

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FORMAS DE N-ORGÂNICO EM LATOSSOLO EM FUNÇÃO
DE NITROGÊNIO E DE PLANTAS DE COBERTURA EM
PRÉ-SAFRA DO MILHO**

Marina Ali Mere Bergamasco

Engenheira Agrônoma

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FORMAS DE N-ORGÂNICO EM LATOSSOLO EM FUNÇÃO
DE NITROGÊNIO E DE PLANTAS DE COBERTURA EM
PRÉ-SAFRA DO MILHO**

Marina Ali Mere Bergamasco

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pessôa da Cruz

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Ciência do Solo)

2015

Bergamasco, Marina Ali Mere
B493f Formas de N-orgânico em Latossolo em função de nitrogênio e de plantas de cobertura em pré-safra do milho / Marina Ali Mere Bergamasco. – – Jaboticabal, 2015.

iii, 44 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Mara Cristina Pessoa da Cruz

Banca examinadora: Itamar Andrioli, Felipe Batistella Filho

Bibliografia

1. Adubação nitrogenada. 2. Leguminosas. 3. Gramíneas. 4. N aminoaçúcares. 5. N disponível. 6. Método da destilação a vapor direta I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.416.1:633.15



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FORMAS DE N-ORGÂNICO EM LATOSSOLO EM FUNÇÃO DE NITROGÊNIO E DE PLANTAS DE COBERTURA EM PRÉ-SAFRA DO MILHO

AUTORA: MARINA ALI MERE BERGAMASCO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARA CRISTINA PESSOA DA CRUZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (CIÊNCIA DO SOLO), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARA CRISTINA PESSOA DA CRUZ

Departamento de Solos e Adubos / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ITAMAR ANDRIOLI

Departamento de Solos e Adubos / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FELIPE BATISTELLA FILHO

Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP

Data da realização: 22 de junho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marina Ali Mere Bergamasco – nascida em 14 de dezembro de 1988, na cidade de Sertãozinho– SP, concluiu o ensino médio em dezembro de 2006 no colégio Américo de Souza - Sertãozinho. Em março de 2008 iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal. Foi bolsista FAPESP no período de 01 de novembro de 2011 a 31 de outubro de 2012. Participou do FERTBIO (Maceió – 2012). Em março de 2013 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Durante o mestrado foi bolsista CAPES.

Aos meus familiares, especialmente à minha mãe e aos meus avós, por todo amor, confiança e apoio que sempre me deram,

DEDICO

À professora, orientadora e amiga Mara Cristina Pessôa da Cruz, pela orientação durante todos esses anos de convívio e por ser essa pessoa maravilhosa, que com todo seu conhecimento, sua dedicação e paciência me ensinou muito,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e me dar saúde e força para alcançar meus objetivos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, por toda oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À CAPES, pela bolsa de estudo, que possibilitou minha dedicação integral ao curso de mestrado.

À minha mãe, Luciana Calil Ali Mere por ser a pessoa mais importante da minha vida e por todo amor, dedicação e confiança que tem me dado em todos os momentos da vida.

Ao meu irmão, Paulo Eduardo Ali Mere Bergamasco, por ter me mostrado que estará sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida. Obrigada pelo carinho.

À toda a minha família, em especial aos meus avós, Jamile e Yussif e meu tio Eduardo, que são meu orgulho e exemplo de vida.

À Professora Mara Cristina Pessôa da Cruz, pela orientação e convívio por todos esses anos, e pelos muitos ensinamentos, como ser humano e como profissional que levarei para a vida toda.

Ao Professor Manoel Evaristo Ferreira, pelas contribuições no exame geral de qualificação e por todos esses anos de convívio, que com toda sua sabedoria e profissionalismo contribuiu para a realização e melhoria deste trabalho.

Ao Professor Itamar Andrioli, por ter gentilmente cedido a área para a coleta das amostras de solo cujos resultados estão relatados nesta dissertação e também por ter contribuído muito para a melhora do trabalho durante o exame geral de qualificação e a defesa da dissertação.

Ao Professor José Carlos Barbosa pela ajuda preciosa na análise estatística.

Ao Professor Felipe Batistella Filho, por todos os anos de convívio no laboratório e pela excelente contribuição na defesa do mestrado, que foi importantíssima para a melhoria do presente trabalho.

Aos companheiros de Laboratório de Fertilidade do Solo, Felipe Batistella Filho, Fernando Kuhnen, Thiago de Barros Sylvestre, Lucas Boscov Braos, Cássia Rita Adame, Jacqueline Nayara Ferraça Leite e Aluísio Hideki Togoro.

Às amigas de Laboratório, que fiz e levarei para sempre, Aline Carla Trombeta Bettiol e Samira Furtado de Queiroz. Obrigada por tudo, principalmente pelo carinho de vocês.

À amiga Selma Guimarães Figueiredo, técnica do Laboratório de Fertilidade do Solo, que sempre esteve disposta a ajudar no que foi preciso. Obrigada pela ajuda generosa no preparo de soluções e nas dicas preciosas para o sucesso das análises.

Agradeço à minha segunda família, república 4x4, Bruna, Gabriela, Nathália Junqueira, Júlia, Mariana, Serena, Paulina e Nathália Belini, por todos esses anos de convivência, apoio, amizade e carinho que levarei para toda vida.

Para finalizar, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e concretização de mais um objetivo. Todos são importantes e especiais. Muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Caracterização da área.....	11
3.2 Histórico da área, tratamentos e delineamento experimental.....	11
3.3 Coleta e preparo das amostras de solo.....	12
3.4 Fracionamento do nitrogênio.....	13
3.4.1 Obtenção do hidrolisado ácido.....	13
3.4.2 Determinação das frações de N no hidrolisado ácido.....	14
a) N-NH ₄ ⁺ hidrolisável (NH ₄ ⁺ -hid).....	14
b) N-NH ₄ ⁺ hidrolisável (NH ₄ ⁺ -hid) + N-aminoaçúcares (N-Aaç).....	14
c) N-aminoácidos (N-Aa).....	15
d) N-total hidrolisável (NT-hid).....	15
e) N-não identificado (N-NI).....	16
3.4.3 Determinação do N insolúvel em ácido (N-IA).....	16
3.5 Determinação do N disponível pelo método da destilação a vapor direta (DVD).....	16
3.6 Análise estatística dos resultados.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Formas orgânicas de nitrogênio.....	18
4.1.1 N-NH ₄ ⁺ hidrolisável.....	18
4.1.2 N-aminoaçúcares.....	20
4.1.3 N-aminoácidos.....	22
4.1.4 N-não identificado.....	25
4.1.5 N-total hidrolisável e proporção das formas hidrolisadas.....	27
4.1.6 N-insolúvel em ácido.....	34
4.2 Nitrogênio total.....	36
4.3 Nitrogênio disponível avaliado pelo método da DVD.....	37
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

FORMAS DE N-ORGÂNICO EM LATOSSOLO EM FUNÇÃO DE NITROGÊNIO E DE PLANTAS DE COBERTURA EM PRÉ-SAFRA DO MILHO

RESUMO – O manejo do solo em sistema plantio direto combinando plantas de cobertura e doses de nitrogênio pode interferir nas formas e na disponibilidade de N. Ter um índice químico sensível para detectar variações na disponibilidade de N causadas pelo manejo pode aumentar a precisão das recomendações. Pretendeu-se com este trabalho: avaliar os efeitos de plantas de cobertura em pré-safra de milho, e de doses de N em cobertura no milho, nas formas de N orgânico do solo, em experimento de longa duração; associar formas de N orgânico com disponibilidade, por meio de correlação com o N determinado por destilação a vapor direta. O experimento está instalado em Latossolo Vermelho argiloso, em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo as plantas de cobertura os tratamentos principais e as doses de N os tratamentos secundários. As plantas de cobertura são mucuna-cinza, crotalária, feijão-de-porco, lablab, milheto e vegetação espontânea e as doses de N-ureia em cobertura no milho são 0 e 120 kg ha⁻¹. A amostragem de solo foi feita no décimo segundo ano do experimento, nas camadas de 0-5; 5-10; 10-20; 20-40; 40-60 cm de profundidade, 30 dias após a dessecação das plantas de cobertura. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida e as formas do N orgânico determinadas no fracionamento foram: N-total hidrolisável, N-NH₄⁺ hidrolisável, N-aminoácidos, N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoaçúcares e N-insolúvel em ácido. Por diferença foram obtidos os teores de N-não identificado (N-total hidrolisável - N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoaçúcares + N-aminoácidos) e de N-aminoaçúcares (N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoaçúcares - N-NH₄⁺ hidrolisável). A fração N-aminoaçúcares predominou em relação às outras formas de N-hidrolisável e o cultivo de plantas de cobertura não teve efeito claro na definição desse predomínio. A adubação nitrogenada diminuiu os teores de N das frações mais lábeis (N-NH₄⁺ hidrolisável e N-aminoaçúcares) nas camadas superficiais do solo. Houve correlação entre N determinado pelo método da destilação a vapor direta e formas de N obtidas no fracionamento, particularmente N-aminoácidos e N-aminoaçúcares, o que definiu estas frações como reservatórios de N orgânico controladores da disponibilidade.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, leguminosas, gramíneas, N-aminoaçúcares, N disponível, método da destilação a vapor direta

ORGANIC-N FRACTIONS IN AN OXISOL ACCORDING TO NITROGEN AND COVER CROPS IN MAIZE PRE-CROPPING

ABSTRACT – The soil management in no-tillage system with cover crops and nitrogen levels changes the forms and the availability of N. A sensitive chemical index to detect variations in the availability of N caused by management can increase the accuracy of the fertilizer recommendations. With this work it was intended to evaluate the effects of cover crops in maize pre-cropping, and levels of N sidedress fertilization in maize, in the forms of soil organic N in a long-term experiment; to associate organic N forms with availability, through the correlation with N determined by direct steam distillation. The experiment is installed in a sandy clay Oxisol, in randomized blocks with split plots, with cover crops as main treatments and doses of N as secondary treatments. The cover crops are gray velvet bean, sunn hemp, jack bean, lablab, millet and spontaneous vegetation. The levels of urea-N sidedress fertilization in corn are 0 and 120 kg ha⁻¹. The soil samples were collected in the twelfth year of the experiment, at the layers 0-5; 5-10; 10-20; 20-40; 40-60 cm, 30 days after the desiccation of cover crops. The samples were submitted to acid hydrolysis followed by the determination of: total hydrolysable N, hydrolysable NH₄⁺-N, amino acids-N, amino sugars-N and acid insoluble-N. By subtraction were obtained unidentified-N (total hydrolysable-N - hydrolysable NH₄⁺ + amino sugars + amino acids) and amino sugars-N (hydrolysable NH₄⁺ + amino sugars - hydrolysable NH₄⁺). The amino sugars-N predominated over other hydrolysable-N fractions and cover crops had no clear effect on the definition of that dominance. Nitrogen fertilization decreased the N levels of the most labile fractions (hydrolysable NH₄⁺ and amino sugars-N). There was a correlation between N determined by direct steam distillation and organic-N forms, particularly amino acids-N and amino sugars-N, which defined these fractions as organic N pools that controls the N availability.

Keywords: nitrogen fertilization, legumes, grasses, amino sugars-N, available N, direct steam distillation method

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio ocorre no solo em formas inorgânicas e orgânicas. As formas inorgânicas compreendem N-NH_3 , N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- , das quais N-NH_4^+ e N-NO_3^- são as assimiladas pelas plantas e, na maior parte dos solos, não representam mais do que 2 a 5% do N-total. As formas orgânicas, amplamente predominantes, contêm uma diversidade muito grande de compostos, muitos deles ainda não identificados.

As formas inorgânicas de N são geradas continuamente pela decomposição microbiana das formas orgânicas e a taxa em que a decomposição ocorre define a fração do N orgânico que é disponibilizada para as plantas. O processo de decomposição microbiana é regulado por vários fatores do ambiente e também pela composição dos resíduos e da matéria orgânica (MO) do solo e, por isso, a previsão da disponibilização de N a partir do reservatório existente no solo é muito difícil. Apesar da dificuldade, ter a estimativa do N inorgânico oriundo do processo de mineralização da MO do solo é importante para melhorar a eficiência da adubação nitrogenada, uma vez que cerca de 60% do N-fertilizante aplicado é absorvido pelas plantas, sendo o restante fornecido pelo solo (CANTARELLA, 2007). Deste modo, o estudo e a utilização de métodos que possibilitem a previsão da quantidade de N orgânico que será mineralizado durante o ciclo da cultura é muito importante.

Métodos biológicos e métodos químicos podem ser usados para estimar o N mineralizável. Os métodos biológicos incluem ensaios de incubação de solo em condições controladas, de longa ou de curta duração, em que o N-mineralizado é avaliado periodicamente. Da modelagem dos dados obtém-se as estimativas do N potencialmente mineralizável do solo e da taxa de mineralização. As críticas a estes métodos, particularmente aos de longa duração, são a demora na obtenção das estimativas, o custo elevado e o uso de temperatura e umidade constantes durante a incubação no laboratório, o que não ocorre em condições de campo. O fracionamento das formas orgânicas de N é o método químico mais sofisticado. Com o uso do método podem ser detectadas alterações nas formas de N causadas por mudanças no manejo que alteram a MO do solo, incluindo a própria adubação nitrogenada. A principal crítica ao método de fracionamento é a sua complexidade,

mas ele foi o precursor de um método mais simples, que pode ser de uso rotineiro, conhecido como Illinois Soil Nitrogen Test (ISNT). Outro método químico, o da destilação a vapor direta (DVD), mais simples que o ISNT e com resultados muito semelhantes, foi proposto posteriormente. Ambos foram desenvolvidos nos EUA e estão calibrados para a cultura do milho. Embora não haja unanimidade quanto à sua eficiência, há relatos de bons resultados em várias situações. No Brasil, os métodos ISNT e DVD começaram a ser testados apenas recentemente e os resultados são promissores (OTTO et al., 2013).

Embora a aplicação e a calibração de métodos químicos como o ISNT e o DVD sejam importantes em todos os sistemas de manejo, ter métodos com sensibilidade para detectar as variações na disponibilidade de N causadas pelo cultivo de plantas de cobertura em áreas em plantio direto há muitos anos pode aumentar a precisão da recomendação da adubação nitrogenada e diminuir os custos de produção. Em função desta necessidade, objetivou-se, com este trabalho: avaliar os efeitos de plantas de cobertura em pré-safra de milho, e de doses de N em cobertura no milho, nas formas de N orgânico do solo, em experimento de longa duração; associar formas de N com disponibilidade, por meio de correlação com o N-DVD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A maior parte do nitrogênio total do solo encontra-se na forma orgânica, não prontamente disponível para as plantas. Por isso, apesar de existirem quantidades relativamente grandes de N na camada arável (mais de 7.000 kg ha⁻¹), sua baixa disponibilidade, somada à grande exigência de N pelos vegetais, faz com que seja um dos nutrientes mais limitantes à produtividade da maioria das culturas (STEVENSON, 1982).

Do N orgânico (N-org) presente nas substâncias húmicas do solo participam muitos compostos, sendo, aproximadamente, 40% material proteico (proteínas, peptídeos e aminoácidos); 5 a 6% aminoaçúcares; 35% compostos nitrogenados heterocíclicos (incluindo purinas e pirimidinas); e 19% NH₃, sendo ¼ fixada na forma de NH₄⁺. Assim, materiais proteicos e compostos heterocíclicos predominam no N-org do solo e, do fracionamento do N-org podem resultar indicações sobre a suscetibilidade de mineralização dos compostos (SHULTEN; SCHNITZER, 1998).

Para estimar as frações do N orgânico do solo são utilizados métodos químicos (MULVANEY, 1996), nos quais os extratores são soluções ácidas ou alcalinas (STEVENSON, 1996; KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001; MULVANEY et al., 2001), que extraem apenas parte do N orgânico da MO do solo. O método mais utilizado baseia-se na obtenção de hidrolisado de solo por meio de tratamento com solução ácida (HCl 3 ou 6 mol L⁻¹), sob aquecimento por várias horas. Em geral, verificam-se muitas variações no procedimento de hidrólise ácida, destacando-se: tipo e concentração do ácido, tempo e temperatura, quantidade de amostra e pré-tratamento da amostra (STEVENSON, 1982).

Quando no fracionamento se utiliza a hidrólise ácida, o N é separado inicialmente em duas frações: a hidrolisável e a não-hidrolisável (Tabela 1). As frações mais lábeis como aminoácidos, aminoaçúcares e amida são hidrolisadas (Tabela 1), enquanto que as formas mais recalcitrantes, como compostos derivados do benzeno e formas peptídicas refratárias não são hidrolisadas (SHULTEN; SCHNITZER, 1998).

Tabela 1. Fracionamento e distribuição das formas de N em função de hidrólise ácida.

Formas de N	Definição	% do N-total
N-hidrolisável		57-92
N-não hidrolisável	Diferença entre o N-total do solo e o N-hidrolisável.	8-43
----- Composição do N-hidrolisável -----		
N-amônio	Corresponde, em parte, ao N orgânico do solo solúvel em ácido e ao amônio fixado às argilas.	13-35
N-aminoaçúcares	Contém formas de N mais lábeis.	5-20
N-aminoácidos	Contém formas de N mais lábeis.	19-45
N-não identificado	Diferença entre o N-total hidrolisável e as frações N-amônio, N-aminoaçúcares e N-aminoácidos.	11-29
N-insolúvel em ácido	Nitrogênio remanescente no resíduo do solo após hidrólise ácida.	20-35

Fonte: modificado de Stevenson (1985) e Camargo (1996).

As formas identificáveis quimicamente no hidrolisado do solo são: N-total hidrolisável; N-NH₄⁺ hidrolisável (que corresponde, em parte, ao N orgânico do solo solúvel em ácido e ao amônio fixado às argilas), N-aminoácidos e N-aminoaçúcares, que representam o compartimento biológico no qual se estabelecem os processos de imobilização e mineralização do N (STEVENSON, 1996). A fração N-insolúvel em ácido, obtida a partir da diferença entre o N-total e o N-total hidrolisável, corresponde à fração do N resistente à hidrólise ácida, de natureza não proteica (SCHNITZER; HINDLE, 1981).

Para a quantificação do N em cada fração podem ser utilizados o método da destilação a vapor (BREMNER, 1965; STEVENSON, 1996) e o método da difusão, o último de maior precisão e exatidão que o primeiro (MULVANEY; KHAN, 2001; MULVANEY et al., 2001). O método de destilação a vapor, comumente usado para fracionar o N do solo por hidrólise ácida, apresenta falhas que levam à subestimação grave de duas frações principais, o N-aminoácidos e o N-aminoaçúcares. Estas falhas foram corrigidas por Mulvaney e Khan (2001) com o emprego da difusão. Na difusão usam-se câmaras do tipo Mason Jar - frascos de vidro com fechamento hermético utilizado originalmente para guardar alimentos, com adaptação na tampa para manter suspensa uma placa de Petri contendo solução ácida capaz de

adsorver a N-NH_3 liberada durante a difusão da amostra. Posteriormente, o método foi utilizado para comparar a distribuição de frações de N em solos que diferiam quanto à resposta do milho à adubação nitrogenada e os resultados mostraram concentração maior de N-aminoaçúcares em solos não responsivos ao N do que em solos responsivos, enquanto nenhuma diferença consistente foi detectada nas análises de N-total hidrolisável, N-NH_4^+ hidrolisável, ou N-aminoácido (MULVANEY et al., 2001).

A fração N-aminoácidos compreende a maior parte do N-org e pode representar até 50% do N-total dos solos; a fração N-aminoaçúcares, embora relativamente menor, contém formas de N mais lábeis (STEVENSON, 1996). Mulvaney et al. (2001) confirmaram a diferença de labilidade entre as duas frações, uma vez que constataram diminuição líquida muito maior na fração N-aminoaçúcares do que na fração N-aminoácido quando a imobilização foi controlada por lixiviações periódicas. No Brasil, Otto et al. (2013) observaram diminuição consistente da fração N-NH_4^+ hidrolisável pelo método de incubação e concluíram que esta fração é facilmente degradável e atua como fonte de N mineralizável.

Em avaliação realizada por Mulvaney et al. (2001), em 18 solos dos EUA, com teores de N-total de 0,61 a 3,49 g kg^{-1} , os teores de N-aminoácidos, N-NH_4^+ e N-aminoaçúcares em hidrolisados dos solos variaram de 70 a 908; 182 a 604 e 46 a 511 mg kg^{-1} , respectivamente. No Rio Grande do Sul, em amostras de dez solos, Camargo, Gianello e Vidor (1997) observaram que 45,4% do N total foi insolúvel em meio ácido e as frações amônio, aminoaçúcares, aminoácidos e não-identificável corresponderam a 14,7; 4,2; 17,9 e 17,8% do N-total, respectivamente.

O método de fracionamento do N foi proposto na década de 1960 (KEENEY; BREMNER, 1964; BREMNER, 1965), mas a sua aplicação aos solos tropicais, inclusive do Brasil, não é comum. Quando comparado aos outros métodos químicos, o fracionamento é difícil e demorado, mas com esta técnica é possível definir quais são os reservatórios de N do solo que mais contribuem para o N disponível, e determinar as mudanças que ocorrem na distribuição das frações do N em função de alterações no manejo do solo. Ainda, a partir de esquemas de fracionamento complexos, e após definir qual reservatório do nutriente melhor representa o N

disponível, é possível propor métodos de extração mais simples e rápidos, que possam ser colocados à disposição nas análises de solo.

A partir do fracionamento químico e da observação da diminuição da fração N-aminoácidos em ensaios de incubação de solo, Khan, Mulvaney e Hoefft (2001) desenvolveram o Illinois Soil Nitrogen Test (ISNT) para estimar o N-NH_4^+ liberado por hidrólise alcalina com solução de $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$, com o qual foi possível separar adequadamente 12 solos não responsivos e 13 solos responsivos ao N, com base no intervalo crítico de 225-235 mg kg^{-1} de N-ISNT. Com a hidrólise alcalina admite-se a liberação do N facilmente mineralizável do solo, presente nas formas de N-NH_4^+ hidrolisável e N-aminoaçúcares.

Posteriormente foi proposto o método da destilação a vapor direta (DVD), também baseado em hidrólise alcalina, mais simples do que o ISNT e que dispensa o uso das câmaras de difusão (BUSHONG et al., 2008; ROBERTS et al., 2009).

.Os métodos ISNT (KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001) e DVD (BUSHONG et al., 2008; ROBERTS et al., 2009) foram desenvolvidos para simplificar a determinação da fração do N-org do solo responsável pela ausência de resposta da cultura de milho à adubação nitrogenada identificada por Mulvaney et al. (2001). Esses métodos vêm sendo amplamente avaliados em condições de clima temperado, mas em condições de clima tropical a literatura ainda é escassa. No Brasil, Otto et al. (2013) classificaram 6 áreas experimentais cultivadas com cana-de-açúcar em altamente responsivas à aplicação de fertilizante nitrogenado, moderadamente responsivas e não-responsivas. No primeiro grupo foram colocados solos com até 57 mg kg^{-1} de N-ISNT; no segundo, solos com teores variando entre 77 e 85 mg kg^{-1} ; e não responsivas foram as áreas com N-ISNT entre 175 e 209 mg kg^{-1} . Há necessidade da continuidade da pesquisa com a cultura da cana-de-açúcar, mas há também muito interesse na aplicação do método de fracionamento e dos métodos ISNT e DVD, com possibilidade de calibração, em vários outros sistemas de produção utilizados no Brasil, como o sistema plantio direto (SPD).

No SPD, o cultivo de plantas de cobertura é uma prática muito eficaz para aumentar o estoque de MO do solo em áreas extensas, em proporção relativamente grande e em período de tempo curto. Uma das principais finalidades do cultivo de plantas de cobertura é a produção de fitomassa com teores altos de N (LIMA FILHO

et al., 2014). Diante disso e devido a ocorrência de inverno seco e, em muitos anos, do atraso no início das chuvas na região nordeste do Estado de São Paulo, cultivar a planta de cobertura em pré-safra à cultura principal é a melhor alternativa para se ter um sistema de manejo mais eficiente.

Após o manejo das plantas de cobertura, a permanência dos resíduos sobre o solo e a velocidade de liberação de nutrientes dependem de sua taxa de decomposição, a qual é condicionada pelas características intrínsecas das espécies vegetais, pela forma como elas são manejadas, pelas condições edafoclimáticas e pela entrada de N no sistema. Portanto, para melhor aproveitar os benefícios das plantas de cobertura é preciso conhecer a sua dinâmica de decomposição e a ciclagem dos nutrientes resultantes deste processo, majoritariamente vinculado à atividade dos microrganismos do solo (LIMA FILHO et al., 2014). Entre as espécies utilizadas, destacam-se as poáceas (gramíneas) e as fabáceas (leguminosas) (BERTIN; ANDRIOLI; CENTURION, 2005).

As leguminosas caracterizam-se pela capacidade de fixar o N_2 atmosférico e pela estreita relação C/N, o que confere mineralização rápida do N presente em seus resíduos culturais (PERIN et al., 2010). As gramíneas colaboram na manutenção de teores altos de MO no solo, devido à relação C/N alta e ao alto teor de lignina em sua composição, formando húmus de maior estabilidade; todavia, podem apresentar problemas em relação à disponibilidade de N (BULISANI; ROSTON, 1993). Elas são de decomposição lenta, ideais para a conservação do solo (BORTOLINI; SILVA; ARGENTA, 2000).

As leguminosas são as espécies mais usadas como plantas de cobertura, muito em função da simbiose com bactérias fixadoras do N_2 atmosférico, o que possibilita a diminuição ou até mesmo a não utilização da adubação nitrogenada mineral na cultura principal (WUTKE et al., 2009). Em estudo de Ambrosano et al. (2009), o aproveitamento do N das leguminosas pela cultura em sequência foi de cerca de 40%. Na fitomassa das gramíneas tem-se proporcionalmente mais C e menos N, pois a relação C/N é superior a 30, além de maior quantidade de lignina. Assim, as gramíneas produzem coberturas vegetais mais estáveis e de decomposição mais lenta. Desse modo, há competição mais intensa pelo N

disponível às culturas em sucessão por microrganismos decompositores (LIMA FILHO et al., 2014).

A qualidade dos resíduos culturais das plantas de cobertura é expressa normalmente em termos da sua composição bioquímica e da relação C/N (JENSEN et al., 2005). Na composição do tecido vegetal, predominam os polissacarídeos estruturais celulose e hemicelulose, seguidos de lignina, proteínas e substâncias solúveis tais como açúcares, aminoácidos, aminoaçúcares e ácidos orgânicos.

A composição bioquímica dos resíduos culturais está intimamente relacionada às condições nutricionais a que a planta foi submetida durante o seu cultivo e ao estágio de desenvolvimento em que foi manejada. Normalmente, quanto menor o teor de lignina, maior será a taxa de decomposição dos resíduos culturais. O teor varia amplamente segundo a espécie de planta utilizada e Lassus (1990) observou que a inclusão de leguminosas, com destaque para o lablab e o guandu, aumentou o teor de lignina dos resíduos culturais de superfície em relação ao sistema composto apenas por gramíneas (aveia/milho).

No solo, relativamente poucos microrganismos, com destaque para alguns fungos aeróbios, são capazes de degradar a lignina, substância altamente resistente à decomposição microbiana e que apresenta correlação negativa com a taxa de decomposição (RUTIGLIANO et al., 1996). Por isso, quanto maior a concentração de lignina em uma planta de cobertura, maior deverá ser sua contribuição ao acúmulo de MO.

A biomassa microbiana necessita assimilar simultaneamente C e N dos resíduos culturais. A assimilação de N, por sua vez, é condicionada pelo fluxo de assimilação de C e pela relação C/N dos resíduos culturais e da biomassa microbiana. Isso evidencia que a taxa de decomposição dos resíduos culturais dos adubos verdes, especialmente daqueles pobres em N, como a palha de cereais, é muito influenciada pela disponibilidade de N mineral no solo (MARY et al., 1996).

Em condições de campo, Aita et al. (2000) avaliaram a liberação de N dos adubos verdes de primavera/verão durante a decomposição de resíduos culturais de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-cinza (*Mucuna nivea*), guandu-anão (*Cajanus cajan*) e crotalária-júncea (*Crotalaria juncea*). A maior parte do N das quatro espécies foi liberada nos primeiros 35 dias após a colocação das bolsas

teladas na superfície do solo, ou seja, 48% do N dos restos culturais do feijão-deporco, 60% do N da mucuna-cinza, 40% do N da crotalaria-júncea e 46% do N do guandu-anão. Após 140 dias, a porcentagem média de liberação de N do feijão-deporco e da mucuna-cinza foi de 70%, enquanto a média da crotalaria-júncea e do guandu-anão foi de 48%. Essas diferenças, tanto nas quantidades como na cinética de liberação de N foram relacionadas às características de cada espécie, especialmente à proporção hastes/folhas e à composição bioquímica desses dois constituintes.

Comparativamente à recuperação do N de fontes minerais pelas culturas, que está em torno de 50% (LARA CABEZAS et al., 2004), a recuperação de N de adubos verdes pela primeira cultura em sucessão tem sido baixa, raramente superior a 20% (SILVA et al., 2006). Isso indica a permanência de grande parte do N no solo, que pode proporcionar efeito residual aos cultivos subsequentes e aumentar o estoque no solo.

Nenhum outro fator de natureza antropogênica controla mais acentuadamente a ciclagem biológica do N dos resíduos que a entrada de fertilizantes nitrogenados industriais. A combinação de plantas de cobertura e de adubação nitrogenada pode ter efeitos acentuados nos reservatórios de C, de N, na biomassa microbiana e na disponibilização de N para as plantas. O enriquecimento de N nos sistemas de produção tem efeitos marcantes na produtividade e na composição da comunidade vegetal (VITOUSEK et al., 2002). Os efeitos na comunidade microbiana são menos conhecidos, mas em trabalho de Bates et al. (2011) foi observado que a adição de N pode alterar a diversidade e a composição das comunidades microbianas.

Em estudos de campo é difícil determinar se as variações nas comunidades microbianas são resultado direto da adição de N ou resultado indireto de alterações em comunidades de plantas e da entrada de C ao solo (RAMIREZ et al., 2010). Por isso, o efeito do enriquecimento de N na atividade microbiana pode ser considerado contraditório, dado que a produtividade da planta em geral aumenta com a adição de N (GOUGH et al., 2000), e que isso provavelmente resulta em aumento da entrada de C nos solos. A adição de N influencia não só a composição da comunidade microbiana, mas também afeta a dinâmica do C (VITOUSEK; HOWARTH, 1991). Em estudos de campo e de laboratório foi observada diminuição da atividade microbiana

com a aplicação de N, a partir da diminuição na respiração do solo e da biomassa microbiana (RAMIREZ; CRAINE; FIERER, 2012). Da mesma forma, a atividade enzimática pode ser altamente sensível aos aumentos do N no sistema, especialmente as enzimas que degradam compostos de C (SINSABAUGH et al., 2005). Adições de N podem diminuir a mineralização do C-recalcitrante, causando declínio nas taxas de decomposição de compostos orgânicos do solo (CRAINE; MORROW; FIERER, 2007).

Em estudo com 28 solos ficou demonstrado que a adição de N tendeu a suprimir a respiração do solo em 75% e da biomassa microbiana em 89%. Além destes efeitos, a adição de N também diminuiu as atividades de quatro enzimas extracelulares: b-1,4-glicosidase (-11,6%), fosfatase ácida (-15,1%), leucina amino peptidase (-71,1%) e peroxidase (-24,7%). Assim, é possível admitir a hipótese de que com a adição de N, tem-se diminuição da atividade microbiana do solo, deslocando a capacidade metabólica das comunidades bacterianas do solo, produzindo comunidades que são menos capazes de decompor reservatórios de C do solo mais recalcitrantes e levando a aumento das taxas de sequestro de C no solo (RAMIREZ; CRAINE; FIERER, 2012).

Considerando a importância do SPD e as implicações que o cultivo de plantas de cobertura podem ter na dinâmica da MO e no ciclo do N e que, ainda, a entrada de N via fertilizante pode alterar a dinâmica das transformações dos resíduos e da MO do solo, a aplicação do método de fracionamento de N e dos métodos ISNT ou DVD a estas condições pode gerar informações importantes para adequação da adubação nitrogenada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área

O experimento está instalado na área experimental da FCAV-Unesp-Jaboticabal-SP, localizada a 21°15'22" de latitude Sul e 48°16'43" de longitude Oeste. A altitude média é de 595 m, o clima é subtropical úmido com estiagem no inverno, classificado como Cwa pelo Sistema Internacional de Classificação de Koppen. A precipitação pluvial anual média é de 1.285 mm e a temperatura média é 22,4°C. O solo do local é Latossolo Vermelho distrófico, textura argilosa típico (ANDRIOLI; CENTURION, 1999). A caracterização química do solo das camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm, feita segundo métodos descritos em Raij et al. (2001), estão na Tabela 2. Na análise granulométrica da camada de 0-20 cm foram obtidos 474 g kg⁻¹ de argila, 27 g kg⁻¹ de silte e 499 g kg⁻¹ de areia, e o método utilizado na determinação está descrito em Camargo et al. (2009).

Tabela 2. Atributos químicos do solo em amostras coletadas antes da instalação do experimento.

Prof. cm	P resina mg dm ⁻³	MO g dm ⁻³	pH CaCl ₂	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al	CTC	V
					-----	mmol _c dm ⁻³	-----		%
0-5	32	24	4,5	4,0	14	8	42	68	38
5-10	35	18	4,4	3,0	11	6	42	62	32
10-20	58	17	4,3	2,3	11	5	42	60	30
20-40	12	15	4,3	2,0	10	4	42	58	28
40-60	7	13	4,5	1,2	9	4	34	48	29

3.2 Histórico da área, tratamentos e delineamento experimental

A instalação do experimento foi feita no segundo semestre de 2000 e, desde então, a área vem sendo cultivada com plantas de cobertura em pré-safra a cultura do milho. Em todos os anos, as plantas de cobertura foram semeadas em setembro ou outubro e dessecadas em dezembro ou janeiro e, em seguida, foi feita a semeadura do milho. Entre a colheita do milho e a semeadura das plantas de cobertura, a área permaneceu em pousio.

O delineamento do experimento é blocos casualizados com parcelas subdivididas, com quatro repetições. Os tratamentos principais são as plantas de cobertura em pré-safra à cultura do milho: crotalária (*Crotalaria juncea*), feijão-deporco (*Canavalia ensiformis*), lablab (*Dolichos lablab* L.), milheto (*Pennisetum americanum*), mucuna-cinza (*Mucuna cinerea*) e vegetação espontânea (pousio). Os tratamentos secundários são quatro doses de N em cobertura na cultura do milho (0, 60, 120 e 180 kg ha⁻¹ de N). As parcelas medem 18 m x 7 m e as subparcelas, 4,5 m x 7 m.

3.3 Coleta e preparo das amostras de solo

A avaliação das formas de N orgânico (N-org) foi feita em amostras de solo coletadas na safra 2012/2013, 12 anos após o início do experimento. Nesta safra, as culturas de cobertura foram semeadas em sistema plantio direto, sem adubação de semeadura, em 19-10-2012. Todas as espécies foram semeadas com espaçamento de 0,50 m nas entrelinhas e a dessecação química ocorreu no dia 07-01-2013. No dia 08-01-2013 foi feita a semeadura do milho (híbrido BM 840 Pró), com espaçamento de 0,90 m nas entrelinhas e cerca de 55.500 plantas ha⁻¹. A adubação de semeadura do milho foi feita com 28 kg ha⁻¹ de N, 98 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 56 kg ha⁻¹ de K₂O.

As amostras de solo foram coletadas 30 dias após a semeadura do milho, em todos os tratamentos com plantas de cobertura e apenas nas parcelas que haviam recebido, nos anos anteriores, 0 (N₀) e 120 kg ha⁻¹ de N (N₁) em cobertura no milho. Na data da coleta das amostras a adubação nitrogenada em cobertura no milho, safra 2012/2013, ainda não havia sido feita. As profundidades de coleta foram 0-5; 5-10; 10-20; 20-40 e 40-60 cm de profundidade. Para a formação da amostra composta foram coletadas 10 subamostras nas entrelinhas da cultura, na área útil de cada parcela. As amostras foram secas ao ar, passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha e homogeneizadas.

3.4 Fracionamento do nitrogênio

No fracionamento do N-org do solo, a obtenção do hidrolisado ácido (HCl 6 mol L⁻¹) e do resíduo sólido, e a determinação das formas de N, foram feitas segundo o procedimento de Mulvaney et al. (2001). No hidrolisado filtrado foram determinados: N-NH₄⁺ hidrolisável (NH₄⁺-hid), N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoaçúcares, N-aminoácidos (N-Aa) e N-total hidrolisável (NT-hid). A fração N-aminoaçúcares (N-Aaç) foi obtida por diferença [(N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoaçúcares) - N-NH₄⁺ hidrolisável]. As formas de N-não identificado (N-NI) foram calculadas pela diferença entre o N-total hidrolisável e a soma das frações N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoácidos + N-aminoaçúcares. No resíduo foi determinado o N-insolúvel em ácido (N-IA).

3.4.1 Obtenção do hidrolisado ácido

Para tubos de digestão com capacidade para 50 mL foram transferidos 5 g de solo, aos quais foram adicionados 20 mL de solução de HCl 6 mol L⁻¹ e duas gotas de álcool octil. Na boca dos tubos de digestão foi colocado um funil pequeno (25 mm de diâmetro), de vidro, e os tubos foram colocados em bloco digestor pré-aquecido a 110-120°C e nele mantidos por 12 horas. A filtração do hidrolisado de solo foi feita através de papel de filtro Whatman no. 50, com 5,5 cm de diâmetro, previamente seco em estufa (105°C, 1 hora) e pesado. Na transferência do hidrolisado ácido para o papel de filtro foi feita lavagem do tubo de digestão com pequenas quantidades de água desionizada para garantir transferência completa e diminuir a concentração da solução. A filtração foi feita durante a noite e o hidrolisado filtrado foi recebido em frasco de plástico de 80 mL.

O ajuste do valor de pH do hidrolisado foi feito transferindo o extrato do copo de 80 mL para béquer de vidro de 250 mL, para o qual foi feita transferência, gota a gota, de solução de NaOH 10 mol L⁻¹ até, aproximadamente, pH 5,0 e, a partir deste valor, com adição de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ até obtenção de pH 6,5 a 6,8 (BREMNER, 1965; STEVENSON, 1996). Durante o ajuste o hidrolisado foi mantido em agitação com auxílio de agitador magnético e a mudança do valor de pH foi

acompanhada pela introdução de eletrodo combinado na solução. Na fase inicial do ajuste, a cada gota de solução de NaOH 10 mol L⁻¹ adicionada foi feita colocação do eletrodo para averiguação do valor de pH e, para introdução do eletrodo na solução, a agitação foi interrompida. Em valor de pH próximo de 5,0, com a coagulação das proteínas ocorre diminuição da velocidade de agitação, e o eletrodo pode ser mantido no hidrolisado. A partir deste valor de pH foi feita substituição da solução de NaOH 10 mol L⁻¹ para a solução 1 mol L⁻¹, que foi empregada até atingir a faixa de pH desejado. Após o ajuste do valor de pH, o hidrolisado foi transferido para balão volumétrico com capacidade para 100 mL e o volume foi completado com água desionizada, armazenado em frasco de vidro e mantido sob refrigeração (5°C) até análise.

3.4.2. Determinação das frações de N no hidrolisado ácido

a) N-NH₄⁺ hidrolisável (NH₄⁺-hid): Dez mililitros de hidrolisado foram transferidos para câmaras de difusão com capacidade para 473 mL e fechamento hermético (Mason jar), seguindo-se adição de 0,05 g de MgO com medida calibrada e 10 mL de água desionizada. Em seguida, em até 30 segundos, as câmaras foram fechadas com a tampa adaptada contendo um béquer de 50 mL, no qual foram colocados 5 mL de solução de H₃BO₃ + indicadores. Os recipientes foram movimentados suavemente para homogeneizar a amostra e mantidos em chapa aquecedora a 48-50°C por 2 h. Os béqueres foram retirados dos suportes e receberam 5 mL de água desionizada e o N-NH₄⁺ adsorvido pela solução de H₃BO₃ + indicadores (verde de bromocresol e vermelho de metila) foi titulado com solução de H₂SO₄ 0,00125 mol L⁻¹ até viragem da cor verde para rosa.

b) N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoaçúcares (NH₄⁺-hid) + N-aminoaçúcares (N-Aaç): Foram transferidos 10 mL do hidrolisado de solo e 2 mL de solução de NaOH 10 mol L⁻¹ para câmaras de difusão. A mistura foi homogeneizada e os frascos foram fechados, com intervalo máximo de 30 segundos entre a adição da solução de NaOH e o fechamento dos frascos. Os recipientes foram mantidos em

chapa aquecedora por 5 h a 48-50°C. A determinação do N-NH₄⁺ seguiu o mesmo procedimento descrito para o N-NH₄⁺ hidrolisável.

c) N-aminoácidos (N-Aa): Ao mesmo hidrolisado da fração anterior e após a completa difusão do N-(NH₄⁺ + AAç), foram adicionados 10 mL de água desionizada, 2,5 mL de solução de H₂SO₄ 5 mol L⁻¹ e 1 mL de solução de ninhidrina 100 g L⁻¹. Após homogeneização da mistura, os recipientes foram fechados, mas sem vedar totalmente, usando a tampa original, sem suporte para béquer. O aquecimento foi feito em chapa aquecedora a 95-100°C por 90 min. Após resfriamento da amostra foi adicionado 1 mL de solução de NaOH 10 mol L⁻¹, o extrato foi homogeneizado, os recipientes foram fechados em até 30 segundos após a adição da solução com a tampa modificada com suporte para béquer. No béquer, como nas outras frações, foram colocados 5 mL de solução de H₃BO₃ + indicadores, para adsorção de N-NH₄⁺. Os extratos foram reaquecidos em chapa aquecedora a 48-50°C e mantidos nesta condição por 2 h. A determinação do N-NH₄⁺ seguiu o procedimento descrito para o N-NH₄⁺ hidrolisável.

d) N-total hidrolisável (NT-hid): Para tubo de digestão foram transferidos 5 mL de hidrolisado neutralizado, 0,5 g de mistura de K₂SO₄ com catalisadores (preparada com 200 g de K₂SO₄ + 25 g de CuSO₄.5H₂O + 2,8105 g de SeO₂), 1 mL de peróxido de hidrogênio 300 mL L⁻¹ e 2 mL de H₂SO₄ 18 mol L⁻¹. Em cada tubo de digestão foram colocadas três pérolas de vidro e na boca dos tubos foi colocado um funil de vidro (25 mm de diâmetro) para garantir refluxo eficiente do líquido durante a digestão e restringir perdas de H₂SO₄. Como a digestão é turbulenta, o aumento da temperatura foi gradual e o bloco foi inclinado para que as gotas que espirrassem fossem recoletadas. O aumento de temperatura foi de 50 em 50°C até 300°C, a cada 30 min. Para finalização da digestão a temperatura foi aumentada para 330°C e, após o clareamento dos extratos (verde claro) as amostras ainda foram mantidas a 330°C por mais 2h. Após o resfriamento, todo o extrato foi transferido, com auxílio de pequenas quantidades de água desionizada, para as câmaras de difusão. As paredes das câmaras foram lavadas com, aproximadamente, 5 mL de água desionizada e, em seguida, foram adicionados 10 mL de solução de NaOH 10 mol L⁻¹

¹. A mistura foi homogeneizada e os frascos foram fechados, com intervalo máximo de 30 segundos entre a adição da solução de NaOH e o fechamento dos frascos. Os recipientes foram mantidos em chapa aquecedora por 4 h a 48-50°C. A determinação do N-NH₄⁺ seguiu o mesmo procedimento descrito para o N-NH₄⁺ hidrolisável.

e) N-não identificado (N-NI): essa forma foi calculada pela diferença entre o N-total hidrolisável e a soma das frações N-NH₄⁺ hidrolisável + N-aminoácidos + N-aminoaçúcares.

3.4.3. Determinação do N insolúvel em ácido (N-IA)

No resíduo sólido resultante do preparo do hidrolisado de solo que ficou retido no papel de filtro foi feita a determinação do N insolúvel em ácido (N-IA). O resíduo foi seco ao ar durante 6 h e, depois, em estufa a 105°C por 1 h. Em seguida, foi mantido em dessecador por 30 min, pesado, retirado do papel, homogeneizado e reservado para determinação do N insolúvel em ácido, usando 1 g de resíduo seco, 1,5 g de K₂SO₄ + catalisadores, 1 mL de peróxido de hidrogênio 300 mL L⁻¹ e 2 mL de H₂SO₄ concentrado. A digestão foi feita como descrito para a fração N-total hidrolisável e a determinação de N-NH₄⁺ seguiu o mesmo procedimento descrito para o N-NH₄⁺ hidrolisável.

3.5 Determinação do N disponível pelo método da destilação a vapor direta (DVD)

Nas amostras de solo coletadas nas camadas de 0-5 e 5-10 cm foi também determinado o N orgânico potencialmente mineralizável empregando o procedimento de destilação a vapor direta (N-DVD), segundo Roberts et al. (2009). Um grama de solo foi transferido para frasco Kjeldahl e adaptado ao destilador, recebendo 10 mL de solução de NaOH 10 mol L⁻¹. A mistura foi submetida à destilação até obtenção de 35-40 mL do destilado, que foi recebido em 10 mL de solução indicadora de

H_3BO_3 10 g L^{-1} mais indicadores. O N-NH_4^+ foi quantificado por titulação do destilado com solução de H_2SO_4 $0,0055 \text{ mol L}^{-1}$ até viragem da cor verde para rosa.

3.6 Análise estatística dos resultados

Os teores de N-org obtidos no fracionamento, em cada forma, e o N-DVD, foram submetidos à análise de variância (teste F) segundo delineamento em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, com as plantas de cobertura como tratamentos principais e as doses de N nas subparcelas. Em caso de efeito significativo dos tratamentos as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os teores de N-DVD foram correlacionados com as formas de N-org.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formas orgânicas de nitrogênio

4.1.1 N-NH₄⁺ hidrolisável

Os teores de N-NH₄⁺ hidrolisável variaram de 6,83 a 42,90 mg kg⁻¹ (Tabela 3). O N-NH₄⁺ trocável, extraído das mesmas amostras com solução de KCl 1 mol L⁻¹, variou de 1,82 a 5,05 mg kg⁻¹ (BETTIOL, 2014) e representou, na média de todos os tratamentos e profundidades de coleta, 16% do NH₄⁺-hid. Deste modo, a maior parte do NH₄⁺-hid obtido foi proveniente de formas orgânicas. O N-NH₄⁺ hidrolisável é, de fato, composto do NH₄⁺ trocável e da quebra de amidas, de hidroxiaminoácidos e outros aminoácidos, de aminoaçúcares e da desaminação de purinas e pirimidinas (SCHNITZER; HINDLE, 1980), bem como da liberação do NH₄⁺ fixado (STEVENSON, 1994), que ocorre durante a hidrólise ácida. Destas formas, a última é pouco comum em solos tropicais e, por isso, a maior parte da diferença entre N-NH₄⁺ trocável e N-NH₄⁺ hidrolisável que foi obtida deve estar associada à hidrólise de compostos orgânicos. De qualquer modo, esta fração representa o reservatório mais instável de N do solo e aquele que somado a outras frações de labilidade intermediária, particularmente N-aminoaçúcares, está mais associado à disponibilidade (BUSHONG et al., 2008; OTTO et al., 2013).

Não houve efeito do cultivo de plantas de cobertura nos teores de N na fração N-NH₄⁺ hidrolisável das camadas de 0-5, 5-10, 10-20 e 40-60 cm. Na profundidade de 20-40 cm houve interação entre plantas de cobertura x doses de N, sendo que o cultivo de mucuna resultou em maiores teores do que o de milho e de crotalária, no tratamento N₀. Neste tratamento, exceção feita à diferença entre mucuna e crotalária, os teores de N-NH₄⁺ hidrolisável foram semelhantes entre as leguminosas. No tratamento N₁ os teores de N-NH₄⁺ hidrolisável foram maiores com cultivo de lablab do que com vegetação espontânea (Tabela 3).

Tabela 3. Teores de N-NH_4^+ hidrolisável, em função de plantas de cobertura e doses de nitrogênio, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm.

		N-NH ₄ ⁺ Hidrolisável, mg kg ⁻¹									
N	Vegetação espontânea	Crotalária	Feijão de Porco	Lablab	Mucuna	Milheto	Média				
kg ha ⁻¹		-----0-5 cm-----									
0	35,95	40,50	31,35	40,90	42,90	40,80	38,73a				
120	36,23	32,83	36,38	24,68	31,15	25,85	31,18b				
Média	36,09	36,66	33,86	32,79	37,03	33,33					
		-----5-10 cm-----									
0	33,40	37,98	24,93	24,03	34,23	37,23	31,96a				
120	31,65	23,80	18,73	22,93	25,70	31,15	25,66b				
Média	32,53	30,89	21,83	23,48	29,96	34,19					
		-----10-20 cm-----									
0	23,55	37,08	22,85	28,00	25,05	32,60	28,19a				
120	34,58	18,03	17,60	24,85	15,58	23,30	22,32b				
Média	29,06	27,55	20,23	26,43	20,31	27,95					
		-----20-40 cm-----									
0	17,45abA ¹	10,75bA	13,40abA	17,43abA	20,93aA	10,58bA	15,09				
120	7,63bB	14,33abA	10,30abA	19,15aA	12,60abB	11,53abA	12,59				
Média	12,54	12,54	11,85	18,29	16,76	11,05					
		-----40-60 cm-----									
0	11,53	9,75	11,18	14,55	15,55	10,50	12,18				
120	7,58	10,70	6,83	15,38	10,88	15,63	11,16				
Média	9,55	10,23	9,00	14,96	13,21	13,06					
		0-5 cm		5-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		40-60 cm	
		F ²	CV ³	F	CV	F	CV	F	CV	F	CV
PC	0,14 ^{NS}	40,13	3,02*	28,30	1,62 ^{NS}	34,84	2,74 ^{NS}	36,39	2,73 ^{NS}	35,25	
N	10,50**	23,09	4,86*	34,37	5,13*	35,54	4,68*	28,93	0,77 ^{NS}	34,32	
PCxN	2,25 ^{NS}		0,47 ^{NS}		2,44 ^{NS}		3,86*		1,95 ^{NS}		

¹ Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey de 5% de probabilidade. ² Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ³ Coeficiente de variação em porcentagem.

Nas camadas de 0-5, 5-10 e 10-20 cm os teores de NH_4^+ -hid foram menores no tratamento N₁, na média das plantas de cobertura. Na camada de 20-40 cm também houve diminuição do NH_4^+ -hid com aplicação de N, nos tratamentos

vegetação espontânea e mucuna (Tabela 3). O efeito da adubação nitrogenada na diminuição do teor de NH_4^+ -hid ficou bem definido até 40 cm de profundidade. Nas camadas de 0-5, 5-10 e 10-20 cm a diminuição foi de cerca de 20%. Na camada de 20-40 cm a diminuição foi de 56% no tratamento com vegetação espontânea e de 40% com cultivo de mucuna. A explicação para estes resultados deve estar associada ao fato de ter havido predomínio de N-org na fração NH_4^+ -hid e ao favorecimento à mineralização de compostos orgânicos pela adubação nitrogenada, com posterior perda de N-mineral do solo ou reimplantação em outras frações mais estáveis. Como o efeito foi obtido até 40 cm de profundidade, admite-se que o processo de decomposição das raízes das plantas de cobertura tenha interferido nos resultados e que nas parcelas em que a entrada de N é maior, a taxa de decomposição é mais elevada, o que resultaria em menores teores de NH_4^+ -hid. A este respeito, Cai et al. (2015) observaram que raízes de milho adubado com N apresentaram aumento no teor de N de 90 a 104%, e diminuição de 43 a 50% na relação C/N e de 51 a 57% na relação lignina/N, em relação a raízes de plantas cultivadas sem adubação, o que resultou em aumento da taxa de decomposição.

4.1.2 N-aminoaçúcares

Dentre as frações hidrolisadas a de N-aminoaçúcares foi, de modo geral, a que apresentou os maiores teores, entre 137 e 325 mg kg^{-1} . No intervalo citado, os valores maiores referem-se aos resultados da camada de 0-5 cm e, os menores, aos da camada de 40-60 cm (Tabela 4). Xu, Shen e Ran (2003) obtiveram teores de N-aminoaçúcares semelhantes, entre 77 e 381 mg kg^{-1} , e maior acúmulo de N nesta fração devido a adubação (orgânica, NPK, adubos verdes). Neste caso, o menor teor ocorreu nas parcelas do tratamento controle e o maior no solo adubado com esterco suíno, sendo que no tratamento com adubo verde + NPK houve aumento de 266 mg kg^{-1} no N-aminoaçúcares em relação ao tratamento controle após 15 anos do início do experimento.

Tabela 4. Teores de N-aminoaçúcares, em função de plantas de cobertura e doses de nitrogênio, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm.

N-aminoaçúcares, mg kg ⁻¹										
N	Vegetação espontânea		Crotalária		Feijão de porco		Lablab	Mucuna	Milheto	Média
kg ha ⁻¹	-----0-5 cm -----									
0	241		297		325		298	283	285	288a
120	230		246		270		280	271	296	266b
Média	236b		271ab		297a		289a	277ab	290a	
	-----5-10 cm -----									
0	164		199		205		197	193	204	194
120	184		192		198		214	183	186	193
Média	174b		196ab		201ab		205a	188ab	195ab	
	-----10-20 cm -----									
0	171		171		183		180	167	170	174
120	155		169		166		158	154	187	165
Média	163		170		174		169	160	178	
	-----20-40 cm -----									
0	162		166		171		182	155	169	167b
120	194		206		189		194	197	208	198a
Média	178		186		180		188	176	188	
	-----40-60 cm -----									
0	146		144		154		158	137	148	148b
120	172		165		174		159	170	176	169a
Média	159		154		164		158	154	162	
	0-5 cm		5-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		40-60 cm	
	F ¹	CV ²	F	CV	F	CV	F	CV	F	CV
PC	5,38**	9,82	3,18*	9,10	1,08 ^{NS}	10,80	0,72 ^{NS}	9,66	0,49 ^{NS}	10,70
N	10,64**	8,60	0,05 ^{NS}	9,38	1,98 ^{NS}	13,16	11,51**	17,05	10,96**	14,21
PCxN	2,30 ^{NS}		1,45 ^{NS}		0,81 ^{NS}		0,35 ^{NS}		0,48 ^{NS}	

¹ Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ² Coeficiente de variação em porcentagem.

Práticas de manejo que favorecem o aumento da biomassa microbiana do solo, como adubação verde e adubação orgânica, de modo geral resultam em aumento nesta fração, porque os aminoaçúcares são os principais componentes das paredes das células das bactérias (LIANG et al., 2007). No presente trabalho, os

resultados obtidos para esta fração não permitiram diferenciar as áreas em pousio (vegetação espontânea) das áreas com plantas de cobertura, nas camadas de 10-20, 20-40 e 40-60 cm. Entretanto, na profundidade de 0-5 cm os cultivos de feijão-de-porco, lablab e milho resultaram em maiores teores de N-Aaç do que a vegetação espontânea e, na camada de 5-10 cm, o cultivo de lablab resultou em maiores teores do que a vegetação espontânea (Tabela 4).

Na camada de 0-5 cm a adubação nitrogenada resultou em teores de N-Aaç menores, o que sugere predomínio de mineralização de N e, nas camadas de 20-40 e 40-60 cm, em teores maiores (Tabela 4), o que sugere predomínio do processo inverso. Assim, o aumento no N-Aaç em profundidade pode ser explicado pela mineralização do N-NH_4^+ hidrolisável nas camadas mais superficiais, seguido de lixiviação e reimplantação em camadas mais profundas .

A soma das concentrações de N-Aaç com o NH_4^+ -hid (Tabelas 4 e 3) resultou em valores maiores que 225 mg kg^{-1} na camada de 0-5 cm de profundidade e menores nas demais camadas. De acordo com Khan, Mulvaney e Hoefl (2001), são consideradas responsivas à adubação nitrogenada, áreas com teores de N-Aaç menores que 225 mg kg^{-1} na camada de 0-30 cm. Por outro lado, são considerados não responsivos à adubação nitrogenada solos com teores acima de 235 mg kg^{-1} . Este critério foi proposto com base em experimentos realizados nos EUA com a cultura do milho e, aplicados ao presente trabalho, sugerem que há probabilidade de resposta a adubação nitrogenada, mesmo nas parcelas com cultivo de leguminosas em pré-safra do milho. A fração N-Aaç é mais lábil que o N-aminoácidos (OTTO et al., 2013) e Mulvaney et al. (2001) relataram que concentrações elevadas de N-aminoácidos no solo diminuem a necessidade de adubação nitrogenada, sendo essa a fração que controla o N-lábil no solo.

4.1.3 N-aminoácidos

Os teores de N-aminoácidos variaram de 66 a 256 mg kg^{-1} (Tabela 5), e como nos outros casos, os valores foram menores nas camadas mais profundas.

Tabela 5. Teores de N-aminoácidos, em função de plantas de cobertura e doses de nitrogênio, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm.

N-aminoácidos, mg kg ⁻¹											
N	Vegetação espontânea	Crotalária	Feijão de porco	Lablab	Mucuna	Milheto	Média				
kg ha ⁻¹ -----0-5 cm -----											
0	228	208	247	247	256	245	238				
120	175	231	248	223	227	228	222				
Média	201	220	247	235	241	237					
-----5-10 cm -----											
0	119	139	127	144	136	142	134				
120	122	136	152	140	120	116	131				
Média	120	138	139	142	128	129					
-----10-20 cm -----											
0	100	94	118	108	77	87	97				
120	103	95	96	79	92	117	97				
Média	101	94	107	93	84	102					
-----20-40 cm -----											
0	84	94	105	109	75	72	90				
120	96	99	93	80	86	82	89				
Média	90ab	96ab	99a	94ab	81ab	77b					
-----40-60 cm -----											
0	72	73	74	86	68	71	74				
120	80	70	66	68	79	91	76				
Média	76	71	70	77	73	81					
		0-5 cm		5-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		40-60 cm	
		F ¹	CV ²	F	CV	F	CV	F	CV	F	CV
PC	2,48 ^{NS}	13,23	1,02 ^{NS}	17,70	2,36 ^{NS}	15,35	3,99*	14,05	0,60 ^{NS}	19,36	
N	1,88 ^{NS}	18,01	0,24 ^{NS}	18,46	0,01 ^{NS}	21,60	0,01 ^{NS}	24,55	0,12 ^{NS}	26,73	
PCxN	0,78 ^{NS}		1,01 ^{NS}		2,17 ^{NS}		1,13 ^{NS}		0,95 ^{NS}		

¹ Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ² Coeficiente de variação em porcentagem.

Os teores de N-aminoácidos relatados por Xu, Shen e Ran (2003) foram maiores e variaram de 440 a 602 mg kg⁻¹ na camada de 0 a 20 cm, nos tratamentos controle e adubado com esterco suíno por 15 anos, respectivamente. Comparando o tratamento controle em ambas as situações tem-se teores de 228 g kg⁻¹ no presente

experimento, em condições tropicais, e 440 g kg^{-1} segundo Xu, Shen e Ran (2003), em solo de clima temperado, com teor de C orgânico e N-total maiores. Os maiores teores de C e N justificam, em parte, a ocorrência de maior teor de N-aminoácidos no solo de clima temperado, no entanto, o dado contraria a afirmação de Sowden, Chen e Schnitzer (1977), de que a fração N-aminoácidos é maior em solos de regiões tropicais do que em regiões temperadas. No experimento de Xu, Shen e Ran (2003) o uso de adubação verde + NPK resultou em aumento no N total de 1,30 para $1,63 \text{ g kg}^{-1}$ e, acompanhando este aumento, a fração N-aminoácidos aumentou pouco, de 440 para 493 g kg^{-1} . No presente experimento, o N total aumentou de 1,09 no controle para $1,32 \text{ g kg}^{-1}$ com o cultivo de mucuna (BETTIOL, 2014) e a diferença na fração N-aminoácidos entre os mesmo tratamentos foi de 228 para 256 g kg^{-1} , não significativa.

Em solos tropicais as concentrações de N-aminoácidos são altas, sendo que a composição de aminoácidos do hidrolisado é semelhante à existente nas células de bactérias, o que indica que em solos, os microrganismos sintetizam proteínas, peptídeos e aminoácidos a partir dos resíduos vegetais e animais (SOWDEN; CHEN; SCHNITZER, 1977). Ainda, na hidrólise ácida a quente é provável que seja liberada parte dos aminoácidos do solo que fazem parte, originalmente, de moléculas de proteínas e peptídeos intimamente associadas e protegidas por materiais húmicos e constituintes inorgânicos do solo, tais como minerais de argila e óxidos de ferro e de alumínio (SHULTEN; SCHNITZER, 1998).

Não houve efeito de plantas de cobertura nos teores de N na fração N-aminoácidos, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20 e 40-60 cm. Na profundidade de 20-40 cm o cultivo de feijão-de-porco resultou em maiores teores de N nesta fração, e os teores foram semelhantes aos obtidos com as demais leguminosas. Os resultados obtidos com as leguminosas foram semelhantes aos obtidos com a vegetação espontânea, e o cultivo de milho resultou nos menores teores de N-aminoácidos (Tabela 5). Considerando que o NT-hid foi semelhante em todos os tratamentos na camada de 20-40 cm (Tabela 7), mas o N-aminoácidos foi menor com o cultivo de milho, pode ser que parte do N, neste caso, tenha se redistribuído pelas outras frações e, pelo menos em parte, migrado para a fração N-não identificado, cujo teor neste tratamento foi maior do que nos demais (Tabela 6).

Houve correlação significativa entre teores de C orgânico do solo e teores de N-aminoácidos (Figura 1). A fração N-aminoácidos é considerada estável no solo (OTTO et al., 2013), com tendência a acumular com o tempo. Parte da estabilidade está relacionada ao fato de os aminoácidos adsorverem ao solo. Os aminoácidos básicos, como histidina, desenvolvem cargas positivas em meio ácido (WERDIN-PFISTERER; KIELLAND; BOONE, 2009) e podem adsorver aos óxidos.

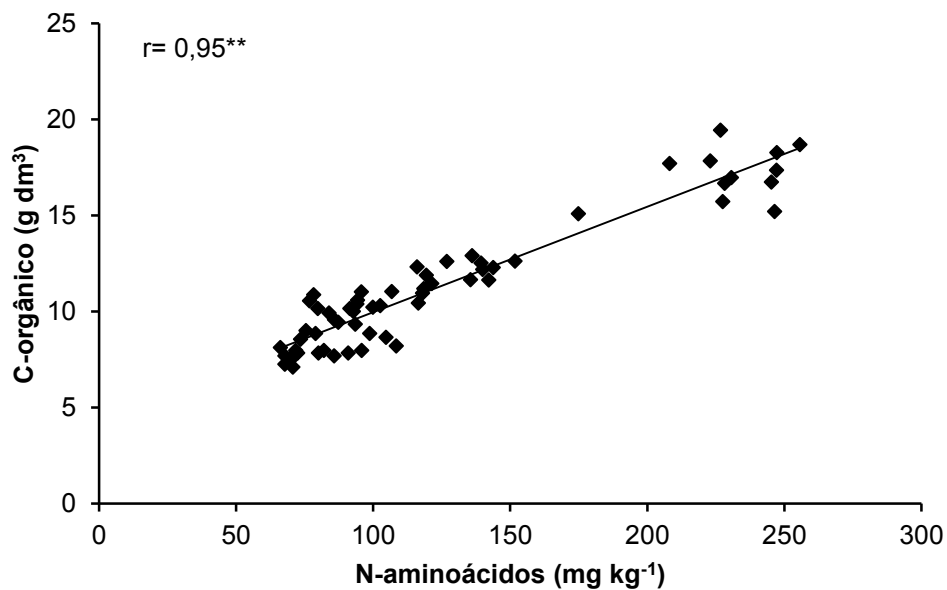


Figura 1. Correlação entre o C-orgânico do solo e o teor de N-aminoácido.

Não houve efeito da adubação nitrogenada no N-aminoácidos em nenhuma das profundidades (Tabela 5), o que também foi relatado por Xu, Shen e Ran (2003) em amostras de solo provenientes de áreas adubadas e não adubadas com NPK por 15 anos.

4.1.4 N-não identificado

Os teores de N-NI variaram de 28 a 182 mg kg⁻¹ e não houve efeito de plantas de cobertura nas camadas de 0-5, 10-20 e 40-60 cm (Tabela 6). Nas profundidades de 5-10 e 20-40 cm o cultivo de crotalária resultou em maiores teores do que o

lablab, e o cultivo de milho resultou em maiores teores do que o lablab e a crotalária, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Teores de N-não identificado, em função de plantas de cobertura e doses de nitrogênio, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm.

N-não identificado, mg kg ⁻¹										
N	Vegetação espontânea		Crotalária		Feijão de porco		Lablab	Mucuna	Milheto	Média
kg ha ⁻¹	-----0-5 cm-----									
0	92		163		123		85	120	66	108
120	182		114		113		76	124	85	115
Média	137		139		118		80	122	76	
	-----5-10 cm-----									
0	50		94		43		49	67	39	57
120	44		112		77		33	75	86	71
Média	47ab		103a		60ab		41b	71ab	62ab	
	-----10-20 cm-----									
0	62		50		39		78	82	74	64
120	70		49		71		68	71	97	71
Média	66		49		55		73	77	85	
	-----20-40 cm-----									
0	73		69		48		48	80	93	68
120	73		28		69		54	73	71	61
Média	73ab		49b		58ab		51b	76ab	82a	
	-----40-60 cm-----									
0	36		70		86		55	72	34	59
120	41		64		58		78	41	31	52
Média	38		67		72		67	56	33	
	0-5 cm		5-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		40-60 cm	
	F ¹	CV ²	F	CV	F	CV	F	CV	F	CV
PC	1,60 ^{NS}	54,57	3,09*	54,87	1,47 ^{NS}	47,29	4,63**	28,35	2,76 ^{NS}	50,41
N	0,11 ^{NS}	65,87	0,94 ^{NS}	79,61	0,31 ^{NS}	64,42	0,75 ^{NS}	45,10	0,77 ^{NS}	46,75
PCxN	0,78 ^{NS}		0,45 ^{NS}		0,32 ^{NS}		1,11 ^{NS}		1,22 ^{NS}	

¹ Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ² Coeficiente de variação em porcentagem.

Não houve efeito da adubação nitrogenada no teor de N-NI (Tabela 6), resultado oposto ao citado por Xu, Shen e Ran (2003), que relataram diminuição no N-NI devido a aplicação de fertilizante mineral, mas a diminuição foi relativamente pequena (50 mg kg^{-1}). No tratamento em que adubação NPK e adubos verdes foram combinados, não houve variação no N desta fração. Existe pouco conhecimento sobre a composição do N-NI, exceto que o N dessa fração não é N-proteína, N-peptídeo, N-aminoácidos, N-aminoaçúcares ou N-NH_3 (SHULTEN; SCHNITZER, 1998).

4.1.5 N-total hidrolisável e proporção das formas hidrolisadas

Não houve efeito do das plantas de cobertura nos teores de N na fração NT-hid, nas camadas de 0-5, 10-20, 20-40 e 40-60 cm. Na camada de 5-10 cm o cultivo de crotalária resultou em maiores teores do que a vegetação espontânea. Não houve efeito da adubação nitrogenada no NT-hid em nenhuma das camadas de solo avaliadas (Tabela 7).

O N-NH_4^+ hidrolisável representou de 4 a 6% do N total hidrolisável (NT-hid), o N-aminoaçúcares, de 42 a 56%, a fração N-aminoácidos, de 25 a 36%, e o N-NI, de 8 a 29%. Estes valores são médias das plantas de cobertura, das doses de N e das profundidades. Nas Figuras 2 a 6 os percentuais estão detalhados para cada profundidade, considerando as plantas de cobertura em cada dose de N.

As proporções do N-NH_4^+ hidrolisável em relação ao NT-hid relatadas na literatura são maiores do que as obtidas: 18 a 32% e 26 a 30%, segundo Schnitzer e Hindle (1981) e Kaur e Singh (2014), respectivamente. Reddy et al. (2003) também relataram proporção considerável do N-NH_4^+ hidrolisável no NT-hid (19 a 24%), em amostras de solo de experimento de longa duração com aplicação de fertilizantes NPK. Embora os valores obtidos neste trabalho tenham sido menores do que a variação média relatada em outros experimentos, eles estão próximos do valor relatado por Xu, Shen e Ran (2003) no tratamento com adubo verde (8%). Todas as proporções citadas foram obtidas em solos de clima temperado e, embora variem, há predomínio de valores maiores que 20%. Quando as proporções de N-NH_4^+ hidrolisável em relação ao NT-hid são comparadas entre solos de clima

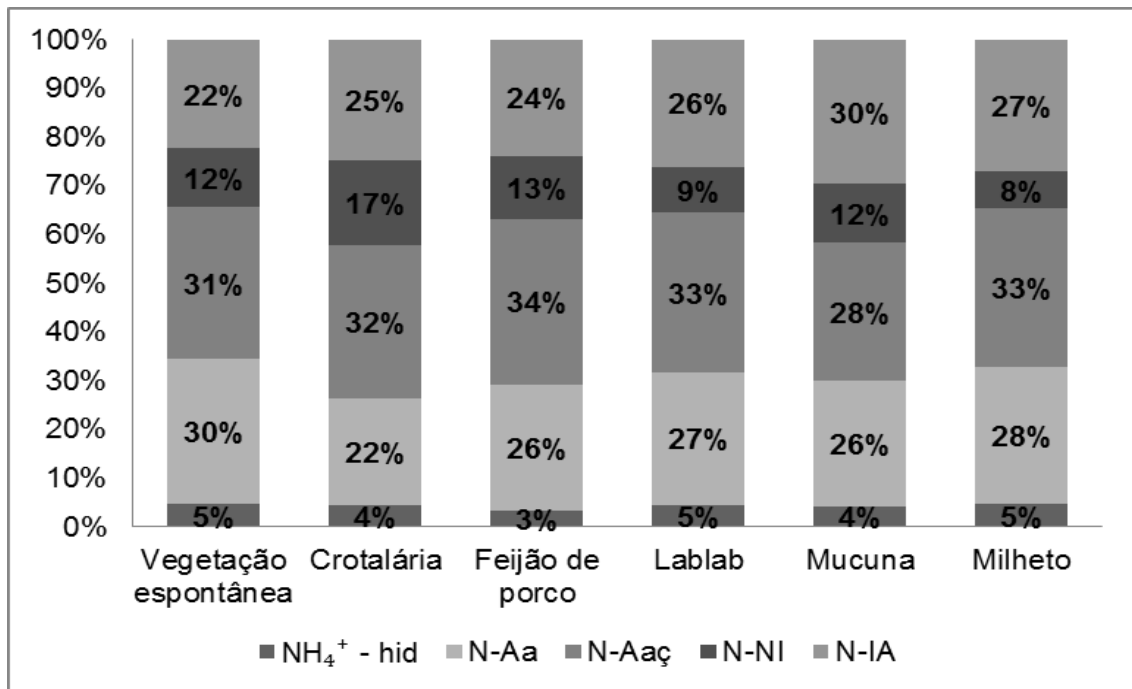
temperado e tropical a expectativa é que sejam menores em solos tropicais porque o $N-NH_4^+$ fixado a estrutura de minerais de argila 2:1 pode resultar em acúmulo desta forma em solos de clima temperado (TAN, 1996).

Tabela 7. Teores de N-total hidrolisável, em função de plantas de cobertura e doses de nitrogênio, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm.

N-total hidrolisável, mg kg ⁻¹												
N	Vegetação espontânea		Crotalária		Feijão de porco		Lablab		Mucuna		Milheto	Média
kg ha ⁻¹	-----0-5 cm-----											
0	596		708		727		670		703		638	674
120	623		624		666		603		653		635	634
Média	610		666		696		637		677		637	
	-----5-10 cm-----											
0	367		471		399		414		430		440	420
120	381		463		445		409		403		419	420
Média	374b		467a		422ab		412ab		417ab		430ab	
	-----10-20 cm-----											
0	357		352		362		361		351		364	358
120	362		330		349		330		332		423	354
Média	359		341		356		345		341		393	
	-----20-40 cm-----											
0	337		339		338		356		331		343	341
120	371		335		360		346		368		372	359
Média	354		337		349		351		349		358	
	-----40-60 cm-----											
0	265		260		324		313		293		264	286
120	300		310		305		320		301		293	305
Média	283		285		315		316		297		278	
	0-5 cm		5-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		40-60 cm			
	F ¹	CV ²	F	CV	F	CV	F	CV	F	CV		
PC	0,83 ^{NS}	15,08	4,49*	9,47	1,98N ^S	10,70	0,22 ^{NS}	8,50	1,17 ^{NS}	11,94		
N	1,83 ^{NS}	15,55	0,03 ^{NS}	15,76	0,23 ^{NS}	17,49	2,09 ^{NS}	13,77	1,80 ^{NS}	13,74		
PCxN	0,35 ^{NS}		0,28 ^{NS}		0,82 ^{NS}		0,28 ^{NS}		0,67 ^{NS}			

¹ Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ² Coeficiente de variação em porcentagem.

a)



b)

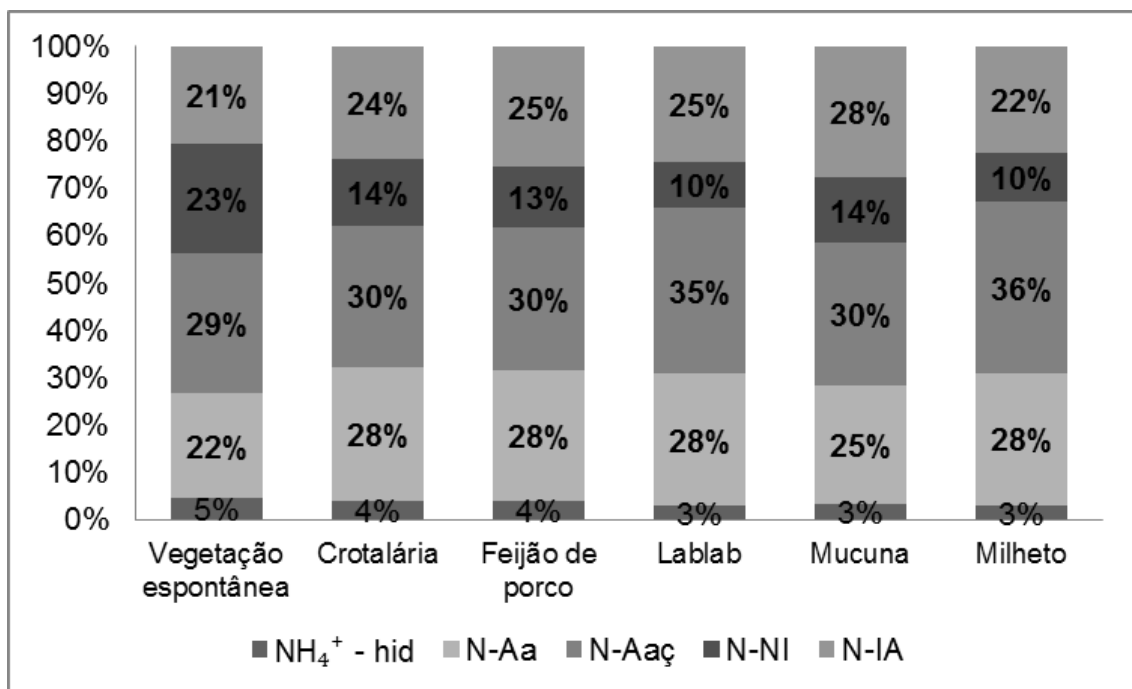
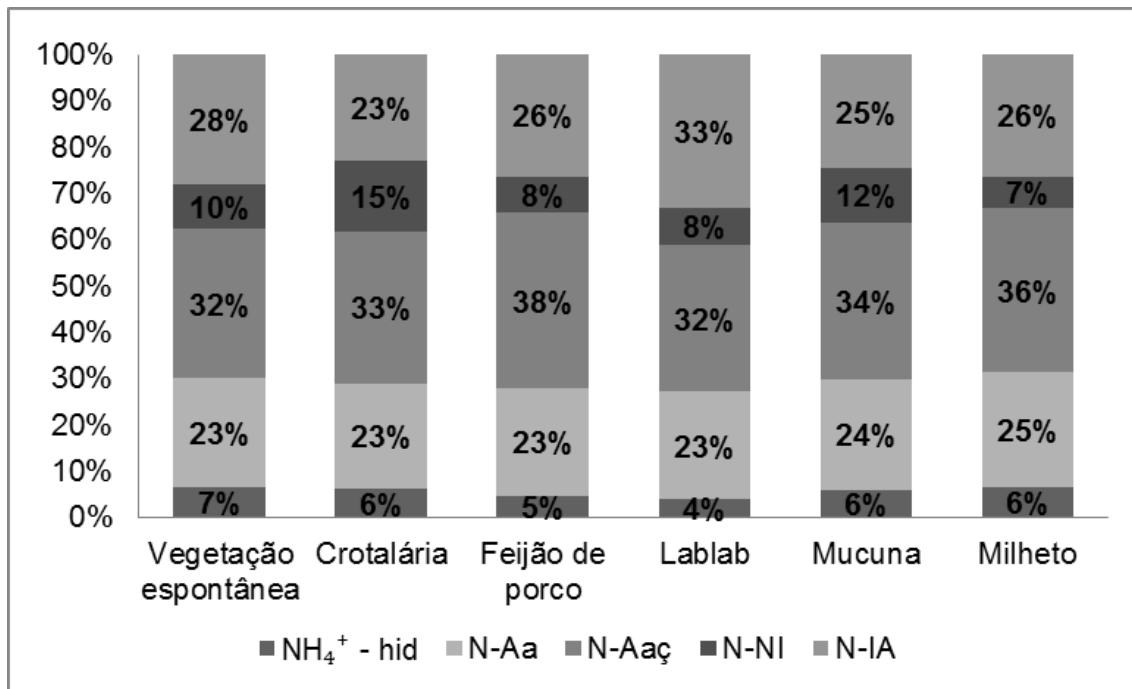


Figura 2. Porcentagem das frações de N em relação ao N total obtido por soma, em função de plantas de cobertura e das doses 0 (a) e 120 (b) kg ha⁻¹ de N em cobertura no milho, na camada de 0-5 cm.

a)



b)

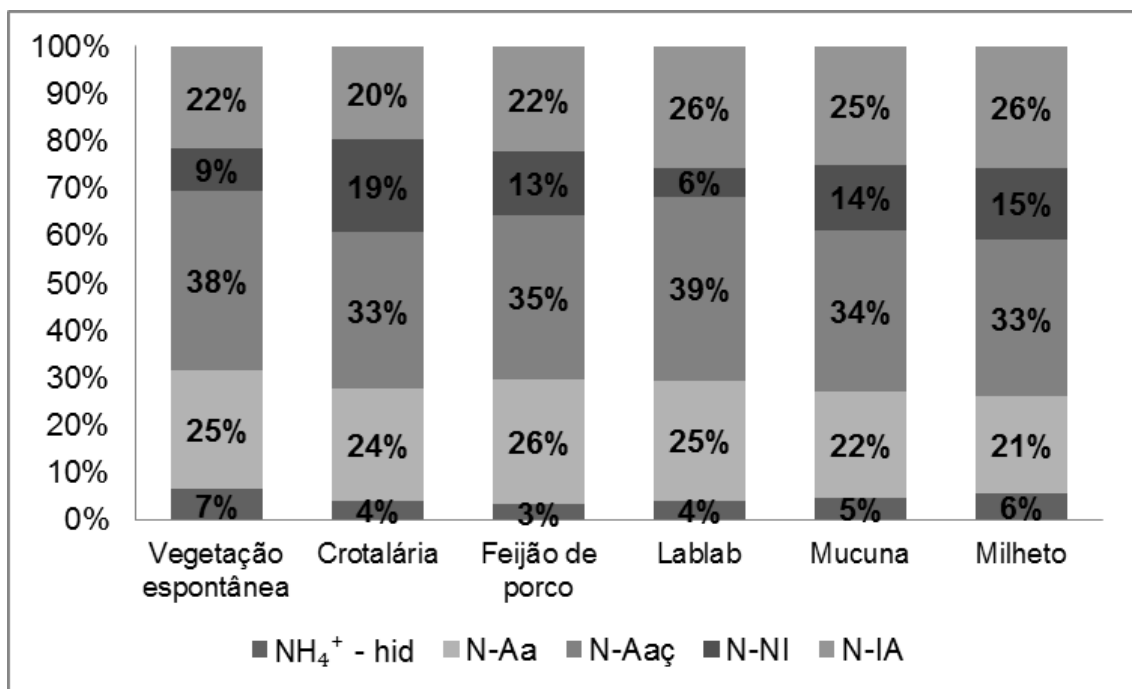
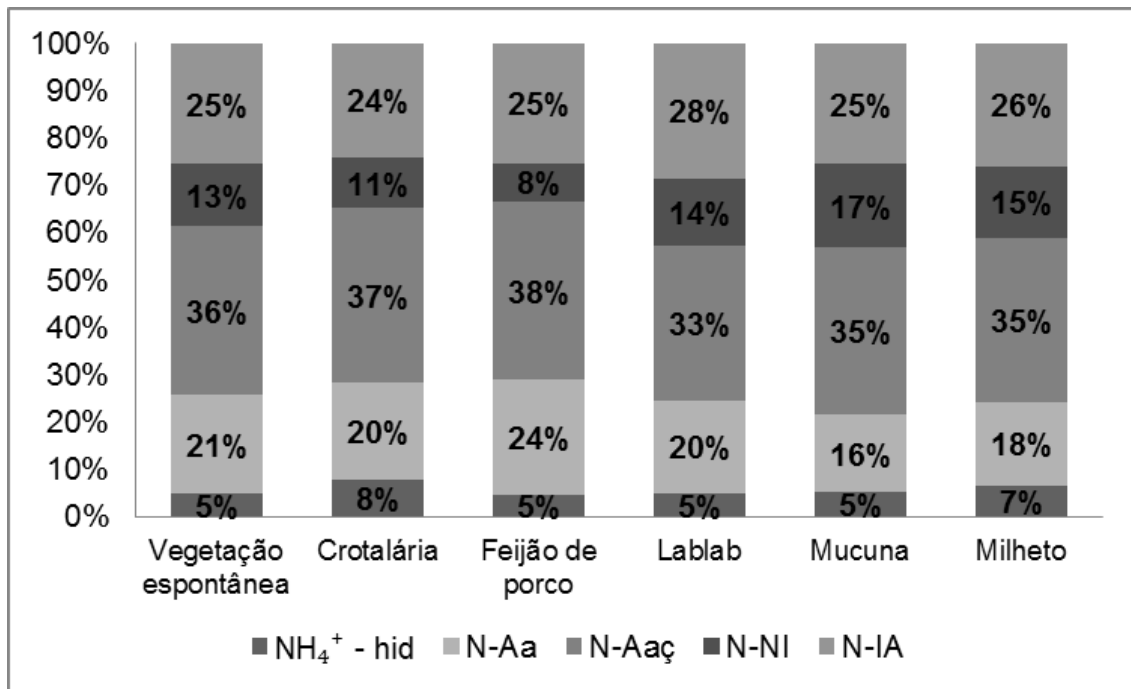


Figura 3. Porcentagem das frações de N em relação ao N total obtido por soma, em função de plantas de cobertura e das doses 0 (a) e 120 (b) kg ha⁻¹ de N em cobertura no milho, na camada de 5-10 cm.

a)



b)

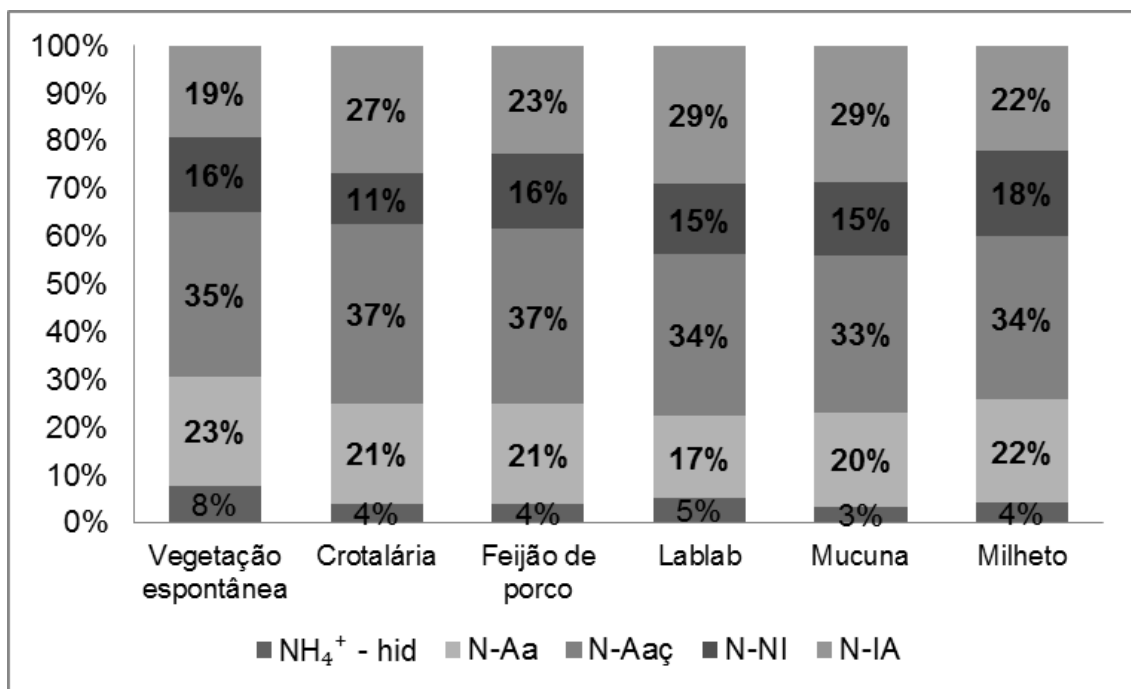
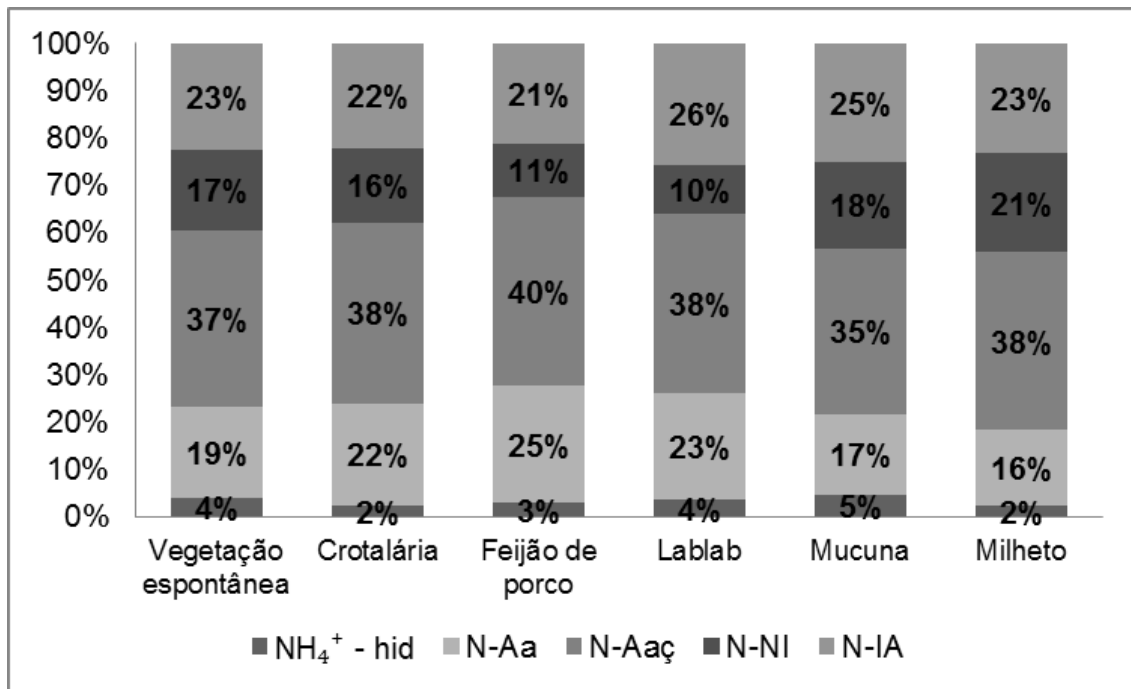


Figura 4. Porcentagem das frações de N em relação ao N total obtido por soma, em função de plantas de cobertura e das doses 0 (a) e 120 (b) kg ha⁻¹ de N em cobertura no milho, na camada de 10-20 cm.

a)



b)

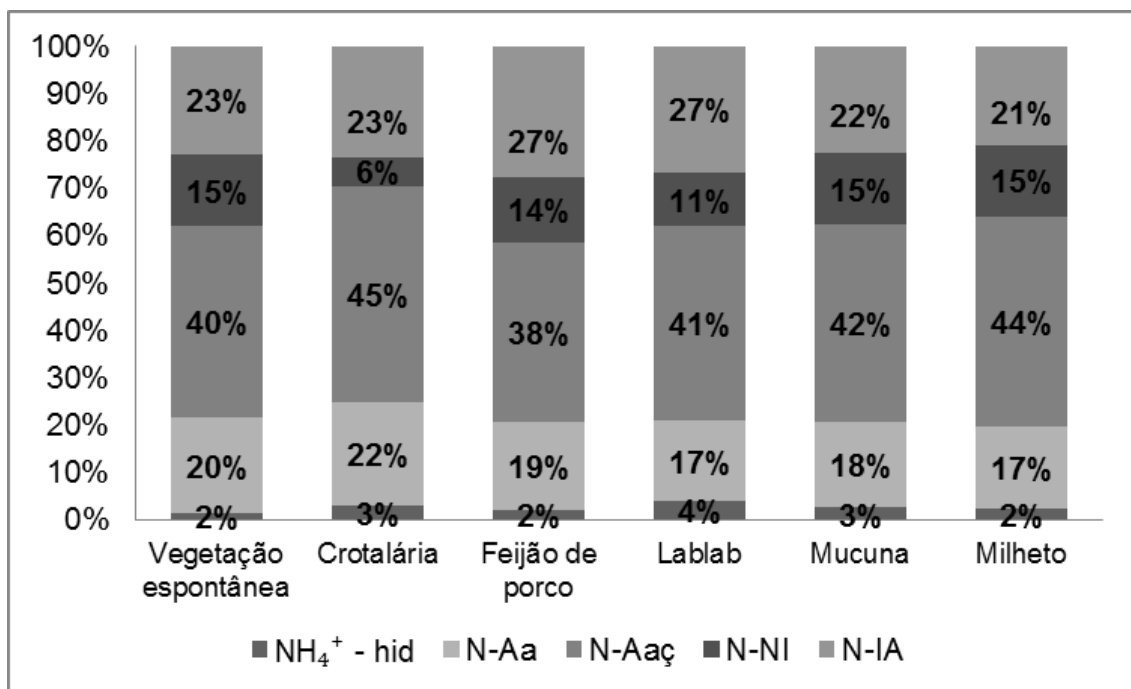
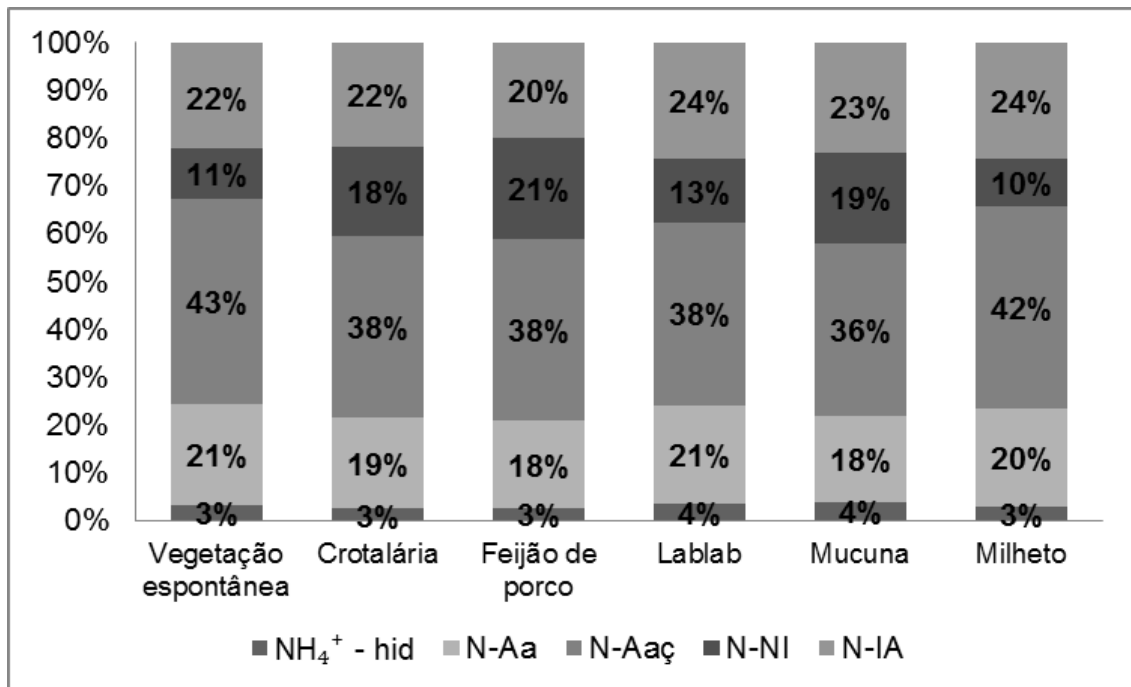


Figura 5. Porcentagem das frações de N em relação ao N total obtido por soma, em função de plantas de cobertura e das doses 0 (a) e 120 (b) kg ha⁻¹ de N em cobertura no milho, na camada de 20-40 cm.

a)



b)

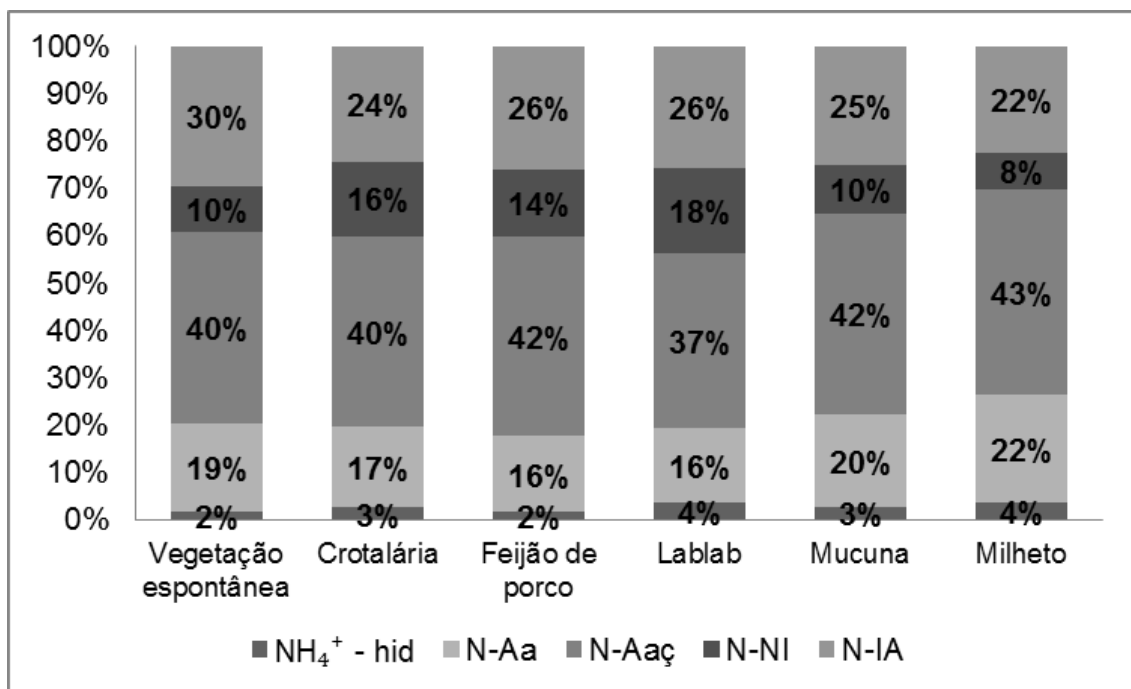


Figura 6. Porcentagem das frações de N em relação ao N total obtido por soma, em função de plantas de cobertura e das doses 0 (a) e 120 (b) kg ha⁻¹ de N em cobertura no milho, na camada de 40-60 cm.

A proporção dos N-aminoaçúcares obtida foi muito maior do que as citadas na literatura: 5 a 7% (SCHNITZER; HINDLE, 1981), 5 a 6% (SHULTEN; SCHNITZER, 1998), 7 a 26% (XU; SHEN; RAN, 2003) e 8 a 12% (KAUR; SINGH, 2014). No presente trabalho houve predomínio do N-aminoaçúcares, que não é a fração mais estável dentro do N hidrolisável, mas cujo predomínio pode estar associado ao momento em que foi feita a coleta das amostras de solo, ou seja, 30 dias após a dessecação das plantas de cobertura.

A proporção da fração N-aminoácidos obtida foi semelhante às citadas na literatura: 20 a 40% (BREMNER, 1965), 33 a 41% (SCHNITZER; HINDLE, 1981), 33 a 42% (SHULTEN; SCHNITZER, 1998), 22 a 26% (REDDY et al., 2003), 37 a 39% (XU; SHEN; RAN, 2003) e 25 a 29% (KAUR; SINGH, 2014). Por outro lado, a fração N-NI foi menor do que a citada por Xu, Shen e Ran (2003), 27 a 35% do NT-hid. Kaur e Singh (2014) encontraram teores que variaram de 95 a 147 mg kg⁻¹, o que representou a maior parte do NT-hid, ou seja, 29 a 41%, independente dos tratamentos aplicados.

A quantidade de NT-hid em relação ao N total do solo (NT-hid + N-IA) variou de 68 a 83%. Esses resultados estão de acordo com os citados por Bremner (1965), que obteve valores entre 60 e 80%, e são próximos aos obtidos por Reddy et al. (2003), 57 e 76%, e Kaur e Singh (2014), 72 a 76%. O método de hidrólise ácida de solo originou-se da hidrólise realizada em proteínas e, segundo Bremner (1965), quando ele foi proposto acreditava-se que a maior parte dos compostos orgânicos dos solos fosse de natureza proteica, o que se confirma frente aos resultados apresentados.

4.1.6 N-insolúvel em ácido

Os teores de N-IA variaram de 75 a 296 mg kg⁻¹ (Tabela 8). Xu, Shen e Ran (2003) encontraram teores de N-IA dentro do intervalo obtido no presente trabalho (131 a 285 mg kg⁻¹), com o maior teor nas parcelas com adubo verde + NPK, sendo que 10 % do N-total nas parcelas do tratamento controle foram recuperadas como N-IA. Essa proporção aumentou nas parcelas com adubação. Resultados semelhantes foram obtidos por Kelley e Stevenson (1987), que propuseram que o

processo pelo qual o N imobilizado é convertido para formas orgânicas indisponíveis começa alguns dias após a adubação e continua ao longo dos anos.

Tabela 8. Teores de N-insolúvel em ácido, em função de plantas de cobertura e doses de nitrogênio, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm.

N-insolúvel em ácido, mg kg ⁻¹												
N	Vegetação espontânea		Crotalária		Feijão de porco		Lablab		Mucuna		Milheto	Média
kg ha ⁻¹												
-----0-5 cm-----												
0	171		233		227		237		296		237	233a
120	162		195		228		196		250		184	202b
Média	166b		214ab		228ab		216ab		273a		210b	
-----5-10 cm-----												
0	142		140		143		205		140		151	153a
120	105		114		128		142		134		144	128b
Média	123		127		136		173		137		148	
-----10-20 cm-----												
0	122		111		123		157		120		127	127
120	86		120		103		135		133		119	116
Média	104		115		113		146		126		123	
-----20-40 cm-----												
0	98		96		90		124		111		104	104
120	109		106		137		126		106		98	114
Média	104		101		114		125		108		101	
-----40-60 cm-----												
0	75		83		81		101		87		85	85b
120	127		100		107		111		101		91	106a
Média	101		91		94		106		94		88	
		0-5 cm		5-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		40-60 cm		
		F ¹	CV ²	F	CV	F	CV	F	CV	F	CV	
PC		6,63**	17,28	2,52 ^{NS}	22,97	1,57 ^{NS}	26,76	0,82 ^{NS}	27,20	0,98 ^{NS}	19,85	
N		6,90*	18,80	17,42**	14,97	2,38 ^{NS}	20,06	1,38 ^{NS}	26,35	18,59**	17,53	
PCxN		0,57 ^{NS}		2,15 ^{NS}		1,25 ^{NS}		0,94 ^{NS}		1,98 ^{NS}		

¹ Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ² Coeficiente de variação em porcentagem.

Não houve efeito de plantas de cobertura nos teores de N-IA, nas camadas de 5-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm. Na profundidade de 0-5 cm houve efeito do cultivo de plantas de cobertura, sendo que o cultivo de mucuna resultou em maiores teores do que o do milho e a vegetação espontânea. Nas camadas de 0-5 e 5-10 cm houve efeito da adubação nitrogenada, com os maiores teores de N-insolúvel em ácido nas parcelas sem adubação. Na profundidade de 40-60 cm os maiores teores foram nas parcelas com adubação (Tabela 8).

A relação N-IA/NT-hid nas amostras analisadas foi de 0,2 a 0,5. Resultados semelhantes foram relatados por Kuhnen (2013), relação entre 0,2 e 0,8 (média de 0,4), em 17 amostras de solos do Planalto Ocidental do Estado de São Paulo, onde também está instalado o experimento com as plantas de cobertura em discussão. Kaur e Singh (2014) também encontraram valores semelhantes para a mesma relação, ou seja, de 0,7 a 0,8. Os valores altos da relação N-IA/NT-hid indicam que, após a hidrólise ácida, com uso de ácido forte ($\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$) e período de aquecimento longo (12 h), ainda restou grande quantidade de N que não foi hidrolisada. O N-IA corresponde à fração do N orgânico resistente a hidrólise ácida e de natureza não proteica (SCHNITZER; HINDLE, 1981). Esta fração raramente é determinada e é frequentemente ignorada e agrupada com outros compostos nitrogenados não identificados. O N-IA é considerado produto resultante da condensação de aminoácidos com açúcares redutores durante a hidrólise, mas acredita-se também que essa forma de N ocorra como componente estrutural de substâncias húmicas (STEVENSON, 1982).

4.2 Nitrogênio total

O N-total (NT) médio resultante da soma das frações (NT-hid + N-IA), considerando os dados de todos os tratamentos e as profundidades variou de 336 a 930 mg kg^{-1} . A taxa de recuperação em relação ao NT determinado por digestão ácida variou de 65 a 79% na camada de 0-5 cm, 61 a 74% na camada de 5-10 cm, 64 a 81% na camada de 10-20 cm, 65 a 82% na camada de 20-40 cm e 64 a 85% na camada de 40-60 cm. Com os dados de Kuhnen (2013) foi feito o cálculo da taxa de recuperação do fracionamento em relação ao NT por digestão e a variação

obtida, em 17 amostras de solo da camada de 0-20 cm, foi de 49 a 131%. Apesar da taxa de recuperação estar entre 61 e 85%, a correlação entre os dois métodos foi alta e significativa (Figura 7), e para dois solos do mesmo local estudados por Kuhnen (2013), os valores de recuperação obtidos no presente trabalho foram maiores. De modo geral, a taxa de recuperação do fracionamento em relação ao NT não é calculada porque a fração N-IA é obtida por diferença [NT- (NT-hid + N-IA)].

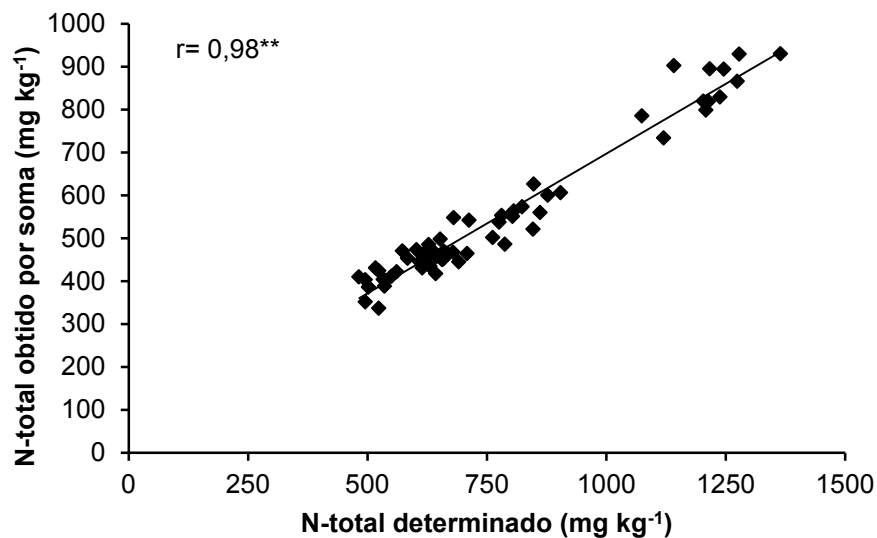


Figura 7. Correlação entre o N-total do solo determinado por digestão sulfúrica e o N-total obtido por soma.

4.3 Nitrogênio disponível avaliado pelo método da DVD

Na camada de 0-5 cm, mucuna, feijão-de-porco e crotalária resultaram em teores de N-DVD maiores do que a vegetação espontânea. Na profundidade de 5-10 cm apenas o cultivo de mucuna resultou em maiores teores do que a vegetação espontânea. Nas duas profundidades, a adubação nitrogenada aumentou os teores de N-DVD (Tabela 9), resultado oposto ao que foi obtido nas frações mais lábeis de N-org, N-NH₄⁺ hidrolisável e N-aminoaçúcares (Tabelas 3 e 4). Isso sugere que o método da DVD, em solos adubados com N, pode não representar a disponibilidade eficientemente.

Tabela 9. Teores de N-DVD em amostras de solo no décimo segundo ano de cultivo de plantas de cobertura adubadas ou não com nitrogênio.

N-DVD								
N	Prof.	Vegetação espontânea	Crotalária	Feijão de Porco	Lablab	Mucuna	Milheto	Média
kg ha ⁻¹	cm	mg kg ⁻¹						
0		102	113	113	116	119	112	112b
120	0-5	103	117	127	116	135	117	119a
Média		103b	115a	120a	116ab	127a	114ab	
			Teste F ¹		CV ²			
Plantas de cobertura (PC)			6,69 **		7,53			
Doses			7,09 *					
PC x Doses			1,24 NS					
0		83	89	93	95	102	89	92b
120	5-10	90	95	96	96	98	103	96a
Média		86b	92ab	94ab	95ab	100a	96ab	
			Teste F ¹		CV ² f			
Plantas de cobertura (PC)			3,26 *		7,54			
Doses			5,40*					
PC x Doses			1,50 NS					

¹ Valores de F seguidos de ns, * e **, representam não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente. ² Coeficiente de variação em porcentagem.

Os teores de N-DVD variaram de 83 a 135 mg kg⁻¹ (Tabela 9) e neles estão incluídas formas orgânicas mais o N-NH₄⁺ do solo. Houve correlação do N-DVD com todas as formas de N-org do solo, exceto N-NH₄⁺ hidrolisável, que, no caso do presente trabalho, foi constituída por 84% de N-org. Os coeficientes de correlação foram 0,84** (N-aminoácidos), 0,81** (N-aminoaçúcares), 0,55** (N-não identificado), 0,83** (N-total hidrolisado) e 0,79** (N-insolúvel em ácido). Portanto, foi obtida alta correlação com as frações N-aminoácidos e N-aminoaçúcares e a expectativa é que apenas as formas mais lábeis do N-org (N-NH₄⁺ hidrolisável e N-aminoaçúcares) dos solos sejam correlacionadas com o N absorvido, pois são as formas mais facilmente mineralizáveis, que resultam em aumentos no N absorvido e na produção da cultura (MOHAPATRA, 1988). Mulvaney et al. (2001) também não obtiveram correlação significativa entre produtividade de milho e teores de N-NH₄⁺ hidrolisável em solos de Illinois, e obtiveram correlação da produção de milho com a fração N-aminoaçúcares. Outros autores também definem a fração N-aminoaçúcares como sendo a que melhor representa o N disponível do solo (BREMNER, 1965; STEVENSON, 1982; MULVANEY et al., 2001; KHAN; MULVANEY; HOEFT, 2001; SPARGO et al., 2009) e, em conjunto com as outras frações de N-orgânico mais lábeis contribuem para o N-mineralizável dos solos (BUSHONG et al., 2008).

5. CONCLUSÕES

A fração N-aminoaçúcares predominou em relação às outras frações de N-hidrolisável e o cultivo de plantas de cobertura não teve efeito claro na definição desse predomínio.

A adubação nitrogenada diminuiu os teores de N das frações mais lábeis (N-NH₄⁺ hidrolisável e N-aminoaçúcares), nas camadas superficiais.

Houve correlação entre N determinado por destilação a vapor direta e formas de N obtidas no fracionamento, particularmente N-aminoácidos e N-aminoaçúcares, o que definiu estas frações como reservatórios de N orgânico controladores da disponibilidade.

6. REFERÊNCIAS

- AITA, C.; GIACOMINI, S. J.; VENDRÚSCULO, E. R. O.; CUBILLA, M.; CHIAPINOTTO, I. C.; HÜBNER, A. P.; QUAINI, D.; FRIES, M. R. Leguminosas de verão como culturas intercalares ao milho e sua influência sobre a associação de aveia (*Avena strigosa Schieb*) + ervilhaca (*Vicia sativa L.*). In: CONGRESSO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO, 17., **Anais**. Mar del Plata, 2000.
- AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMASS, E.A.; MURAOKA, T.; GUIRADO, N.; ROSSI, F. Nitrogen supply to maize from sunn hemp and velvet bean green manures. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 386-394, 2009.
- ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. 1 CD-ROM.
- BATES, S. T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, v. 5, p. 908–917, 2011.
- BERTIN, E. G.; ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Plantas de cobertura em pré-safra ao milho em plantio direto. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, p.379-386, 2005.
- BETTIOL, A. C. **Efeitos de plantas de cobertura em atributos químicos do solo**. 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.
- BORTOLINI, C. G.; SILVA, P. R.; ARGENTA, G. Sistemas consorciados de aveia preta e ervilhaca comum como cobertura de solo e seus efeitos na cultura do milho em sucessão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, p.897-903, 2000.
- BREMNER, J. M. Organic forms of nitrogen. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L.; ENSMINGER, L. E.; CLARCK, F. E. **Methods of soil analysis**. Part 2. Madison: Agronomy Monograph 9, 1965. p. 1238–1255.
- BULISANI, E. A.; ROSTON, A. J. **Leguminosas**: adubação verde e rotação de culturas. Campinas: Instituto Agrônômico, p.13-16, 1993. (Documentos IAC)
- BUSHONG, J. T.; ROBERTS, T. L.; ROSS, W. J.; NORMAN, R. J.; SLATON, N. A.; WILSON, C. E. Evaluation of distillation and diffusion techniques for estimating hydrolyzable amino sugar-nitrogen as a means of predicting N mineralization. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 72, p. 992–999, 2008.

CAI, M.; DONG, Y.; CHEN, Z.; KALBITZ, K.; ZHOU, J. Effects of nitrogen fertilizer on the composition of maize roots and their decomposition at different soil depths. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 67, p. 43-50, 2015.

CAMARGO, F. A. O. **Fracionamento e dinâmica do nitrogênio orgânico em solos do Rio Grande do Sul**. 1996. 152 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CAMARGO, F. A. O.; GIANELLO, C.; VIDOR, C. Comparative study of five hydrolytic methods in the determination of soil organic nitrogen compounds. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 28, p. 1303-1309, 1997.

CAMARGO, F. A. O.; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A.; VALADARES, J. M. A. S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2009. 77p. (Boletim técnico, 106).

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.551-594.

CRAINE, J. M.; MORROW, C.; FIERER, N. Microbial nitrogen limitation increases decomposition. **Ecology**, Tempe, v. 88, p. 2105–2113, 2007.

GOUGH, L.; OSENBERG, C. W.; GROSS, K. L.; COLLINS, S. L. Fertilization effects on species density and primary productivity in herbaceous plant communities. **Oikos: a journal of ecology**, Copenhagen, v. 89, p. 428–439, 2000.

JENSEN, L. S.; SALO, T.; PALMASON, F.; BRELAND, T. A.; HENRIKSEN, T. M.; STENBERG, B.; ESALA, M. Influence of biochemical quality on C and N mineralization from a broad variety of plant materials in soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, p. 307-326, 2005.

KAUR, J.; SINGH, J. P. Long-term effects of continuous cropping and different nutrient management practices on the distribution of organic nitrogen in soil under rice-wheat system. **Plant, Soil and Environment**, v. 60, p. 63-68, 2014.

KEENEY, D. R.; BREMNER, J. M. Effect of Cultivation on the Nitrogen Distribution in Soils. **Soil Science Society America Proceedings**, Madison, v. 28, p. 653-656, 1964.

KELLEY, K. R.; STEVENSON, F. J. Effect of carbon source on immobilization and chemical distribution of fertilizer N in soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 55, p. 946–95, 1987.

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

KUHNEN, F. **Mineralização de nitrogênio de solos e de resíduo orgânico em laboratório e em campo**. 2013. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

LARA CABEZAS, W. A. R.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; SANTANA, D. G. de. Influência da cultura antecessora e da adubação nitrogenada na produtividade de milho em sistema plantio direto e solo preparado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1005-1013, 2004.

LASSUS, C. Composição dos resíduos vegetais de um solo manejado com nove sistemas de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, p. 375-380, 1990.

LIANG, C.; ZHANG, X. D.; RUBERT, K. F. IV.; BALSER, T. C. Effect of plant materials on microbial transformation of amino sugars in three soil microcosms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, p. 631-639, 2007.

LIMA FILHO, O. F.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. Brasília: EMBRAPA, 2014. 507p.

MARY, B.; RECOUS, S.; DARWIS, D.; ROBIN, D. Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 181, p. 71- 82, 1996.

MOHAPATRA, S. P. Fractions of soil nitrogen during different periods of submergence and their effects on yield and nutrition of wetland rice (*Oryza sativa* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, p. 45-49, 1988.

MULVANEY, R. L. Nitrogen – Inorganic forms. In: SPARKS, D. L. et al. (Eds.) **Methods of soil analysis**. Part 3. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 1123–1184.

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

MULVANEY, R.L.; KHAN, S.A.; HOEFT, R.G.; BROWN, H. M. A soil organic nitrogen fraction that reduces the need for nitrogen fertilization. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 1164-1172, 2001.

OTTO, R.; MULVANEY, R. L.; KHAN, S. A.; TRIVELIN, P. C. O. Quantifying soil nitrogen mineralization to improve fertilizer nitrogen management of sugarcane. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 1, p. 1-12, 2013.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; CABALLERO, S. S. U.; GUERRA, J. G. M.; GUSMÃO, L. A. Acúmulo e liberação de P, K, Ca e Mg em crotalária e milho solteiros e consorciados, **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, p. 274-281, 2010.

RAIJ, B. van.; QUAGGIO, J. A. Determinação de fósforo, cálcio, magnésio e potássio extraídos com resina trocadora de íons. In: RAIJ, B. van.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (eds.) **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. p. 189-199.

RAMIREZ, K. S.; LAUBER, C. L.; KNIGHT, R.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. **Ecology**, Tempe, v. 91, p. 3463–3470, 2010.

RAMIREZ, K. S.; CRAINE, J. M.; FIERER, N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. **Global Change Biology**, Oxford, v. 18, p. 1918–1927, 2012.

REDDY, K. S.; SINGH, M.; TRIPATHI, A. K.; SINGH, M.; SAHA, M. N. Changes in amount of organic and inorganic fractions of nitrogen in an Eutrochrept soil after long-term cropping with different fertilizer and organic manure inputs. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, p. 232-238, 2003.

ROBERTS, T. L.; NORMAN, R. J.; SLATON, N. A.; WILSON JUNIOR, C. E.; ROSS, W. J.; BISHONG, J. T. Direct steam distillation as an alternative to the Illinois Soil Nitrogen Test. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 73, n. 4, p. 1268-1275, 2009.

RUTIGLIANO, F. A., DE SANTO, A. V., BERG, B., ALFANI, A.; FIORETTO, A. Lignin decomposition in decaying leaves of *Fagus sylvatica* L. and needles of *Abies alba* Mill. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 28, p. 101-106, 1996.

SCHNITZER, M.; HINDLE, D. A. Effect of peracetic acid oxidation on N-containing components of humic materials. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 60, p. 541–548, 1980.

SCHNITZER, M.; HINDLE, D. A. Effects of different methods of acid hydrolysis on the nitrogen distribution in two soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 60, p. 237-243, 1981.

SHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 26, p. 1-15, 1998.

SILVA, E. C. ; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; TRIVELIN, P. C. O. Manejo de nitrogênio no milho sob plantio direto com diferentes plantas de cobertura, em Latossolo Vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 477-486, 2006.

SINSABAUGH, R. L.; GALLO, M. E.; LAUBER, C. L.; WALDROP, M. P.; ZAK, D. R. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 75, p. 201–215, 2005.

SOWDEN, F. J.; CHEN, Y.; SCHNITZER, M. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. **Geochim Cosmochim Acta**, London, v. 41, p. 1524–1526, 1977.

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

STEVENSON, F. J. Nitrogen-organic forms. In: PAGE, A. L. (Ed.). **Methods of soil analysis: Chemical and Microbiological Properties. Part 2.** Madison: Soil Science Society of America, 1982. p. 625-641.

STEVENSON, F. J. **Humic Chemistry: genesis, composition, reaction.** 2 ed. New York: John Wiley, 1994. p. 59–95.

STEVENSON, F. J. Nitrogen – Organic forms. In: SPARKS, D. L. **Methods of Soil Analysis: Chemical Methods.** Part 3. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p.1185-1200.

TAN, K. H. **Soil Sampling, preparation and analysis.** New York: Marcel Dekker. 1996. p. 137.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, p. 87–115, 1991.

VITOUSEK, P. M.; HATTENSCHWILER, S.; OLANDER, L.; ALLISON, S. D. Nitrogen and nature, **Ambio**, Stockholm, v. 31, p. 97–101, 2002.

XU, Y. C.; SHEN, Q. R.; RAN, W. Content and distribution of forms of organic N in soil and particle size fractions after long-term fertilization. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, p. 739-745, 2003.

WERDIN-PFISTERER, N. R.; KIELLAND, K.; BOONE, R. D. Soil amino acid composition across a boreal forest successional sequence. **Soil Biology and Biochemistry**, *Elmsford*, v. 41, p. 1210–1220, 2009.

WUTKE, E.; TRANI, P. E.; AMBROSANO, E. J.; DRUGOWICH, M. I. **Adubação verde no Estado de São Paulo.** Campinas: CATI, 2009. 89p. (Boletim técnico, 249)