extração com solução KCl e determinação complexiométrica em presença de indicadores; K por extração com solução diluída de ácido clorídrico e posterior determinação por espectrofotometria de chama; Acidez trocável (H + Al) por solução não tamponadas de KCl; Cu, Fe, Mn Zn por extração através de solução quelante (DTPA) ou solução mista de ácidos e espectrofotometria de absorção atômica; P assimilável por formação de complexo fósforo-molibdico obtido após redução do molibdato com ácido ascórbico e determinação por espectroscopia de absorção molecular (EAM); e granulometria (dispersão total) pelo método do densímetro. Carbono total e nitrogênio total foram determinados por analisador elementar (Perkin-Elmer CHNS/O Series II 2400).

As análises das amostras de composto orgânico seguiram os métodos descritos no Manual de análise químicas de solos, plantas e fertilizantes da Embrapa (Silva, 2009), sendo pH em suspensão sólido:água 1:1,25; elementos P, Ca, Mg, P, Ca e Mg foram determinados por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Perkin Elmer), e o K foi determinado por fotômetro de chama; carbono total e nitrogênio total foram determinados no analisador elementar. As amostras de plantas foram analisadas apenas para nitrogênio total no analisador elementar (Perkin-Elmer CHNS/O Series II 2400).

A análise isotópica de <sup>15</sup>N seguiu a metodologia descrita no item 3.3., capítulo IV.

## 4.3 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média e desvio padrão, salvo onde for indicado diferente. Previamente à análise de variância dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  os dados foram testados quanto à distribuição normal (Teste de Anderson–Darling) e igualdade de variância (Testes de Barnett e Levene). O teste de Dunnett foi empregado para checar a significância das diferenças entre médias de valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . Quando pertinente outro teste de separação de médias foi utilizado e mencionado especificamente no texto. O nível de significância escolhido foi 5% ( $\alpha = 0,05$ ), salvo onde indicado diferente. O programa estatístico Minitab 17 (Minitab Inc.) foi empregado para realizar as análises e o Origin 6.0 (Microsoft) foi empregado para confeccionar os gráficos e as análises de regressão e correlação.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resposta às Doses de Composto Orgânico

As produções de massa fresca (MF) colhida são apresentadas, já convertidas para  $\text{kg m}^{-2}$ , separadamente para cada hortaliça na Tabela 5.3. O coeficiente de variação (CV) para alface foi elevado, na média 38 % (dentro da dose). Para cenoura os CV's foram menores, com uma média entre 13 e 18 % para folha e raiz, respectivamente, porém algumas doses tiveram CV mais elevado, similar à alface. Para brócolis, considerando o conjunto completo das observações, o  $\text{CV} = 27 \%$ .

As curvas de resposta às doses de composto orgânico foram diferentes para cada hortaliça. A alface não respondeu às doses de composto enquanto a cenoura e o brócolis tiveram incremento de produção de massa fresca com o aumento das doses de composto. A curva de resposta para cenoura se ajusta, com alta significância, a uma função quadrática ( $r^2 = 0,99$ ,  $P < 0,0001$ ), com máxima resposta estimada para produção de raiz em  $4,5 \text{ kg m}^{-2}$  de composto orgânico, base úmida. Apesar da curva de resposta do brócolis também se ajustar bem a uma função quadrática ( $r^2 = 0,76$ ,  $P = 0,053$ ), a curva de resposta do brócolis pode ser representada também por uma função descontínua linear com platô (*Linear Response Plateau*) (Cantarutti et al., 2007).

A falta de resposta da alface às doses de composto pode ser atribuída à imobilização microbiana de N ou ao fato do solo já suprir suficiente N ao crescimento da planta. Porém, não seria esperado o efeito de imobilização microbiana devido à baixa C:N ( $12,8 \pm 0,6 \%$ ) do composto orgânico incorporado ao solo.

**Tabela 5.3** Produção de massa fresca ( $\text{g m}^{-2}$ ) para alface americana, cenoura e brócolis ramoso cultivados após incorporação de composto orgânico em doses crescentes.

Cultivos <sup>a</sup>	Doses ( $\text{kg m}^{-2}$ ) <sup>b</sup>					
	0	1	2	3	4	5
Alface	1360 ± 421	1008 ± 312	840 ± 373	752 ± 336	1080 ± 507	1224 ± 426
Cenoura						
Raiz	117 ± 11	368 ± 158	600 ± 175	704 ± 11	760 ± 177	744 ± 29
Folhas	153 ± 53	502 ± 159	822 ± 146	1097 ± 10	1054 ± 98	840 ± 43
Brócolis	2840	6584	8440	8184	7280	8184

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP),  $n = 3$ . Ausência de DP,  $n = 2$ .

<sup>a</sup> Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface.

<sup>b</sup> Doses em base úmida, composto orgânico com 50% de umidade (g/g) e C:N = 12,8, N = 1,4. Doses crescentes de N correspondentes: 0, 7, 14, 21, 28, 35  $\text{kg m}^{-2}$ .

## 5.2 Balanço de Nitrogênio

A Tabela 5.4 apresenta os dados de produtividade (matéria seca), teores de N e N total colhido para cada cultura e em cada dose de composto orgânico.

**Tabela 5.4.** Produtividade, teores de nitrogênio (N) no tecido vegetal e total de N colhido de cultivos sequenciais de alface americana, cenoura e brócolis ramoso em função das doses de composto orgânico.

Doses <sup>a</sup> (g N m <sup>-2</sup> )	Produtividade		Teor de N g kg <sup>-1</sup>	N colhido g m <sup>-2</sup>
	Base úmida	Base seca		
	g m <sup>-2</sup>			
<b>Alface<sup>b</sup></b>				
0 (0)	1360	68,0	41,1	2,79
1 (7)	1008	50,4	42,5	2,14
2 (14)	840	42,0	41,8	1,76
3 (21)	752	37,6	46,6	1,75
4 (28)	1080	54,0	46,4	2,51
5 (35)	1224	61,2	47,4	2,90
<b>Cenoura<sup>c</sup></b>				
0 (0)	117	9,9	15,7	0,155
	153	12,6	41,3	0,522
1 (7)	368	30,9	15,8	0,488
	502	41,6	40,6	1,687
2 (14)	600	50,4	18,8	0,948
	821	67,8	42,2	2,859
3 (21)	704	59,1	24,0	1,419
	1097	90,5	41,5	3,755
4 (28)	760	63,8	21,3	1,363
	1054	87,0	48,2	4,188
5 (35)	744	62,5	22,6	1,413
	840	69,3	40,3	2,793
<b>Brócolis<sup>d</sup></b>				
0 (0)	2130	175,7	45,9	8,07
1 (7)	4938	407,4	63,9	26,04
2 (14)	6330	522,2	53,9	28,17
3 (21)	6138	506,4	55,7	28,22
4 (28)	5460	450,4	47,1	21,22
5 (35)	6138	506,4	52,8	26,74

<sup>a</sup> Doses de composto em kg m<sup>-2</sup>, base úmida, 50% de umidade (g/g); C:N =12,8; base seca.

<sup>b</sup> Colheita em 62 dias após plantio de mudas.

<sup>c</sup> Raiz na primeira linha, folhas na segunda linha, dentro de cada dose. Colheita precoce em 66 dias após semeadura.

<sup>d</sup> Colheita em 92 dias após plantio de mudas.

O teores médios de N (g kg<sup>-1</sup>, base seca, média e desvio padrão) da alface e da cenoura (raiz) variaram com as doses de composto (GLM,  $\alpha = 0,05$ ) de  $4,1 \pm 0,05$  (D0) a  $4,7 \pm 0,27$  (D5) para alface, de  $1,6 \pm 0,34$  (D0) a  $2,4$  (D3) para cenoura-raiz. Nesses dois cultivos houve um crescimento nas médias desses teores até um platô a partir da D3 (Tabela 5.4). Para cenoura-folha (média geral =  $4,2 \pm 0,52$ ) e para brócolis (média geral =  $5,4 \pm 1,16$ ) não houve

variação significativa com as doses de composto (GLM,  $\alpha = 0,05$ ). Os teores de N das plantas cultivadas estão dentro da faixa dos valores de referência para interpretação de resultados de análise de tecido vegetal (Cantarutti et al, 2007), isto é, em nenhum nível (dose) as plantas apresentaram deficiência em N. O N colhido ( $\text{g m}^{-2}$ ) pelos três cultivos somados (alface, cenoura e brócolis) foi de 11,6 (D0); 30,4 (D1); 33,7 (D2); 35,1 (D3); 29,3 (D4) e 33,9 (D5). A proporção do N colhido entre as culturas foi de 80 %, 12 % e 8 %, para brócolis, cenoura e alface, respectivamente. A maior produção de matéria seca aliada ao maior teor de N no tecido vegetal do brócolis resultaram na maior proporção de N colhido.

### 5.3 Variação nos Valores de $\delta^{15}\text{N}$

As variações nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  foram similares para cada hortaliça sugerindo a influência da assinatura do N do composto orgânico ( $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \text{ ‰}$ ,  $n = 2$ ) em comparação com o N fornecido pelo solo ( $\delta^{15}\text{N} = 12,4 \pm 0,4 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) (Tabela 5.5).

**Tabela 5.5** Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  / ‰ para alface americana, cenoura e brócolis ramoso cultivados após incorporação de composto orgânico em doses crescentes.

Cultivos <sup>a</sup>	Doses de composto ( $\text{kg m}^{-2}$ ) <sup>b</sup>					
	0 <sup>c</sup>	1	2	3	4	5
Alface	12,4	12,3 ± 1,0	14,3 ± 0,8	13,2 ± 0,2	13,8 ± 1,4	13,5 ± 0,2
Cenoura						
Raiz	11,7 ± 0,4	11,6 ± 0,8	12,8 ± 0,4	12,9	12,6 ± 0,2	12,7
Folhas	11,8 ± 0,2	12,4 ± 0,9	12,7 ± 0,7	12,8	13,4 ± 0,8	12,8
Brócolis	11,9	12,8	13,1	12,1	12,4	12,6

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP),  $n = 3$ . Ausência de DP,  $n = 2$ .

<sup>a</sup> Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface.

<sup>b</sup> Doses em base úmida, composto orgânico com 50% de umidade (g/g);  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \text{ ‰}$ .

<sup>c</sup> Solo:  $\delta^{15}\text{N} = 12,4 \pm 0,4 \text{ ‰}$ .

As assinaturas de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas das parcelas com dose zero (D0) representam a influência da assinatura do N inorgânico do solo extraído pelas plantas. Pode-se assumir que nessas parcelas (D0) 100% do N da planta provém do solo. A diferença entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas dessas parcelas e o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo (N total do solo) representa o fracionamento isotópico (médio) que ocorre devido ao processo de transformação de N no solo (nitrificação e desnitrificação) e na assimilação pela planta. As plantas (alface, cenoura e brócolis) colhidas nas parcelas D0 tiveram médias que não diferiram estatisticamente (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ). O mesmo aconteceu quando os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  foram comparados nível a nível, exceto para a D3 (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ), com diferença estatística entre as médias de alface e brócolis (Teste Tukey). A média geral os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  considerando todos os cultivos juntos para a D0 ( $11,9 \pm 0,6 \text{ ‰}$ ,  $n = 10$ ) não diferiu estatisticamente (t-Teste para duas amostras,  $\alpha = 0,05$ ) do valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo ( $12,3 \pm 0,4 \text{ ‰}$ ,  $n = 4$ ). Também não houve diferença estatística (t-Teste para duas amostras,  $\alpha = 0,05$ ) dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de cada hortaliça comparados à assinatura do solo. Pode-se dizer que o fator de fracionamento isotópico (médio) foi  $\alpha = 1,005$  ( $11,9 - 12,4 = -0,5 \text{ ‰}$ ), ou próximo a zero já que as médias não diferiram estatisticamente. Assume-se aqui que este fracionamento ocorreria na mesma magnitude e direção se apenas o composto orgânico fosse fonte de N.

#### 5.4 Relação entre $\delta^{15}\text{N}$ e o Fornecimento de N pelo Composto

Os valores de  $\delta^{15}\text{N} / \text{‰}$  variaram com as doses crescentes de composto similarmente aos incrementos de produtividade ( $\text{kg m}^{-2}$ ) da cenoura e do brócolis (Figura 5.3 e 5.4), exceto para alface (Figura 5.2). As correlações de Pearson entre valores de  $\delta^{15}\text{N} / \text{‰}$  das plantas e a produção (MF, em g) foram positivas e significativas para cenoura-raiz ( $R = 0,88$  e  $P = 0,02$ ) e cenoura-folha ( $R = 0,76$  e  $P = 0,08$ ), porém, foi menos significativa para brócolis ( $R = 0,62$  e  $P = 0,19$ ), e não significativo para alface ( $R = -0,43$  e  $P = 0,40$ ). Os gráficos dos valores normalizados (escala de 0 a 1) para produção e  $\delta^{15}\text{N}$  demonstraram claramente estas correlações. Para cenoura (raiz e folhas) os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  acompanharam o incremento da produção de forma evidente, enquanto, para brócolis esta tendência é forte até a dose 2 apenas, e para alface não há qualquer padrão de covariação.

Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  na planta com aplicação de composto que sejam acima da média obtida sem aplicação de composto (D0) são interpretados como resultado da influência do N do composto ( $\delta^{15}\text{N}$  mais positivo) assimilado pela planta. O valor  $\delta^{15}\text{N}$  da planta é interpretado como média de todo o N assimilado pela planta, ou seja, N-composto e N-solo. Portanto, quanto mais próximo do valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do composto maior a proporção de N-composto em relação ao N-solo no tecido da planta. Se apenas o composto fosse a fonte de N, espera-se valores do  $\delta^{15}\text{N}$  para as plantas não diferentes (estatisticamente) da assinatura do composto (Inácio et al., 2015b). No entanto, seria recomendada para confirmação desta premissa a determinação deste fracionamento via cultivo da planta em condições controladas em que o composto orgânico é única fonte de N. Isto é similar ao que é realizado para a determinação do valor  $B$  (fracionamento da fixação biológica) para cálculo da proporção do N atmosférico ( $P_{atm}$ ) em plantas que fixam  $\text{N}_2$  em associação com bactérias (Unkovich et al., 2008).

Para alface, pode-se atribuir que a baixa correlação entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e a produção reflete a falta de resposta às doses de composto orgânico, ou seja, que de fato o N fornecido pelo composto orgânico para alface, mesmo nas doses mais altas, não resultou em incremento de produção. A imobilização de N do solo ou a irrigação deficiente podem ter contribuído para isso, mas não foi possível definir o fator ou fatores envolvidos na falta de resposta ao composto aplicado.

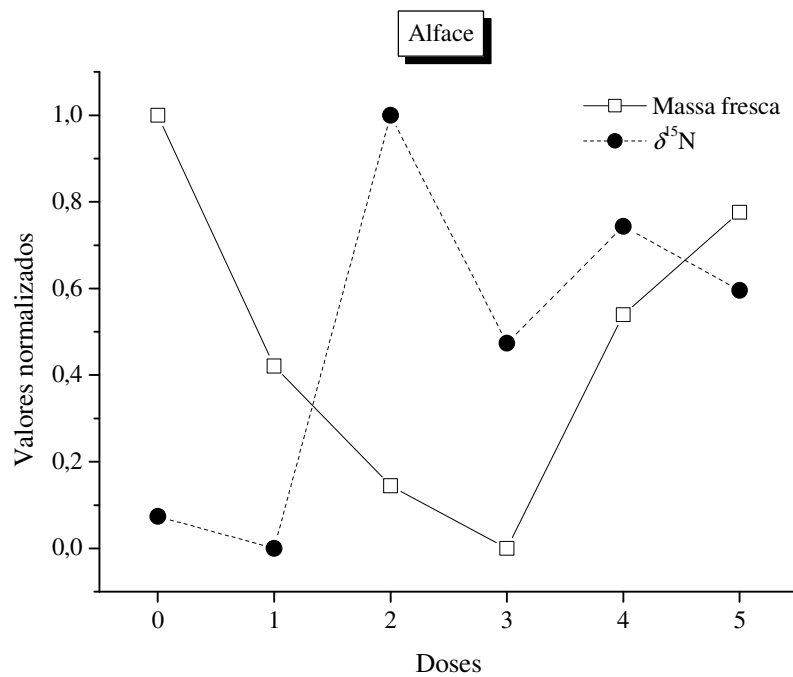
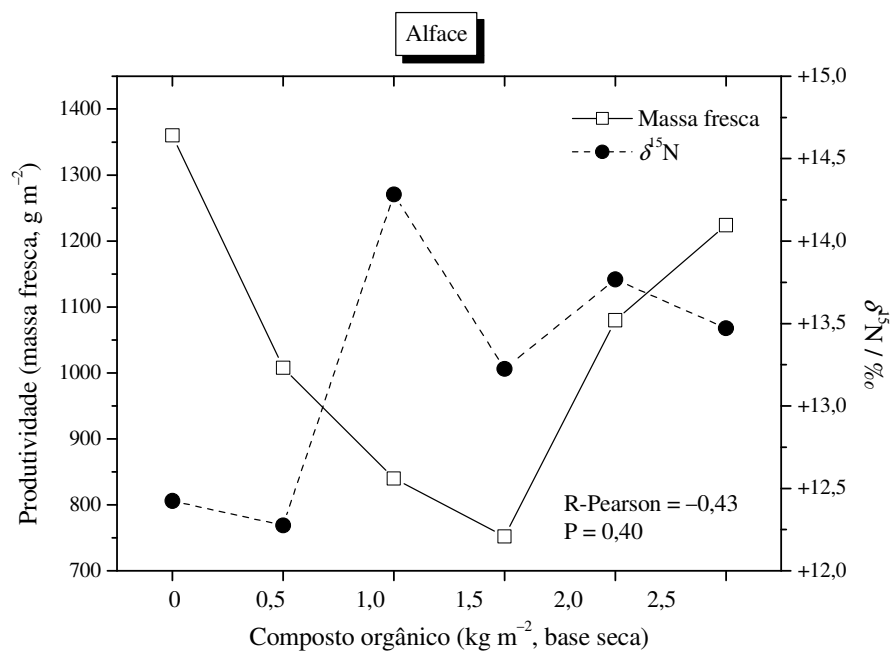
Para cenoura, a correlação encontrada indica que a variação nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da cenoura representa o aproveitamento do N do composto pela planta. A curva de produção se ajusta a uma função quadrática (ver Item 4.1), porém a função descontínua de platô linear melhor representaria o ajuste para os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da cenoura. A diferença entre as curvas ajustadas sugere uma hipótese: que nas doses maiores que D2 (ponto aproximado do início do platô para os valores de  $\delta^{15}\text{N}$ ), os ganhos de produção não se devem ao fornecimento de N do composto orgânico. Esses fatores podem ser relativos, por exemplo, aos atributos físicos do solo (retenção de água) alterados pelas doses mais altas de composto orgânico (Celik et al., 2004), ou mesmo, efeitos atribuídos às substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento (Canellas et al., 2014). Yun e Ro, (2009) trabalhando com couve-chinesa, em um experimento em potes e doses muito mais elevadas (0, 1000, 2000, 3000  $\text{kg N ha}^{-1}$ ) de composto orgânico (serragem + esterco de suíno;  $\delta^{15}\text{N} = +16,2 \text{‰}$ ), encontraram o aumento curvilíneo dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  nas folhas com o aumento das doses de composto. Porém, não houve diferença estatística entre as duas doses mais altas, indicando que o N inorgânico do solo mineralizado da fração orgânica lábil do composto poderia estar em excesso.

Apesar da discrepância da magnitude das doses aplicadas, a variação curvilínea dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  é similar ao encontrado para cenoura e brócolis (Fig. 5.3). Yuan et al. (2014)

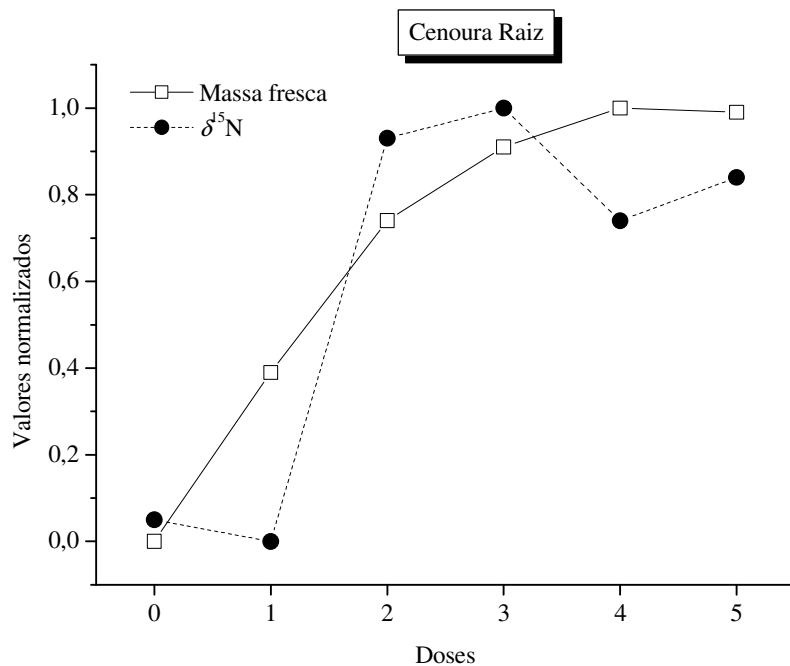
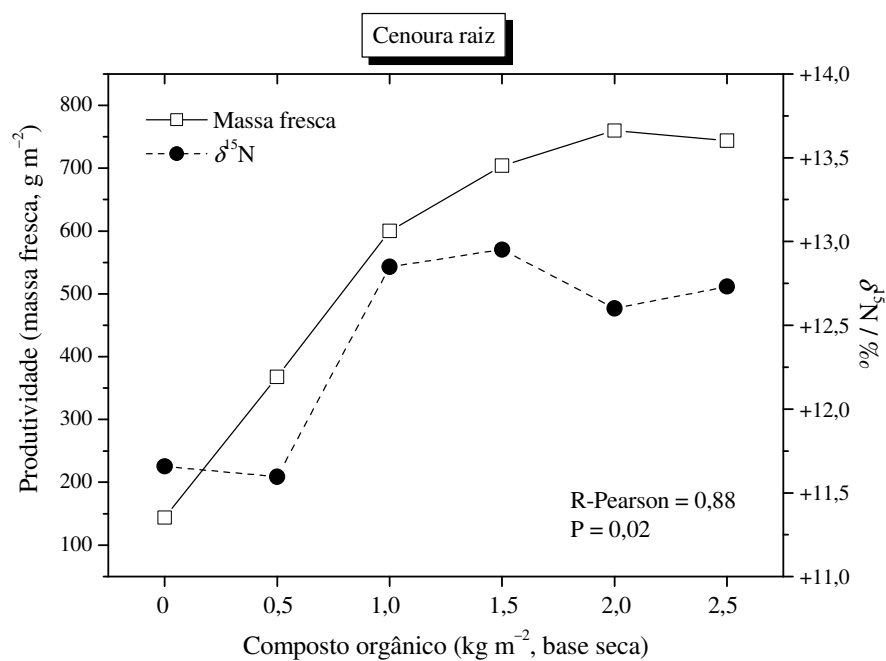
também observaram que os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de couve-chinesa, em três cultivos seguidos, não foram estatisticamente diferentes para duas doses (75 e 150 kg N ha<sup>-1</sup>) de composto de esterco de galinha e fertilizante mineral, e apontaram como razão o possível excesso de composto ou fertilizante nas condições do experimento (potes).

A produção de brócolis respondeu as doses de composto e o aumento concomitante dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  até a D3 evidenciou o aproveitamento pela planta do N fornecido do composto. A correlação de Pearson para produção e valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do brócolis apenas nas D0 a D3 foi alta e significativa ( $R = 0,997$ ;  $P = 0,047$ ). No entanto, a redução nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  acima da D3, resulta no enfraquecimento desta correlação. A diferença entre as assinaturas de  $\delta^{15}\text{N}$  entre as folhas internas e externas da planta devido à translocação de N (fracionamento isotópico) e ao fato dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das folhas refletirem a assinatura das fontes de N ( $\delta^{15}\text{N}$  diferentes) em diferentes estágios de crescimento (Yun; Ro, 2009), pode ter sido uma fonte de erro importante, no caso do brócolis. Esta diferença entre as partes da planta (couve-chinesa) chegou a +7,5 ‰ sob aplicação de composto em comparação com uma diferença de +4,8 no controle (Yun; Ro, 2009). Soma-se a isso o insuficiente número de amostras ( $n = 2$ ) devido à perda de parcelas resulta em uma incerteza (erro) elevada; e/ou devido à variabilidade espacial (em profundidade) de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo (Peoples et al., 2015).

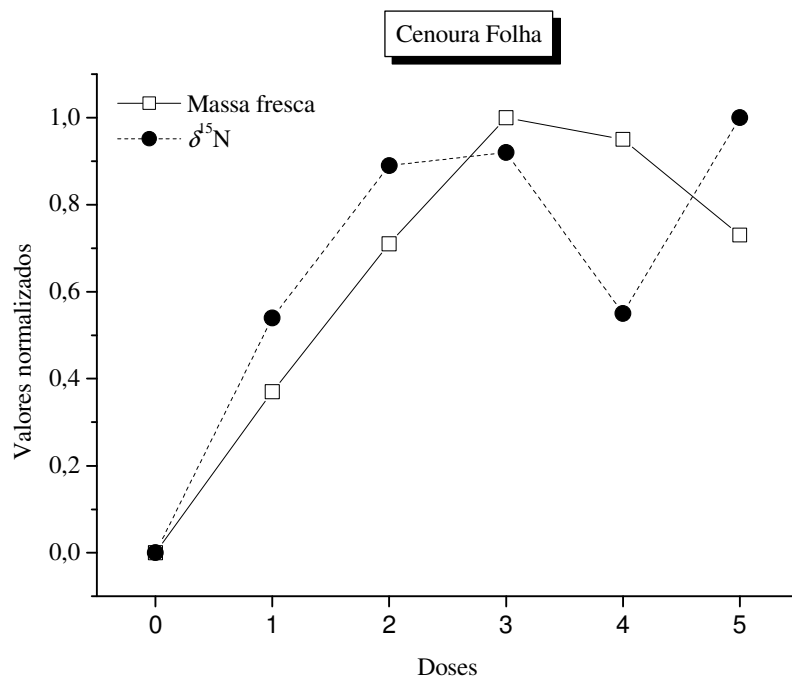
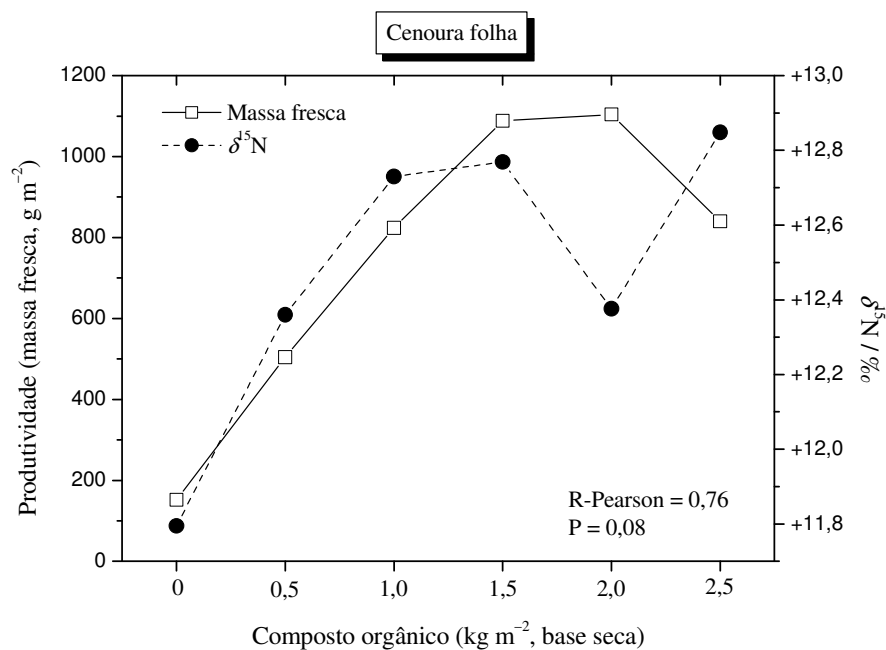
Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas tenderam ao ajuste a curvas lineares descontínuas em platô indicando o limite de contribuição proporcional do N do composto. Diferentemente do brócolis, para cenoura o platô dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  não coincidiu com a dose estimada de maior resposta (quadrática). Isto pode ser o indicativo que parte do incremento de produção da cenoura, que não foi acompanhado de variação similar dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , foi devido a outros fatores que não o fornecimento de N pelo composto.



**Figura 5.2** Correlação da produção de massa fresca e valores de  $\delta^{15}\text{N}$  / ‰ de alface americana em função das doses de composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ , base seca) e doses equivalentes em nitrogênio ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ): 0 (0), 0,5 (10), 1,0 (140), 1,5 (210), 2,0 (280), 2,5 (350). Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface. Composto orgânico,  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2$  ‰; solo,  $\delta^{15}\text{N} = 12,4 \pm 0,4$  ‰.

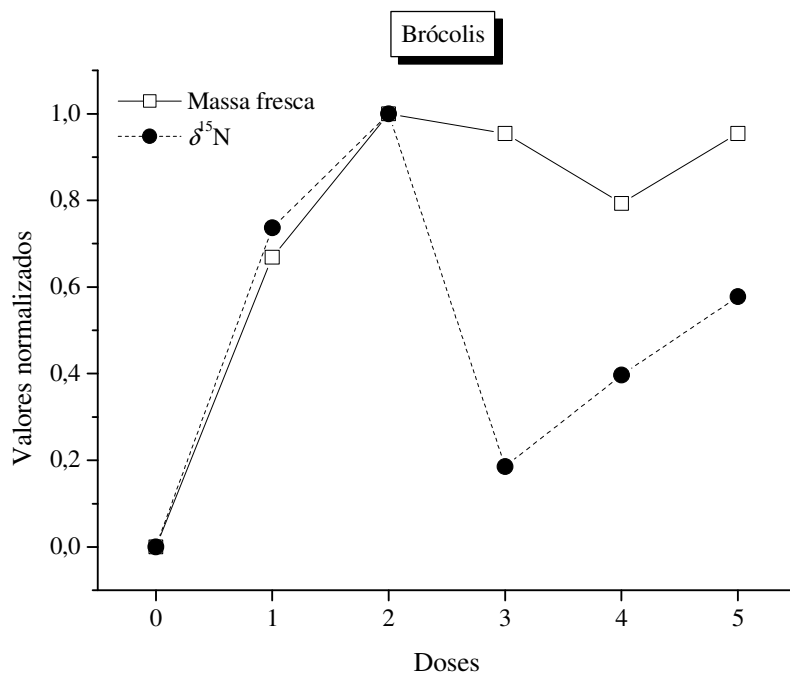
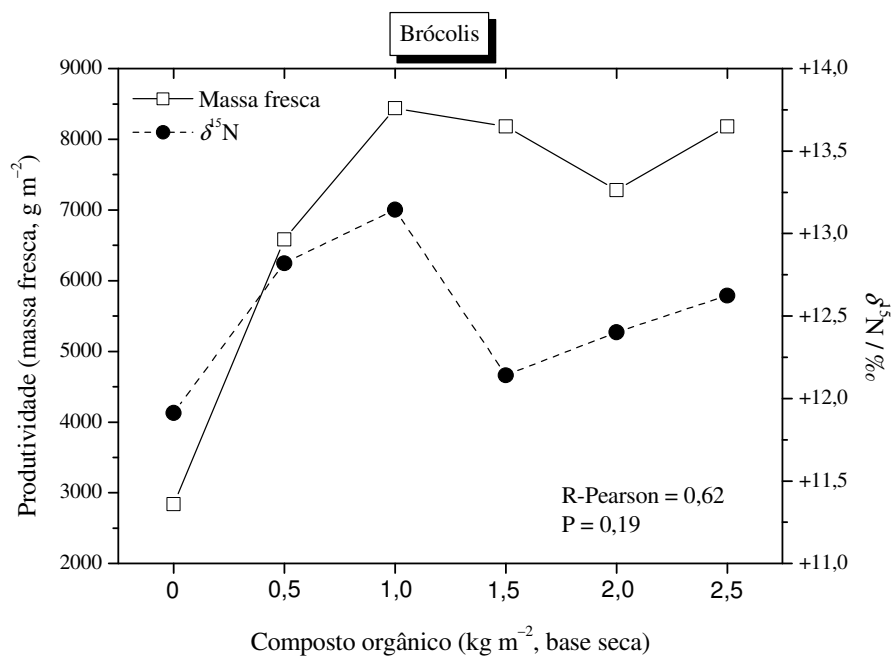


**Figura 5.3A** Correlação da produção de massa fresca e valores de  $\delta^{15}\text{N} / \text{‰}$  de cenoura em função das doses de composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ , base seca) e doses equivalentes em nitrogênio ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ): 0 (0), 0,5 (10), 1,0 (140) 1,5 (210) 2,0 (280), 2,5 (350). Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface. Composto orgânico,  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2 \text{‰}$ ; solo,  $\delta^{15}\text{N} = 12,4 \pm 0,4 \text{‰}$ .



**Figura 5.3B** Correlação da produção de massa fresca e valores de  $\delta^{15}\text{N}$  / ‰ de cenoura em função das doses de composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ , base seca) e doses equivalentes em nitrogênio ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ): 0 (0), 0,5 (10), 1,0 (140) 1,5 (210) 2,0 (280), 2,5 (350). Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface. Composto orgânico,  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2 \text{‰}$ ; solo,  $\delta^{15}\text{N} = 12,4 \pm 0,4 \text{‰}$ .





**Figura 5.4** Correlação da produção de massa fresca e valores de  $\delta^{15}\text{N}$  / ‰ de brócolis em função das doses de composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ , base seca) e doses equivalentes em nitrogênio ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ): 0 (0), 0,5 (10), 1,0 (140) 1,5 (210) 2,0 (280) , 2,5 (350). Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface. Composto orgânico,  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$ ; solo,  $\delta^{15}\text{N} = 12,4 \pm 0,4 \text{ ‰}$ .

## 5.5 Estimativa da Contribuição das Fontes de N

A estimativa de contribuição do composto orgânico como fonte de N utilizando os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  baseou-se nas seguintes premissas:

- (i) Existe relação positiva e linear entre o  $\delta^{15}\text{N}$  da planta e a proporção de N derivado do fertilizante orgânico, quando  $\delta^{15}\text{N-planta} \neq \delta^{15}\text{N-solo}$ .
- (ii) O fracionamento isotópico entre N-solo e N-planta é igual ao que ocorre entre N-composto e N-planta.
- (iii) O fracionamento isotópico é dado pela diferença entre o  $\delta^{15}\text{N-solo}$  e o  $\delta^{15}\text{N-planta}$  cultivada sem adição do fertilizante orgânico.

Com os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  estimou-se a proporção de N da planta que é derivada do composto orgânico ( $P_c$ ) conforme a Equação 5.1.

$$P_c = \frac{\delta_{planta+} - \delta_{planta-}}{\delta_{composto} - \delta_{solo}} \quad (5.1)$$

Onde;

$\delta_{planta+}$  =  $\delta^{15}\text{N}$  da planta da parcela com composto orgânico,

$\delta_{planta-}$  =  $\delta^{15}\text{N}$  da planta nas parcelas sem composto orgânico,

$\delta_{composto}$  =  $\delta^{15}\text{N}$  do composto orgânico, e,

$\delta_{solo}$  =  $\delta^{15}\text{N}$  do solo.

Portanto, considerou-se uma escala entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas na dose 0 (apenas N do solo) e o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do composto orgânico (apenas N do composto). Assim, pode-se assumir que se o N do composto fosse a única fonte para as plantas, e não havendo fracionamento isotópico (médio) relevante ( $< \pm 0,5 \%$ ), as plantas teriam um valor médio estatisticamente não diferente de  $\delta^{15}\text{N} = 15,5 \pm 0,2 \%$ , que é o sinal isotópico do composto. As estimativas para cada cultivo em cada dose são apresentadas na Tabela 5.6.

**Tabela 5.6** Proporção calculada (%) do nitrogênio total da planta oriundo do composto orgânico ( $P_c$ ), em função das diferentes doses aplicadas.

Cultivos <sup>a</sup>	Doses de composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ ) <sup>b</sup>					Média
	1	2	3	4	5	
Alface	-5	60	26	43	34	32
Cenoura						
Raiz	-2	38	42	30	35	29
Folhas	18	30	31	19	34	27
Brócolis	29	40	7	16	23	23

Nota: Valores calculados utilizando a Equação 5.1.

<sup>a</sup> Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface.

<sup>b</sup> Doses em base úmida, 50% de úmida ( $\text{g g}^{-1}$ ).

Com a Equação 5.2 pode-se estimar a recuperação do N aplicado como fertilizante orgânico (composto orgânico) pela planta (%NRec).

$$\%NRec = \frac{P_c \times N_{colhido}}{N_{aplicado}} \times 100 \quad (5.2)$$

Onde,

$P_c$  = proporção de N da planta derivada do composto orgânico (Eq. 5.1)

$N_{colhido}$  = Total de N colhido no cultivo ( $\text{kg m}^{-2}$ ),

$N_{aplicado}$  = Total de N aplicado com o composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ ),

O cálculo da %NRec pela Equação 5.2 resultou em valores médios que variaram de 3 a 8 para alface, e 4 a 9 % para cenoura (raiz + folhas), e entre 9 a 18 % para brócolis. Porém, os cálculos de %NRec resultaram também em valores irrealistas negativos, mas próximo de zero, para alface na dose 0, e valores > 100 % para brócolis. Sendo os cultivos consecutivos, tem-se: %NRec entre 19 % a 25 %, entre as doses 3 a 5. Considerando apenas a alface e a cenoura, temos: %NRec variando de 7 a 10 % (Tabela 5.7). Porém, os dados para o cultivo de brócolis devem ser tomados com cautela devido à insuficiência de dados ( $n = 2$ ) causada pela perda de parcelas e pelas hipóteses de fontes de erro já discutidas no item 4.4.

**Tabela 5.7** Recuperação do nitrogênio (N) do composto orgânico que foi aproveitado pela planta (%NRec), em aplicação de doses crescentes.

Cultivos <sup>a</sup>	Doses de composto orgânico ( $\text{kg m}^{-2}$ ) <sup>b</sup>					Média
	1	2	3	4	5	
Alface	-2%	8	2	4	3	3,4 <sup>d</sup>
Cenoura <sup>c</sup>	4	9	8	4	4	5,8
Brócolis	108	80	9	12	18	13,0 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Cultivos em sequência, aplicação única de composto orgânico antes do plantio da alface.

<sup>b</sup> Doses em base úmida, 50 % ( $\text{g g}^{-1}$ ).

<sup>c</sup> Raiz e folhas

<sup>d</sup> Média calculada com 0 % para dose 1.

<sup>e</sup> Média calculada excluindo valores não realistas calculados das doses 1 e 2.

As estimativas de %NRec estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura sobre  $^{15}\text{N}$  recuperado com uso de composto orgânico marcado, isto é, valor médio de 10,7 % (3,8 a 26,8 %) para hortaliças e grãos, excluindo arroz irrigado que alcança valores de recuperação próximos a 30% (Chalk et al., 2013). Ebid et al (2008) estudando três cultivos consecutivos de hortaliças (colheita com 40 dias) encontrou valores de recuperação de  $^{15}\text{N}$  entre 6,6 e 7,3 % (1º cultivo), 1,8 e 2,7 % (2º cultivo) e 1,7 e 2,3 % (3º cultivo) para couve-japonesa e acelga chinesa, respectivamente, aplicando composto de resíduos de milho (1.098 fração atômica de  $^{15}\text{N}$ , C:N 12,1 e N = 2,9 %) em um experimento em potes ( $\pm 0,6 \text{ kg m}^{-2}$ ;  $\pm 18,3 \text{ kg N m}^{-2}$ , base seca) em casa de vegetação. No entanto, a recuperação de  $^{15}\text{N}$  para rabanete ficou entre 0,7 e 2,3 %. Para as três hortaliças o N total colhido decresceu do primeiro para terceiro cultivo.

O modelo aqui proposto (Eq. 5.1 e 5.2) leva em consideração a variação da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  das plantas cultivadas sem e com composto, e quanto maior a diferença entre o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo e do composto, maior a precisão da estimativa. Portanto, o pequeno intervalo entre as assinaturas do solo e do composto orgânico ( $\pm 3,2\%$ ) foi um fator limitante da precisão das estimativas. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas cultivadas sem composto foram estatisticamente iguais à assinatura do solo, o que permitiu desconsiderar o efeito médio do fracionamento isotópico.

Adicionalmente, o N do solo teve um peso grande ( $\sim 70\%$ ) na nutrição mineral das hortaliças neste experimento e a influência da variabilidade espacial de  $\delta^{15}\text{N}$  no solo (lateral e em profundidade) e do fracionamento isotópico precisam ser estudados para confirmar as premissas adotadas nesta metodologia. Um cuidado adicional deve ser dado à ocorrência de diferenças nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  nas diferentes partes da planta (por ex. folhas novas vs. velhas) para que se obtenham amostras que representem mais fielmente a contribuição relativa das fontes de N (solo e composto) ao longo do ciclo da cultura.

Este trabalho apresenta as bases (teórico e experimental) para o uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para o cálculo da recuperação do N do composto orgânico ou esterco de animais que possuem valores elevados de  $\delta^{15}\text{N}$  em relação ao solo. Não obstante, a verificação da eficácia do uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para estimar a recuperação do N do composto dependerá ainda da condução de experimentos simultâneos com composto enriquecido em  $^{15}\text{N}$  e em abundância natural, similar às comparações das metodologias isotópicas preconizadas para estimar a fixação biológica de N em plantas (Chalk et al., 2016).

## 6 CONCLUSÕES

Os valores de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) das plantas cultivadas foram influenciados pela assinatura do composto orgânico incorporado em diferentes doses ao solo, demonstrando o aproveitamento do N do composto. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  seguiram uma curva de resposta não linear em platô quando houve resposta às doses crescentes de composto. O aumento de produtividade e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas apresentaram correlações positivas e significativas, exceto para alface que não respondeu à adubação com composto.

Uma nova equação é proposta para estimar a recuperação do N do composto pelas hortaliças usando a diferença dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas nas parcelas com e sem aplicação de composto. As estimativas de recuperação de N do composto usando a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  situaram-se dentro da faixa de valores reportados na literatura quando composto orgânico enriquecido artificialmente em  $^{15}\text{N}$  foi empregado.

No entanto, estimativas não realistas foram também calculadas. Fatores como a pequeno intervalo entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo e do composto, o fracionamento isotópico / variação intra-planta, a falta de dados sobre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do N inorgânico do solo e do composto foram fontes de erro e influenciaram a precisão e a variação dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas, resultando em incerteza sobre as estimativas.

Este estudo apresenta as bases teórica e experimental para a utilização dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para estimar a recuperação do N do composto orgânico pela planta. No entanto, a metodologia necessita ser testada em experimentos simultâneos que usem a técnica de abundância natural e a técnica de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  (composto marcado).

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

As variações na abundância natural de isótopos estáveis ( $\delta$ ) permitem uma gama de aplicações na agronomia e ciência do solo. A abordagem alternativa ao uso das variações na abundância natural são os materiais artificialmente enriquecidos isotopicamente, os chamados ‘traçadores’ que são adicionados ao sistema em estudo. O uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) apresenta um potencial ainda pouco explorado para estudos com (i) eficiência de processos de compostagem e estocagem/tratamento de esterco de animais, (ii) eficiência e diferenciação de fertilizantes orgânicos e organominerais, e (iii) diferenciação de modos de produção e/ou regime de fertilização (p.ex. orgânico vs. convencional).

As variações de  $\delta^{15}\text{N}$  durante a compostagem podem ser utilizadas tanto quanto o balanço de massa para estimar as perdas totais de N. No entanto, a incerteza de ambos os métodos permaneceu alta neste estudo. Também, os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  foram úteis na identificação da adição de fertilizantes sintéticos (ex. sulfato de amônio) aos fertilizantes orgânicos e organominerais. Adicionalmente, os fertilizantes orgânicos e os esterco tiveram seus materiais de origem identificados pela assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$ .

A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  foi empregada com relativo sucesso para se estimar a eficiência de uso do N do composto orgânico. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e o incremento da produção em resposta as doses de composto mostrou correlação positiva e significativa, dando suporte experimental para o possível uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  no o cálculo da recuperação do N do composto orgânico. Este modelo leva em consideração a variação da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  das plantas cultivadas sem e com composto, e quanto maior a diferença entre o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo e do composto maior a precisão da estimativa.

Por fim, a diversidade de fontes orgânicas de N disponíveis para a agricultura orgânica e a prática de uso de esterco de animais por produtores convencionais implicam em fatores realmente relevantes que dificultam a diferenciação dos modos de fertilização (tipo de fertilizante). Para diferenciar a produção orgânica da convencional usando o  $\delta^{15}\text{N}$  os vários subgrupos de modo de regime de fertilização devem ser considerados. Além disso, comparações do  $\delta^{15}\text{N}$  do solo, dos insumos orgânicos e da alface funcionaram como ferramenta de análise qualitativa da importância relativa das diferentes fontes de N utilizadas na propriedade orgânica.

## RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA

- A aplicação de técnicas isotópicas nas ciências agrícolas, especificamente a ciência do solo e água e áreas correlatas como a ciência de alimentos, é ainda um campo de grande relevância e oportunidades de avanço científico. Destacam-se algumas linhas de pesquisa que deveriam receber maior atenção no Brasil: (i) estudos de eficiência de fertilizantes orgânicos e adubos-verdes ( $^{15}\text{N}$  e  $^{34}\text{S}$ ), (ii) estudos sobre diferenciação de modos de produção e/ou regime de fertilização baseados em valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (p.ex. orgânico vs. convencional), (iii) estudos sobre a designação da origem geográfica ( $^1\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$  e  $^{34}\text{S}$ ) de produtos agrícolas, e (iv) estudos de origem do fertilizante orgânico.
- O uso das variações dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para estimar a perda de N em processos de compostagem se apresenta como uma ferramenta útil e de grande potencial. É importante que mais dados experimentais sejam gerados, em diferentes escalas (laboratório e campo) e com diferentes tipos de resíduos (principalmente os estercos de animais que possuem elevado potencial de perda de N), para que a precisão das estimativas seja melhorada e a metodologia possa realmente ser aplicável.
- Recomenda-se fortemente que as pesquisas sobre o uso de  $\delta^{15}\text{N}$  para diferenciar produtos orgânicos, convencionais e hidropônicos sejam aprofundadas no Brasil. Dominar esta ferramenta pode abrir mercados que exigem certificação e verificação, como por exemplo, os produtos orgânicos de exportação, p. ex. café, sucos, frutas de mesa, etc.. Além de experimentos controlados para estudar a influência das diferentes fontes orgânicas nas assinaturas das plantas cultivadas deve-se ter a definição de ‘unidades de produção de referência’ e/ou ‘amostras de referência’. A pesquisa exploratória seria útil na formação de um banco de dados sobre as variações dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  dos produtos agrícolas orgânicos e convencionais vendidos no varejo. Aliado a isto, pode-se ter a designação da origem geográfica dos alimentos pela análise de isótopos estáveis, como citado acima.
- O uso da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para estimar a recuperação do N do composto, ou outras fontes orgânicas naturalmente enriquecidas, dependerá ainda da condução de experimentos simultâneos com material enriquecido em  $^{15}\text{N}$  e em abundância natural. No entanto, devido à relativa praticidade de aplicação dessa ferramenta representa frente ao uso de materiais marcados, recomenda-se que experimentos simultâneos, em potes e em campos experimentais, envolvendo diferentes culturas e em solos que permitam mais ampla “escala” de diferença (isto é,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{solo}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{fertilizante orgânico}}$ ) sejam conduzidos. É importante aprofundar o conhecimento sobre os fatores que influenciam as variações das assinaturas das plantas cultivadas quando submetidas à adubação com fontes orgânicas. Fatores estes como a heterogeneidade de  $\delta^{15}\text{N}$  do N inorgânico e os vários processos de fracionamento isotópico que podem ocorrer no solo e na planta nessas condições.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, H., MCTAGGART, I.P., BALL, B.C., SCOTT, A. N<sub>2</sub>O, NO, and NH<sub>3</sub> emissions from soil after the application of organic fertilizers, urea and water. **Water Air and Soil Pollution**, v. 156, p. 113–129, 2004.

ARAÚJO, E. S., MARSOLA, T., MIYAZAWA, M., SOARES, L. H. B., URQUIAGA, S., BODDEY, R. M., ALVES, B. J. R. Calibração de câmara semiaberta estática para quantificação de amônia volatilizada do solo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n. 7, p. 769-776, 2009.

ARAÚJO, E.S., GUERRA, J.G.M., ESPINDOLA, J.A.A., URQUIAGA, S., BODDEY, R. M., MARTELLETO, L.A.P., ALVES, B.J.R. Recuperação no sistema solo-planta de nitrogênio derivado da adubação verde aplicada à cultura do repolho. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, n. 7, p. 729-735, jul. 2011.

ARIZ, I., CRUZ, C., MORAN, J.F., GONZÁLEZ-MORO, M.B., GARCÍA-OLAVERRI, C., GONZÁLEZ-MURUA, C., MARTINS-LOUÇÃO, M.A., APARICIO-TEJO, P.M. Depletion of the heaviest stable N isotope is associated with NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> toxicity in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-fed plants. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 83, 2011.

ASFAHA, D.G., QUÉTEL, C.R., THOMAS, F., HORACEK, M., WIMMER, B., HEISS, G., DEKANT, C., DETERS-ITZELSBERGER, P., HOELZL, S., RUMMEL, S., BRACH-PAPA, C., VAN BOCXSTAELE, M., JAMIN, E., BAXTER, M., HEINRICH, K., KELLY, S., BERTOLDI, D., BONTEMPO, L., CAMIN, F., LARCHER, R., PERINI, M., ROSSMANN, A., SCHELLENBERG, A., SCHLICHT, C., FROESCHL, H., HOOGEWERFF, J., UECKERMANN, H., Combining isotopic signatures of n(<sup>87</sup>Sr)/n(<sup>86</sup>Sr) and light stable elements (C, N, O, S) with multi-elemental profiling for the authentication of provenance of European cereal samples. **Journal of Cereal Science**, v. 53, p.170-177, 2011.

BAHAR, B., MOLONEY, A.P., MONAHAN, F.J., HARRISON, S.M., ZAZZO, A., SCRIMGEOUR, C.M., BEGLEY, I.S., SCHMIDT, O. Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: Implications for isotopic authentication of meat. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 905-913, 2009.

BARRINGTON, S., CHOIMIÈRE, D., TRIGUI, M., KNIGHT, W. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 189-194, 2002.

BATEMAN, A.S., KELLY, S.D. Fertilizer nitrogen isotope signatures. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 43, p. 237-247, 2007.

BATEMAN, A.S., KELLY, S.D., JICKELLS, T.D. Nitrogen isotope relationships between crops and fertilizer: Implications for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regime. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5760-5765, 2005.

BATEMAN, A.S., KELLY, S.D., WOOLFE, M. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 2664-2670, 2007.

BENITES, V. M., CORREA, J. C., MENEZES, J. F. S., Polidoro, J.C., CAMPOS, D. V. B. Production of granulated organomineral fertilizer using pig slurry and poultry litter in Brazil. In: 15th World fertilizer congress of the international scientific centre for fertilizers (CIEC), 2010, 29 August - 2 September 2010, **Proceedings of 15th World fertilizer congress of the international scientific centre for fertilizers (CIEC)**. Bucareste: International scientific centre for fertilizers (CIEC), 2010.

BENNER, R., FOGEL, M.L., SPRAGUE, E.K., HODSON, R.E. Depletion of  $^{13}\text{C}$  in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. **Nature**, v. 329, p. 708-710, 1987.

BERNAL, M.P., LOPEZ-REAL, J.M., SCOTT, K.M. Application of natural zeolites for the reduction of ammonia emissions during the composting of organic wastes in a laboratory composting simulator. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 35-39, 1993.

BIONDI, L., D'URSO, M.G., VASTA, V., LUCIANO, G., SCERRA, M., PRIOLO, A., ZILLER, L., BONTEMPO, L., CAPARRA, P., CAMIN, F. Stable isotope ratios of blood and muscle to trace dietary changes in lambs. **Animal**, v. 7, p. 1559-1566, 2013.

BONER, M., FÖRSTEL H. Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 301–310, 2004.

BONTEMPO, L., LARCHER, R., CAMIN, F., HÖLZL, S., ROSSMANN, A., HORN, P., NICOLINI, G. Elemental and isotopic characterization of typical Italian alpine cheeses. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 441-446. 2011.

BOSTRÖM B, COMSTEDT D, EKBLAD A. Can isotopic fractionation during respiration explain the  $^{13}\text{C}$ -enriched sporocarps of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi? **New Phytologist**, v. 177, p. 1012–1019, 2008.

CAMIN, F., MOSCHELLA, A., MISELLI, F., PARISI, B., VERSINI, G., RANALLI, P., BAGNARESI, P. Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1330-1336, 2007.

CAMIN, F., PERINI, M., BONTEMPO, L., FABRONI, S., FAEDI, W., MAGNANI, BARUZZI, G., BONOLI, M., TABILIO, M.R., MUSMECI, S., ROSSMAN, A., KELLY, S.D., RAPISARDA, P. Potential isotopic and chemical markers for characterizing organic fruits. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1072-1082, 2011.

CAMIN, F., WEHRENS, R., BERTOLDI, D., BONTEMPO, L., ZILLER, L., PERINI, M., NICOLINI, G., NOCETTI, M., LARCHER, R. H, C, N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 54-59, 2012.

CAMIN, F., WIETZERBIN, K., CORTES, A.B., HABERHAUER, G., LEES, M., VERSIN, G. Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian, and Spanish cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6592-6601, 2004.

CAMPOS, D.V.B. de, **Uso da técnica de  $^{13}\text{C}$  e fracionamento físico da matéria orgânica**



**em solos sob cobertura de pastagens e cana de açúcar na região da Mata Atlântica.** 2003 Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, UFRuralRJ, Seropédica, RJ.

CANELLAS, L., OLIVARES, F. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 1:3, 2014.

CANTARUTTI, R.B., BARROS, N.F. de, MARTINEZ, H.E.P., NOVAIS, R.F. XIII – Avaliação da fertilidade do solo e recomendação de fertilizantes. Capítulo XIII. In: Novais, R.F., Alavarez, V.H., Barros, N.F. de, Fontes, R.L.F., Cantarutti, R.B., Neves, J.C.L. (Ed.) **Fertilidade do Solo**. SBCS, Viçosa, MG. 2007. Il., 2007.

CARRIJO, A.S., PEZZATO, A.C., DUCATTI, C., SARTORI, J.R., TRINCA, L., SILVA, E.T. Traceability of bovine meat and bone meal in poultry by stable isotope analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, p. 63-68, 2006.

CELANO, G., ALLUVIONE, F., MOHAMED, M.A.A.A., SPACCINI, R. The stable isotope approach to study C and N sequestration processes in a soil-plant system. In: PICOLO, A (Ed.) **Carbon Sequestration in Agricultural Soils**. Berlin: Springer, 2012. p. 107-144.

CELIK, I., ORTAS, I., KILIC, S., Effects of compost, mycorrhiza, manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxerert soil. **Soil and Tillage Research**, v. 78, p. 59-67, 2004.

CERLING, T.E., HARRIS, J.M, MacFADDEN, B.J., LEAKY, M.G., QUADE, J., EISENMANN, V., EHLERINGER, J.R. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. **Nature**, v. 389, p. 153-158, 1997.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., A.M.T. From fertilizer to food: tracing nitrogen dynamics in conventional and organic farming systems using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. In: HENG, L.K., SAKADEVAN, K., DERCON, G., NGUYEN, M.L. (Eds.). **Proceedings – International Symposium on Managing Soils for Food Security and Climate Change Adaptation and Mitigation**. Rome, Food and Agriculture Organization of United Nations, 2014. p. 339-349.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., BALIEIRO, F.C., ROWS, J.R.C. Do techniques based on  $^{15}\text{N}$  enrichment and  $^{15}\text{N}$  natural abundance give consistent estimates of the symbiotic dependence of  $\text{N}_2$ -fixing plants? **Plant Soil**, v. 399, p. 415-426, 2016.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., URQUIAGA, S., CHEN, D.  $^{13}\text{C}$  isotopic fractionation during biodegradation of agricultural wastes. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 51, p. 201-213, 2015a.

CHALK, P.M., LADHA, J.K. Estimation of legume symbiotic dependence: an evaluation of techniques based on  $^{15}\text{N}$  dilution. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1901–1917, 1999.

CHALK, P.M., MAGALHÃES, A.M.T., INÁCIO, C.T. Towards an understanding of the dynamics of compost N in the soil-plant-atmosphere system using  $^{15}\text{N}$  tracer. **Plant Soil**, v. 362, p. 373-388, 2013.

CHALK, P.M., SMITH, C.J., HOPMANS, P., HAMILTON, S.D. A yield-independent,  $^{15}\text{N}$ -isotope dilution method to estimate legume symbiotic dependence without a non-fixing

reference plant. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 196–199, 1996.

CHALK, P.M., CRASWELL, E.T., POLIDORO, J.C., CHEN, D. Fate and efficiency of <sup>15</sup>N-labelled slow- and controlled-release fertilizers. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 102, p. 167-178, 2015b.

CHALK, P.M., INÁCIO, C.T., CRASWELL, E.T., CHEN, D. On the usage of absolute ( $x$ ) and relative ( $\delta$ ) values of <sup>15</sup>N abundance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 85, p. 51-53, 2015c.

CHENG, L., KIM, E.J., MERRY, R.J., DEWHURST, R.J. Nitrogen partitioning and isotopic fractionation in dairy cows consuming diets based on a range of contrasting forages. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2031-2041, 2011.

CHESSON, L.A., VALENZUELA, L.O., O'GRADY, S.P., CERLING, T.E., EHLERINGER, J.R. Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of milk in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2358-2363, 2010.

CHOI, W-J., ARSHAD, M.A., CHANG, S.X., KIM, T.H. Grain <sup>15</sup>N of crops applied with organic and chemical fertilizers in a four-year rotation. **Plant Soil**, v. 248, p. 165-174, 2006.

CHOI, W-J., CHANG, S.X., KWAK, J-H., JUNG, J-W., LIM, S-S., YOON, K-S., CHOI, S-M. Nitrogen transformations and ammonia volatilization losses from <sup>15</sup>N-urea as affected by the co-application of composted pig manure. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 87, p. 485-493, 2007a.

CHOI, W-J., HAN, G-H., LEE, G-T., YOON, K-S, CHOI, S-M., RO, H-M. Impact of land-use types on nitrate concentration and d15N in unconfined groundwater in rural areas of **Korean Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 120, p. 259-268, 2007b.

CHOI, W-J., LEE, S-M., RO, H-M. Evaluation of contamination sources of groundwater NO<sub>3</sub><sup>-</sup> using nitrogen isotope data: A review. **Geosciences Journal**, v. 7, p. 81-87, 2003a.

CHOI, W-J., LEE, S-M., RO, H-M., KIM, K-C., YOO, S-H., Natural <sup>15</sup>N abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant Soil**, v. 245, p. 223-232, 2002.

CHOI, W-J., RO, H-M., HOBBIE, E.A. Patterns of natural <sup>15</sup>N in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1493-1500, 2003b.

COLETTA, L. D., PEREIRA, A. L., COELHO, A. A. D., SAVINO, V. J. M., MENTEN, J. F. M., CORRER, E., FRANÇA, L.C., MARTINELLI, L. A. Barn vs. free-range chickens: Differences in their diets determined by stable isotopes. **Food Chemistry**, v. 131, p. 155-160, 2012.

COLLISTER, J.W., RIELEY, G., STERN, B., EGLINTON, G., FRY, B. Compound-specific  $\delta^{13}\text{C}$  analyses of leaf lipids from plants with different carbon dioxide metabolisms. **Organic Geochemistry**, v. 21, p. 619-627, 1994.

COPLEN, T.B., BÖHLKE, J.K., BIÈVRE, P.De, DING, T., HOLDEN, N.E., HOPPLE, J.A., KROUSE, H.R., LAMBERTY, A., PEISER, H.S., RÉVÉSZ, K., REIDER, S.E., ROSMAN,

K.J.R., ROTH, E., TAYLOR, P.D.P. VOCKE JR., R.D., XIAO Y.K. Isotope-abundance variation of selected elements. **Pure Applied Chemistry**, v. 74, p. 1987-2017, 2002.

COPLEN, T.B., BRAND, W.A., GEHRE, M., GRÖNING, M., MEIJER, H.A.J., TOMAM, B. VERKOUTEREN, R.M., New guidelines for  $\delta^{13}\text{C}$  measurements. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 2439-2441, 2006.

COPLEN, T.B., Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope-ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 2538-2560, 2011.

CRAINE, J. M., BROOKSHIRE, E. N. J., CRAMER, M. D., HASSELQUIST, N. J., KOBAYASHI, K., MARIN-SPIOTTA, E., WANG, L. Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils. **Plant Soil**, v. 396, p. 1-26, 2015a.

CRAINE, J. M., ELMORE, A. J., AIDAR, M. P., BUSTAMANTE, M., DAWSON, T. E., HOBBS, E. A., KAHMEN, A., MACK, M.C., McLAUCHLAN, K.K., MICHELSEN, A., NARDOTO, G. B., PARDO, L.H., PEÑUELAS, J., REICH, P.B., SCHUUR, E.A.G., STOCK, W.D., TEMPLER, P.H., VIRGINIA, R.A., WELKER, J.M., WRIGHT, I.J. Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. **New Phytologist**, v. 183, p. 980-992, 2009.

CRAINE, J. M., ELMORE, A. J., WANG, L., AUGUSTO, L., BAISDEN, W. T., BROOKSHIRE, E. N. J., KRANABETTER, J.M., MACK, M.C., MARIN-SPIOTTA, E., MAYOR, J.R., McLAUCHLAN, K.K., MICHELSEN, A., NARDOTO, G.B., OLIVEIRA, R.S., PERAKIS, S.S., PERI, P.L., QUESEDA, C.A., RICHTER, A., SCHIPPER, L.A., STEVENSON, B.A., TURNER, B.L., VIANI, R.A.G., WANEK, W., ZELLER, B. Convergence of soil nitrogen isotopes across global climate gradients. **Scientific reports**, v. 5, p. 89280, 2015b.

CRITTENDEN, R.G., ANDREW, A.S., LEFOURNOUR, M., YOUNG, M.D., MIDDLETON, H., STOCKMANN, R. Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 421-428, 2007.

DANSGAARD, W. Stable isotopes in precipitation. **Tellus**, v. 16, p. 436-468, 1964.

DAWSON, T.E., MAMBELLI, S., PLAMBOECK, A.H., TEMPLER, P.H., AND TU, K.P. Stable isotopes in plant ecology. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 33, p. 507-559, 2002.

De GUARDIA, A., MALLARD, P., TEGLIA, C., MARIN, A., Le PAPE, C., LAUNAY, M., BENOIST, J.C., PETIOT, C. Comparison of five organic wastes regarding their behavior during composting: Part 2, nitrogen dynamic. **Waste Management**, v. 30, p. 415-425, 2010.

De MORAIS, R.F., BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., JANTALIA CP, ALVES, B.J., Ammonia volatilization and nitrous oxide emissions during soil preparation and N fertilization of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 64, p. 80-88, 2013.

- Del AMOR, F.M., NAVARRO, J., APARICIO, P.M. Isotopic discrimination as a tool for organic farming certification in sweet pepper. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 182-185, 2008.
- DeLAUNE, P.B., MOORE, P.A. Jr., DANIEL, T.C., LEMUNYON, J.L. Effect of chemical and microbial amendments on ammonia volatilization from composting poultry litter. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 728-734, 2004.
- DENADAI, J.C., DUCATTI, C., SARTORI, J.R., PEZZATO, A.C., MÓRI, C., GOTTMANN, R., MITUO, M.A.O., BORDINHON, A.M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 10, p. 189-194, 2008.
- DeNIRO, M.J., EPSTEIN, S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. **Science**, v. 197, p. 261-263, 1977.
- DIAS, B.O., SILVA, C.A., HIGASHIKAWA, F.S., ROIG, A., SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: Effect on organic matter degradation and humification. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1239-1246. 2010.
- DITTER, K., GOERGES, T., SATTELMACHER, B., Nitrogen turnover in soil after application of animal manure and slurry as studied by the stable isotope  $^{15}\text{N}$ : a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 161, p. 453-463, 1998.
- DONAGEMMA, G.K., CAMPOS, D.V.B de, CALDERANO, S.B., TEIXEIRA, W.G., VIANA, J.H.M. **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2011. 230 p.
- DOUGHTON, J.A., VALLIS, I., SAFFIGNA, P.G. An indirect method for estimating  $^{15}\text{N}$  isotope fractionation during nitrogen fixation by legume under field conditions. **Plant Soil**, v. 144, p. 23-29, 1992.
- DOUXCHAMPS, S., FROSSARD, E., BERNASCONI, S.M., van der HOEK, R., SCHMIDT, A., RAO, I.M., OBERSON, A. Nitrogen recoveries from organic amendments in crop and soil assessed by isotope techniques under tropical field conditions. **Plant Soil**, v. 341, p. 179-192, 2011.
- EBID, A., UENO, H., GHONEIN A., ASAGI, N., Uptake of carbon and nitrogen derived from carbon-13 and nitrogen-15 dual-labeled maize residue compost applied to radish , komatsuma, and chingensai for three consecutive croppings. **Plant Soil**, v. 304, p. 241-248, 2008.
- FERNANDEZ, I., CADISCH, G. Discrimination against  $^{13}\text{C}$  during degradation of simple and complex substrates by two white rot fungi. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.17, p. 2614-2620, 2003.
- FERNANDEZ, I., MAHIEU, N., CADISCH, G. Carbon isotopic fractionation during decomposition of plant materials of different quality. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 17, p.1.1-1.11, 2003.
- FLORES, P., FENOLL, J., HELLÍN, P. The feasibility of using  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annuum*

- L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5740-5745, 2007.
- FUKUMOTO, Y., INUBUSHI, K. Effect of nitrite accumulation on nitrous oxide emission and total nitrogen loss during swine manure composting. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 55, p. 428-434, 2009.
- FUKUMOTO, Y., OSADA, T., HANAJIMA, D., HAGA, K. Patterns and quantities of NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> emissions during swine manure composting without forced aeration – effect of compost pile scale. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 109-114, 2003.
- FUKUMOTO, Y., SUZUKI, K., KURODA, K., WAKI, M., YASUDA, T. Effects of struvite formation and nitrification promotion on nitrogenous emissions such as NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and NO during swine manure composting. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1468-1474, 2011.
- GARZA, H.M.Q., DELGADO, J.A., WONG, J.A., LINDEMANN, W.C. <sup>15</sup>N uptake from manure and fertilizer sources by three consecutive crops under controlled conditions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1249-1258, 2009.
- GAT, J.R. Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrological cycle. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 24, p. 225-262, 1996.
- GEORGI, M., BOULLENGER, A., VOERKELIUS, S., SCHNITZLER, W.H. Differences in  $\delta^{15}\text{N}$  signatures to determine plant material from integrated or organic greenhouse production. **ISHS Acta Horticulturae**, v. 659, p. 749–753, 2004.
- GEORGI, M., VOERKELIUS, S., ROSSMANN, A., GRAßMANN, J., SCHNITZLER, W.H., Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production. **Plant Soil**, v. 275, p. 93-100, 2005.
- GILBERT, A., ROBINS, R.J., REMAUD, G.S., TCHERKEZ, G.G.B. Intramolecular <sup>13</sup>C pattern in hexoses from autotrophic and heterotrophic C3 plant tissues. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 109, p. 18204-18209, 2012.
- GILBERT, A., SILVESTRE, V., ROBINS, R.J., TCHERKEZ, G., REMAUD, G.S. A <sup>13</sup>C NMR spectrometric method for the determination of intramolecular  $\delta^{13}\text{C}$  values in fructose from plant sucrose samples. **New Phytologist**, v. 191, p. 579-588, 2011a.
- GILBERT, A., SILVESTRE, V., SEGEBARTH, N., TCHERKEZ, G., GUILLOU, C., ROBINS, R.J., AKOKA, S., REMAUD, G.S. The intramolecular <sup>13</sup>C-distribution in ethanol reveals the influence of the CO<sub>2</sub>-fixation pathway and environmental conditions on the site-specific <sup>13</sup>C variation in glucose. **Plant Cell and Environment**, v. 34, p. 1104-1112, 2011b.
- GLEIXNER, G., DANIER, H-J., WERNER, R.L., SCHMIDT, H-L. Correlations between the <sup>13</sup>C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. **Plant Physiology**, v. 102, p. 1287-1290, 1993.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, I., GONZÁLEZ PÉREZ, C., HERNÁNDEZ MÉNDEZ, J., AND SÁNCHEZ GONZÁLEZ, C. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. **Meat Science**, v. 58, p. 25–30, 2001.
- GU, W., ZHANG, F., XU, P., TANG, S., XIE, K., HUANG, X., HUANG, Q. Effects of sulphur and *Thiobacillus thioparus* on cow manure aerobic composting. **Bioresource**

**Technology**, v. 102, p. 6529-6535, 2011.

HAO, X., CHANG, C. Gaseous NO, NO<sub>2</sub>, and NH<sub>3</sub> loss during cattle feedlot manure composting. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v. 41, p. 81-93, 2001.

HASSOUNA, M., ESPAGNOL, S., ROBIN, P., PAILLAT, J-M., LEVASSEUR, P., Li., Y. Monitoring NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> Emissions During Pig Solid Manure Storage – Effect of Turning. **Compost Science & Utilization**, v. 16, p. 267-274, 2008.

HAUCK, R.D., BREMNER, J.M. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. **Advances in Agronomy**, v. 28, p. 219-266, 1976.

HEATON, K., KELLY, S.D., HOOGEWERFF, J., WOOLFE, M. Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. **Food Chemistry**, v. 107, p. 506-515, 2008.

HELLEBRAND, H.J., KALK, W-D., Emission of methane, nitrous oxide, and ammonia from dung windrows. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**. v. 60, p. 83-87, 2001.

HOBBIE, E. A., WERNER, R.A. Tansley review. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants: a review and synthesis. **New Phytologist**, v. 171, p. 371–385, 2004.

HOBBIE, E.A., SÁNCHEZ, F.S., RYGIEWICZ, P.T. Controls of isotopic patterns in saprotrophic and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 48, p. 60-68, 2012.

HÖGBERG, P. <sup>15</sup>N natural abundance in soil-plant systems. Tansley Review N<sup>o</sup>. 95, **New Phytologist**, v. 137, p. 179-203, 1997.

HÖGBERG, P., PLAMBOECK, A.H., TAYLOR, A.F.S., FRANSSON, P.M.A. Natural <sup>13</sup>C abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. **Proceedings of National Academy of Science USA**. v. 96, p. 8534-8539, 1999.

HRISTOV, A.N., ZAMAN, S., VANDER, POL. M., NDEGWA, P., CAMPBELL, L., SILVA, S. Nitrogen losses from dairy manure estimated through nitrogen mass balance and chemical markers. **Journal of Environmental Quality**, v. 38, p. 2438-2448, 2009.

HU, T-J., ZENG, G-M., HUANG, D-L., YU, H-Y., JIANG, X-Y., DAI, F., HUANG, G-H. Use of potassium dihydrogen phosphate and sawdust as adsorbents of ammoniacal nitrogen in aerobic composting process. **Journal of Hazardous Materials**. v. 141, p. 736-74, 2007.

HULTINE, K.R., BURTCH, K.G., EHLERINGER, J.R.. Gender specific patterns of carbon uptake and water use in a dominant riparian tree species exposed to a warming climate. **Global Change Biology** v. 19, p. 3390-3405, 2013.

HUSS-DANELL, K., CHAIA, E. Use of different plant parts to study N<sub>2</sub> fixation with <sup>15</sup>N techniques in field-grown red clover (*Trifolium pratense*). **Physiologia Plantarum**, v. 125, p. 21–31, 2005.

INÁCIO, C. T., MILLER, P. R. M. **Compostagem: ciência e prática para gestão de resíduos orgânicos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 156 p.

INÁCIO, C.T., CHALK, P.M., MAGALHÃES, A.M.T., Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 1. Plant products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1206-1218, 2015a.

INÁCIO, C.T., CHALK, P.M., Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 2. Animal products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. (no prelo)

INÁCIO, C.T., URQUIAGA, S., CHALK, P.M., MATA, M.G.F., SOUZA, P.O. Identifying N fertilizer regime and vegetable production system in tropical Brazil using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 3025-3022, 2015b.

JANTALIA, C.P., HALVORSON, A.D., FOLLETT, R.F., ALVES, B.J.R., POLIDORO, J.C., URQUIAGA, S. Nitrogen source effects on ammonia volatilization as measured with semi-static chambers. **Agronomy Journal**, v. 104, p. 1595–1603, 2012.

JEONG, Y-K., HWANG, S-J. Optimum doses of Mg and P salts for precipitating ammonia into struvite crystals in aerobic composting. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1-6, 2005.

JUNK, G., SVEC, H.J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 14, p. 234-243, 1958.

KADER, N.A., ROBIN, P., PAILLAT, J.M., Turning, compacting and the addition of water as factors affecting gaseous emissions in farm manure composting. **Bioresource Technology**, v. 14, p. 2619-28, 2007.

KELLY, S.D., SCOTTER, M.J., MACARTHUR, R., CASTLE, L., DENNIS, M.J. Survey of stable sulfur isotope ratios ( $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) of sulfite and sulfate in foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 1003-1009, 2002.

KIM, Y-J., CHOI, W-J., LIM, S-S., KWAK, J-H., CHANG, S.X., KIM, H-Y., YOON, K-S., RO, H-M. Changes in nitrogen isotopic compositions during composting of cattle feedlot manure: effects of bedding material type. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5452-5458, 2008.

KITHOME, M., PAUL, J.W., BOMKE, A.A. Reducing nitrogen losses during simulated composting of poultry manure using adsorbents or chemical amendments. **Journal of Environmental Quality**, v. 28, p. 194-201, 1999.

KOHN, M.J. Predicting animal  $\delta^{18}\text{O}$ : Accounting for diet and physiological adaptation. **Geochemical et Cosmochimica Acta**, v. 60, p. 4811-4829, 1996.

KOHZU, A., YOSHIOKA, T., ANDO, T., TAKAHASHI, M., KOBAYASHI, K., WADA, E. Natural  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  abundance of field-collected fungi and their ecological implications. **New Phytologist**, v. 144, p. 323-330, 1999.

LARCHER, W., **Physiological Plant Ecology**, 4<sup>th</sup> ed., p. 513. Springer, Berlin. 2003.

- LEE, C., HRISTOV, A.N., CASSIDY, T., HEYLER K. Nitrogen isotope fractionation and origin of ammonia nitrogen volatilized from cattle manure in simulated storage. **Atmosphere**, v. 2, p. 256-270, 2011.
- LIANG, Y., LEONARD, J.J., FEDDES, J.J.R., MCGILL, W.B. A simulation model of ammonia volatilization in composting. **Transactions of the ASAE**, v. 47, p. 1667-1680, 2004.
- LIANG, Y., LEONARD, J.J., FEDDES, J.J.R., MCGILL, W.B. Influence of carbon and buffer amendment on ammonia volatilization in composting. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 748-761, 2006.
- LIM, S-S., LEE, S-M., LEE, S-H., CHOI W-J, Nitrogen isotope compositions of synthetic fertilizer, raw livestock manure slurry, and composted livestock manure. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**. v. 43, p. 453-457, 2010.
- LUYKX, D.M.A.M., VAN RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**, v. 107, p. 897–911, 2008.
- LYNCH, D.H., VORONEY, R.P., WARMAN, P.R. Use of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural abundance techniques to characterize carbon and nitrogen dynamics in composting and in compost-amended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 103-114, 2006.
- MAEDA, K., TOYODA, S., SHIMOJIMA, R., OSADA, T., HANAJIMA, D., MORIOKA, R., YOSHIDA, N. Source of nitrous oxide emissions during the cow manure composting process as revealed by isotopomer analysis of and amoA abundance in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, p. 1555-1562, 2010.
- MAGALHÃES, A.M.T., SHEA, P.J., JAWSON, M.D., WICKLUND, E.A., NELSON, D.W. Practical simulation of composting in the laboratory. **Waste Management and Research**, v. 11, p. 143-154, 1993.
- MANCA, G., FRANCO, M.A., VERSINI, G., CAMIN, F., ROSSMANN, A., TOLA, A. Correlation between multielement stable isotope ratio and geographical origin in Peretta cows' milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 831–839, 2006.
- MARTINELLI, L.A., PICCOLO, M.C., TOWNSEND, A.R., VITOUSEK, P.M., CUEVAS, E., MCDOWELL, W., ROBERTSO, G.P., SANTOS, O.C., TRESEDER, K., Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry**. v. 46, p. 45-65, 1999.
- MASON, I.G., MILKE, M.W. Physical modelling of the composting environment: A review. Part 1: Reactor systems. **Waste Management**, v. 25, p. 481-500, 2005.
- MATSUMURA, H., SASAKI, M., KATO, S., NAKASAKI, K. Unusual effects of triacylglycerol on the reduction of ammonia gas emission during thermophilic composting. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2300-2305, 2010.
- MIZOTA, C., SASAKI, A. Sulfur isotope composition of soils and fertilizers: differences between northern and southern hemispheres. **Geoderma**, v.71, p. 77-93, 1996
- MOLKENTIN, J. Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed



- products. **Food Chemistry**, v. 137, p. 25-30, 2013.
- MOLKENTIN, J., GIESEMANN, A. Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 88, p. 297–305, 2007.
- MOLKENTIN, J., GIESEMANN, A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1493-1500, 2010.
- MUÑOZ, G.R., KELLING, K.A., POWELL, J.M., SPETH, P.E. Comparison of estimates of first-year dairy manure nitrogen availability or recovery using nitrogen-15 and other techniques. **Journal of Environmental Quality**, v.33, p.719–727, 2004.
- MUÑOZ, G.R., POWELL, J.M., KELLING, K.A. Nitrogen budget and soil N dynamics after multiple applications of unlabeled or 15nitrogen-enriched dairy manure. **Soil Science Society of America Journal**, v. 67, p. 817-825, 2003.
- NAKANO, A., AND UEHARA, Y. Effects of different kinds of fertilizer and application methods on  $\delta^{15}\text{N}$  values of tomato. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 41, p. 219-226, 2007.
- NAKANO, A., UEHARA, Y., YAMAUCHI, A. Effect of inorganic and organic fertigation on yields,  $\delta^{15}\text{N}$  values, and  $\delta^{13}\text{C}$  values of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Saturn). **Plant Soil**, v. 255, p. 343-349, 2003.
- NAKASHITA, R., SUZUKI, Y., AKAMATSU, F., IIZUMI, Y., KORENAGA, T., CHIKARAISHI, Y. Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 148-152, 2008.
- NISHIDA, M., and SATO, Y., Characteristics of the relationship between natural  $^{15}\text{N}$  abundances in organic rice and soil. **Plant Production Science**, v. 18, p. 180-186, 2015.
- NISHIDA, M., IWAYA, K., SUMIDA, H., KATO, N. Changes in natural  $^{15}\text{N}$  abundance in paddy soils under different, long-term soil management regimes in the Tohoku region of Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, p. 310-317, 2007.
- NOVÁK, M., BUZEK, F., HARRISON, A.F., PŘECHOVÁ, E., JAČKOVÁ, I., FOTTOVÁ, D. Similarity between C, N and S stable isotope profiles in European spruce forest soils: implications for the use of  $\delta^{34}\text{S}$  as a tracer. **Applied Geochemistry**, v. 18, p. 765-779, 2003.
- OBERSON, A., NANZER, S., BOSSHARD, C., DUBOIS, D., MÄDER, P., FROSSARD, E. Symbiotic  $\text{N}_2$  fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by  $^{15}\text{N}$  dilution and  $^{15}\text{N}$  natural abundance. **Plant Soil**, v. 290, p. 69-83, 2007.
- OLESEN, J.E., SORENSEN, P., THOMSEN, I.K., ERIKSEN, J., THONSEN, A.G., BERNSTEN, J. Integrated nitrogen input systems in Denmark. In: **Agriculture and the Nitrogen Cycle**, Scope 65, p. 129-140, 2004.
- OSADA, T., KURODA, K., YONAGA, M. Determination of nitrous oxide, methane, and ammonia emissions from a swine waste composting process. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 2, p. 51-56, 2000.

OSORIO, M.T., MOLONEY, A.P., SCHMIDT, O., MONAHAN, F.J. Beef authentication and retrospective dietary verification using stable isotope ratio analysis of bovine muscle and tail hair. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3295-3305, 2011.

PAGANS, E., BARRENA, R., FONT, X., SÁNCHEZ, A. Ammonia emissions from the composting of different organic wastes: Dependency on process temperature. **Chemosphere**, v. 62, p. 1534-1542, 2006.

PAILLAT, J-M., ROBIN, P., HASSOUNA, M., LETERME, P. Predicting ammonia and carbon dioxide emissions from carbon and nitrogen biodegradability during animal waste composting. **Atmospheric Environment**, v. 39, p. 6833-6842, 2005.

PECK, W.H., TUBMAN, S.C., Changing carbon isotope ratio of atmospheric carbon dioxide: Implications for food authentications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2364-2367, 2010.

PEOPLES, M.B., CHALK, P.M., UNKOVICH, M.J., BODDEY, R.M. Can differences in <sup>15</sup>N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 87, p. 97-109, 2015.

PESSENDA, L.C.R., BOULET, R., ARAVENA, R., ROSOLEN, V., GOUVEIA, S.E.M., RIBEIRO, A.S., LAMOTTE, M. Origin and dynamics of soil organic matter and vegetation changes during the Holocene in a forest savanna transition zone, Brazilian Amazon region. **Holocene**, v.11, p. 250-254, 2001.

PILLONEL, L., BADERTSCHER, R., CASEY, M., MEYER, J., ROSSMANN, A., SCHLICHTHERLE-CERNY, H., TABACCHI, R., BOSSET, J.O. Geographic origin of European Emmental cheese: Characterisation and descriptive statistics. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 547-556, 2005.

POWELL, J.M., KELLING, K.A., MUÑOZ, G.R., CUSICK, P.R. Evaluation of dairy manure nitrogen-15 enrichment methods on short-term crop and soil nitrogen budgets. **Agronomy Journal**, v.97, p.333-337, 2005.

RAPISARDA, P., CAMIN, F., FABRONI, S., PERINI, M., TORRISI, B. AND INTRIGLILOLO, F. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ , and  $\delta^{18}\text{O}$  values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3502-3506, 2010.

RAVIV, M., MEDINA, S., KRASNOVSKY, A., ZIADNA, H. Organic matter and nitrogen conservation in manure compost for organic agriculture. **Compost Science and Utilization**, v. 12, p. 6-10, 2004.

REN, L., SCHUCHARDT, F., SHEN, Y., LI, G., LI, C. Impact of struvite crystallization on nitrogen losses during composting of pig manure and cornstalk. **Waste Management**, v. 30, p. 885-892, 2010a.

REN, L-M., LI, G-X., SHEN, Y-J., SCHUCHARDT, F. PENG, L. Chemical precipitation for controlling nitrogen loss during composting. **Waste Management and Research**, v. 28, p.

385-394, 2010b.

RENOU, J-P., DEPONGE, C., GACHON, P., BONNEFOY, J-C., COULON J-B., GAREL, J-P., AND RITZ, P. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. **Food Chemistry**, v. 85, p. 63-66, 2004.

RESENDE, F.V., SAMINEZ, T.C.O., VIDAL, M.C., SOUZA, R.B., CLEMENTE, F.M.V. **Cultivo de alface em sistema orgânico de produção. Circular Técnica 56**, Embrapa. Brasília. pp.16, 2007.

ROBINSON, D.  $\delta^{15}\text{N}$  as an integrator of the nitrogen cycle. **Trends in Ecology and Evolution.**, v. 16, p. 153-162, 2001.

ROGERS, K.M., Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4078-4083, 2008.

ROSSMANN, A., BUTZENLECHNER, M., SCHMIDT, H-L. Evidence for nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose. **Plant Physiology**. v. 96, p. 609-614, 1991.

ROSSMANN, A., HABERHAUER, G., HÖLZL, S., HORN, P., PICHLMAYER, F., VOERKELIUS, S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 32-40. 2000.

RUMMEL, S., HOELZL, S., HORN, P., ROSSMANN, A., SCHLICHT, C., The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  for geographical origin assignment of orange juices. **Food Chemistry**, v. 118, p. 890-900, 2010.

SASAKI, H. YANO, H., SASAKI, T., NAKAI, Y. A survey of ammonia-assimilating microorganisms in cattle manure composting. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1356-1363, 2005.

SASAKI, H., KITAZUME, O., NONAKA, J., HIKOSAKA, K., OTAWA, K., ITOH, K., NAKAI, Y. Effect of a commercial microbiological additive on beef manure compost in the composting process. **Animal Science Journal**, v. 77, p. 545-548, 2006.

SCHELLENBERG, A., CHMIELUS, S., SCHLICHT, C., CAMIN, F., PERINI, M., BONTEMPO, L., HEINRICH, K., KELLY, S.D., ROSSMANN, A., THOMAS, F., JAMIN, E., HORACEK, M. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. **Food Chemistry**, v. 121, p. 770-777. 2010.

SCHMIDT, H-L., ROßMANN, A., VOERKELIUS, S., SCHNITZLER, W.H., GEORGI, M., GRABMANN, J., ZIMMERMANN, G., WINKLER, R. Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and organic production. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 41, 223-228, 2005.

SCHMIDT, O., QUILTER, J.M., BAHAR, B., MOLONEY, A.P., SCRIMGEOUR, C.M., BEGLEY, I.S., MONAHAN, F.J. Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v. 91, p. 545-549, 2005.

SCHWERTL, M., AUERSWALD, K., SCHÄUFELE, R., SCHNYDER, H. Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production

- systems? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 109, p. 153-165, 2005.
- SENBAYRAM, M., DIXON, L., GOULDING, K.W.T., BOL, R. Long-term influence of manure and mineral nitrogen applications on plant and soil  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  values from the Broadbalk Wheat Experiment. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1735–1740, 2008.
- SERRET, M.D., ORTIZ-MONASTERIO, I., PARDO, A., ARAUS, J.L. The effect of urea fertilization and genotype on yield, nitrogen use efficiency,  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in wheat. **Annals of Applied Biology**, v.156, p. 243-257, 2008.
- SISTI, C.P.J., SANTOS, H.P., ALVES, B.J.R., URQUIAGA, S., BODDEY, R.M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil Tillage Research**, v. 76, p. 39-58, 2004.
- SMITH, F.H. Nitrogen Losses from Composts. **Science**, v. LIX, n° 1522, p. 213-214, 1924.
- SOMMER, S.G., DAHL, P. Nutrient and carbon balance during the composting of deep litter. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 74. p. 145-153, 1999.
- STEINER, C., DAS, K.C., MELEAR, N., LAKLY, D. Reducing Nitrogen Loss During Poultry Litter Composting Using Biochar. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, p. 1236-1242, 2010.
- ŠTURM, M., KACJAN-MARŠIĆ, N., LOJEN, S. Can  $^{15}\text{N}$  in lettuce tissues reveal the use of synthetic nitrogen fertilizer in organic production? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 262-267, 2011.
- TANZ, N., SCHMIDT, H-L.  $\delta^{34}\text{S}$ -value measurements in food origin assignment and sulphur isotope fractionations in plants and animals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3139-3146. 2010.
- TAYLOR, A.F.S., FRANSSON, P.M., HÖGBERG, P., HÖGBERG, M.N., PLAMBOECK, A.H. Species level patterns in  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. **New Phytologist**, v. 159, p. 757-774, 2003.
- THÖNNISEEN, C., MIDMORE, D.J., LADHA, J.K., OLK, D.C., SCHMIDHALTER, U., Legume decomposition and nitrogen release when applied as green manures to tropical vegetable production systems. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 253-260, 2000.
- THORUP-KRISTENSEN, K., Root growth and nitrogen uptake of carrot, early cabbage, onion and lettuce following a range of green manures. **Soil Use and Management**, v. 22, p. 29-38, 2006.
- TOBIN, R., LARKIN, T., MOANE, S., The Irish organic food market: shortfalls, opportunities and the need for research. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2126-2131, 2011.
- UENO, H., YAMAMURO, S. Fate of nitrogen derived from  $^{15}\text{N}$ -labelled plant residues and composts in rice-planted paddy soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 47, p. 747–754, 2001.
- UNKOVICH, M., HERRIDGE, D., PEOPLES, M., CADISCH, G., BODDEY, R., GILLER,

K., ALVES, B., CHALK, P. **Measuring Plant-Associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 258 pp., 2008.

URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R., CAMPOS, D. de V., BODDEY, R.M. Aplicação de Técnicas de  $^{13}\text{C}$  em Estudos de Sequestro de C em Solos Agrícolas. In: **Manejo de Sistemas Agrícolas: Impacto no Seqüestro de C e nas Emissões de Gases de Efeito Estufa**. B.J.R. Alves Urquiaga, S., Aita, C., Boddey, R.M., Jantalia, C.P., Camargo, F.A.O. (Eds), Porto Alegre, Genesis, 2006. p. 13–33.

USDA. United States Department of Agriculture. USDA organic regulations. 7 CFR Part 205 Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/rules-regulations/organic>>. Acesso em: 27 de Janeiro de 2016.

VITORELLO, V.A., CERRI, C., ANDREUX, F., FELLER, C., VICTÓRIA, R.L. Organic matter and natural carbon-13 distribution in forested and cultivated oxisols. **Soil Science Society of America Journal**, v.53, p. 773-778, 1989.

VITÓRIA, L., OTERO, N., SOLER, A., CANALS, À. Fertilizer characterization: Isotopic data (N, S, O, C and Sr). **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 3254-3262, 2004.

WANEK, W., ARNDT, S.K. Difference in  $\delta^{15}\text{N}$  signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic  $\text{N}_2$  fixation to plant N. **Journal of Experimental Botany**, v. 371, p. 1109–1118, 2002.

WESTERMANN, P.W., BICUDO, J.R. Management considerations for organic waste use in agriculture. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 215-221, 2005.

WILLER, H., and LERNOUD, J., Summary, in **The World of Organic Agriculture – Statistics and Emerging Trends 2014**, ed. By Willer, H., and Lernoud, J., FiBL-IFOAM Report. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), Bonn, pp. 23–31, 2014.

YUAN, Y., HU, G., ZHAO, M., CHEN, T., ZHAMG, Y., ZHU, J., WAMG, Q. Variations in the natural  $^{15}\text{N}$  abundance of *Brassica chinensis* grown in uncultivated soil affected by different nitrogen fertilizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11386-11392, 2014.

YUN, S-I., RO, H-M. Natural  $^{15}\text{N}$  abundance of plant and soil inorganic-N as evidence for over-fertilization with compost. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1541-1547, 2009.

YUN, S-I., RO, H-M. Stable C and N isotopes: A tool to interpret interacting environmental stress on soil and plant. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 56, p. 262-271, 2008.

YUN, S-I., RO, H-M., CHOI, W-J., CHANG, X-S. Interactive effects of N fertilizer source and timing of fertilization leave specific N isotopic signatures in Chinese cabbage and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1682-1689, 2006.

ZAZZO, A., MONAHAN, F.J., MOLONEY, A.P., GREEN, S., SCHMIDT, O. Sulphur isotopes in animal hair track distance to sea. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 2371-2378, 2011.

ZHANG, F-B., GU, W-J, XU, P-Z., XIE, K-Z., TANG, S-H., CHEN, J-S., YANG, S-H. Increasing nitrogen conservation by adding urease inhibitor NBPT to chicken compost manure. **Chinese Journal of Eco-Agriculture**, v. 18, p. 643-648, 2010.

ZHANG, W., LAU, A. Reducing ammonia emission from poultry manure composting via struvite formation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 598-602, 2007.