

Determinação de N₂ e N₂O derivados da ureia e do nitrato de amônio marcados com ¹⁵N

João José de Miranda Milagres⁽¹⁾; Carlos Roberto Sant'Ana Filho⁽²⁾; João Luís Bigatão Souza⁽³⁾; André Cesar Vitti⁽⁴⁾; Paulo Cesar Ocheuze Trivelin⁽⁵⁾; José Albertino Bendassolli⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Engenheiro Agrônomo da Universidade Federal de Viçosa, Doutorando em Ciências no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo; Piracicaba, SP; jmilagres@cena.usp.br; ⁽²⁾ Químico, Pós-Doutorando do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo; ⁽³⁾ Graduando em Agronomia, Escola de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo; ⁽⁴⁾ Pesquisador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios; ⁽⁵⁾ Professor Associado do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo.

RESUMO: O método do traçador isotópico (¹⁵N) é indicado para análise simultânea de N₂ e N₂O derivados do fertilizante marcado, mas, apesar da indicação, este método ainda não foi utilizado no Brasil para determinação em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi quantificar, por meio do método do traçador isotópico, as emissões de N₂ e N₂O a partir da aplicação, na cultura da cana-de-açúcar, dos fertilizantes marcados com ¹⁵N, ureia e nitrato de amônio, e correlacionar as emissões com o teor de N-NO₃⁻ do solo. Em um experimento, utilizando um fatorial 2x2x2, foram testadas duas fontes de N (ureia e nitrato de amônio, ambas marcadas com 32,9% em átomos de ¹⁵N), duas doses de N (55 e 110 kg ha⁻¹), com e sem a adição de vinhaça (100 m³ ha⁻¹). Durante 10 dias consecutivos, amostras de gás foram retiradas de coletores instalados na linha de adubação e analisadas em espectrômetro de massas de razão isotópica, para a quantificação das emissões diárias de N₂ e N₂O. Amostras de solo, também coletadas na linha de adubação, foram analisadas para a determinação do N-NO₃⁻. Não foram observadas emissões nos tratamentos com ureia. O enriquecimento isotópico dos fertilizantes em 32,9% em átomos de ¹⁵N, não foi suficiente para marcar o N₂ gerado, impedindo a sua quantificação. A vinhaça potencializou as emissões de N₂O nos tratamentos com nitrato de amônio e o teor de N-NO₃⁻ não apresentou uma boa correlação com as emissões deste gás.

Termos de indexação: cana-de-açúcar, vinhaça, espectrometria de massas de razão isotópica.

INTRODUÇÃO

As emissões de N₂ e N₂O, derivados do fertilizante nitrogenado, reduzem a eficiência da adubação e podem causar danos ambientais, uma vez que o N₂O é um dos principais gases causadores do efeito estufa (IPCC, 2007), além de poder atuar na destruição da camada de ozônio (Crutzen, 1972).

Um dos métodos indicados para medir, simultaneamente, o N₂ e o N₂O é o método do traçador isotópico (¹⁵N), mas, apesar da sua indicação para determinações em laboratório e a campo, não foi utilizado no Brasil até então. A aplicação do método requer um alto enriquecimento do fertilizante e a utilização do espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) para a quantificação dos gases, sendo a mensuração bastante complexa, principalmente, devido à dificuldade de medição do N₂ em uma atmosfera composta por 78% (v/v) deste gás. Nos solos, dois processos biológicos se destacam na geração desses gases: a nitrificação, para N₂O, e a desnitrificação, para N₂O e N₂ (Koll et al., 2011). Dentre os principais fatores que favorecem a ocorrência destes processos no solo estão: a disponibilidade e a forma da fonte nitrada, a concentração de oxigênio e a disponibilidade de uma fonte lábil de carbono (Coyne, 2008).

O objetivo deste trabalho foi quantificar, por meio do método do traçador isotópico, as emissões de N₂ e N₂O a partir da aplicação, na cultura da cana-de-açúcar, dos fertilizantes marcados com ¹⁵N, ureia e nitrato de amônio, e correlacionar as emissões com o teor de N-NO₃⁻ do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental e tratamentos

Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2 x 2 x 2, correspondendo a duas fontes de N (ureia (U) e nitrato de amônio (NA), ambos com 32,9% em átomos de ¹⁵N, sendo o NA duplamente marcado), duas doses de N (55 e 110 kg ha⁻¹), com e sem a aplicação de vinhaça (100 m³ ha⁻¹), em delineamento em blocos ao acaso, com 4 repetições. O experimento foi conduzido em uma lavoura de cana soca, colhida sem despalha a fogo no mês de setembro e cultivada em um Latossolo Vermelho com 58,1 dag kg⁻¹ de argila. A adubação foi realizada em filete contínuo, a 0,2 m da linha de plantio. As fontes marcadas com ¹⁵N foram utilizadas somente dentro das câmaras de coleta de

gás, que consistiram de potes de vidro de 5,9 cm de diâmetro, sem fundo e com tampa metálica contendo vedante interno para o fechamento hermético. As tampas possuíam um septo de borracha para a amostragem do gás. Uma semana antes da aplicação dos tratamentos, as câmaras foram inseridas no solo das parcelas, a 3 cm de profundidade, ficando com um volume livre de 150 cm³. A aplicação da vinhaça ocorreu logo após a adubação.

Amostragem e análise dos gases

Vinte e quatro horas após a aplicação dos tratamentos, e nos dias seguintes, as câmaras foram fechadas por 3 h, das 8:00 às 11:00 h. Para análise de N₂, foram coletadas, com auxílio de seringas de insulina, amostras de 0,2 mL de gás, que foram imediatamente injetadas em frascos de 12 mL contendo uma pressão positiva de He. Para análise de N₂O, foram coletadas amostras de 60 mL de gás, sendo transportadas nas seringas para o Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear (LIE-CENA-USP), onde foram concentradas em linha de alto vácuo e acondicionadas em frascos de 12 mL para posterior análise no espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS Hydra 20-20 SerCon Co., UK), interfaceado com um analisador automático de N e C (ANCA-GSL, SerCon Co., UK), acoplado a um amostrador automático (222 XL Liquid Handler, Gilson). As coletas foram realizadas diariamente, entre os dias 22 e 31 de janeiro de 2013.

As concentrações de N₂ e N₂O nas amostras gasosas foram calculadas usando, como padrão de referência, uma mistura gasosa (N₂ + N₂O) de concentração conhecida. O padrão de N₂ utilizado foi o ar atmosférico (78% em volume de N₂ e 0,3663% de átomos de ¹⁵N), considerando a densidade do ar igual a 1,20 µg µL⁻¹. O padrão de N₂O foi extraído de um cilindro comercial com pureza de 99,9 % (0,3663% de átomos de ¹⁵N) e densidade de 1,80 µg µL⁻¹. Os padrões de referência foram coletados utilizando-se seringas de insulina, sendo injetados, volumes de 100 µL de ar + 100 µL de N₂O, correspondendo às quantidades de 48,8 µg de N-ar e 114,55 µg de N-N₂O.

Para calcular as emissões de N-N₂ e N-N₂O, provenientes do fertilizante marcado com ¹⁵N, utilizou-se a equação da diluição isotópica (Cabrera & Kissel, 1989).

As emissões de N-gás provenientes do fertilizante foram expressas em g ha⁻¹ dia⁻¹, considerando o diâmetro da câmara (5,9 cm) e o espaçamento entre linhas de adubação (1,5 m).

Amostragem e análise do N-NO₃⁻

Para a análise de N-NO₃⁻, amostragens de solo foram realizadas nos dias 23, 26 e 29 de janeiro. Em cada amostragem foram retiradas, na linha de adubação de cada parcela, 3 amostras simples, para a formação de uma amostra composta. Logo após a homogeneização das amostras simples, a amostra composta foi acondicionada em saco plástico, devidamente identificado, e levada para um recipiente térmico contendo gelo seco. As amostras foram mantidas a 4 °C, em refrigeração, até o momento das análises dos teores de N-NO₃⁻, que foram determinados em extrato de KCl 2,0 mol L⁻¹, usando-se um sistema automático de injeção em fluxo contínuo (FIA) (Giné et al., 1980).

Análise estatística

Os resultados das emissões acumuladas de N-gás provenientes do fertilizante foram testados para a normalidade e log-transformados (log(variável + 1)) antes de serem submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectadas emissões nas parcelas que receberam a ureia como fertilizante. É possível que grande parte do N da ureia tenha sido volatilizado na forma de NH₃, uma vez que o adubo foi aplicado sobre a palha remanescente da colheita. Se houve a formação de N₂O durante a nitrificação do NH₄⁺ da ureia, as quantidades emitidas ficaram abaixo do limite de detecção do IRMS.

Também não foram detectadas emissões de N₂. Embora Stevens & Laughlin (1998) tenham sugerido uma faixa de enriquecimento do fertilizante variando de 20 a 80% em átomos de ¹⁵N, a marcação isotópica utilizada no presente trabalho (32,9%), não foi suficiente para marcar o N₂ produzido durante a desnitrificação.

As emissões de N₂O foram detectadas nos tratamentos com NA, e a adição de vinhaça potencializou estas emissões. O aumento na emissão de N₂O, quando a vinhaça é utilizada em cana-de-açúcar, também foi relatada por Carmo et al. (2012). Nos tratamentos que receberam a vinhaça (V+), não foram observadas diferenças entre as doses de N (**Tabela 1**). Nos tratamentos sem a vinhaça (V-), a emissão acumulada de N₂O foi maior na dose mais elevada.

As maiores emissões de N₂O, ocorridas no 5º dia após a aplicação do NA, só apresentaram correlação com o teor de N-NO₃⁻ do solo, no tratamento V+ (**Figura 1**). Sem a vinhaça, embora o teor de N-NO₃⁻ no tratamento N110 tenha sido alto, a emissão de N₂O foi baixa. A adição da vinhaça,



que também é fonte de N, não aumentou os teores de N-NO_3^- no solo. É possível que o carbono contido na vinhaça tenha sido o responsável pelo aumento das emissões de N_2O , uma vez que os principais microrganismos desnitrificadores são organotróficos, ou seja, necessitam de uma fonte lábil de C para obtenção de energia (Bremner, 1997).

CONCLUSÕES

A nitrificação do NH_4^+ da ureia não gera N_2O suficiente para ser mensurado com o protocolo analítico utilizado no IRMS do LIE-CENA-USP.

A marcação isotópica de 32,9% em átomos de ^{15}N dos fertilizantes utilizados neste trabalho, não é suficiente para marcar o N_2 gerado pela desnitrificação.

O N-NO_3^- do solo não apresenta boa correlação com a emissão de N_2O .

A aplicação de vinhaça potencializa as emissões de N_2O quando o fertilizante aplicado é o nitrato de amônio.

REFERÊNCIAS

- BREMNER, J.M. Sources of nitrous oxide in soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49:7-16, 1997.
- CABRERA, M.L. & KISSEL, D.E.; Review and simplification of calculations in ^{15}N tracer studies. *Fertilizer Research*, 20:11-15, 1989.
- CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L.C.; SOUZA NETO, E.R.; PITOMBO, L.M.; DUARTE-NETO, P.J.; VARGAS, V.P.; ANDRADE, C.A.; GAVA, G.J.C.; ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; NETO, A.E.; MARTINELLI, L.A. (2012). Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *Global Change Biology Bioenergy*. doi: 10.1111/j.1757-1707.2012.01199.x
- COYNE, M.S. Biological Denitrification. In: SCHEPERS J.S. & RAUN, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agron. Monogr. 49. Madison, WI: ASA, CSSA, SSSA, 2008. p.201-254.
- CRUTZEN, P. J. SSTs – A threat to the earth's ozone shield. *Ambio*, 1:41-51, 1972.
- GINÉ, M.F.; BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 114:191-197, 1980.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 996p.
- KOLL, D.M.; DOLFING, J.; WRAGE N.; VAN GROENIGEN, J.W. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43:174-178, 2011.
- STEVENS, R.J. & LAUGHLIN, R.J. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52:131-139, 1998.

Tabela 1 – Emissões acumuladas de N-N₂O (g ha⁻¹) provenientes do fertilizante marcado ¹⁵NH₄¹⁵NO₃.

Dose de N (kg ha ⁻¹)	Vinhaça (100 m ³ ha ⁻¹)	
	SEM (V-)	COM (V+)
55	4,25 bB	192,74 aA
110	31,55 aB	187,09 aA

Diferentes letras minúsculas, dentro dos tratamentos com (V+) e sem vinhaça (V-), indicam diferenças significativas entre as doses de 55 (N55) e 110 (N110) kg ha⁻¹ de N. Diferentes letras maiúsculas, dentro de cada dose, indicam diferenças significativas entre os tratamentos V+ e V- (P < 0,05).

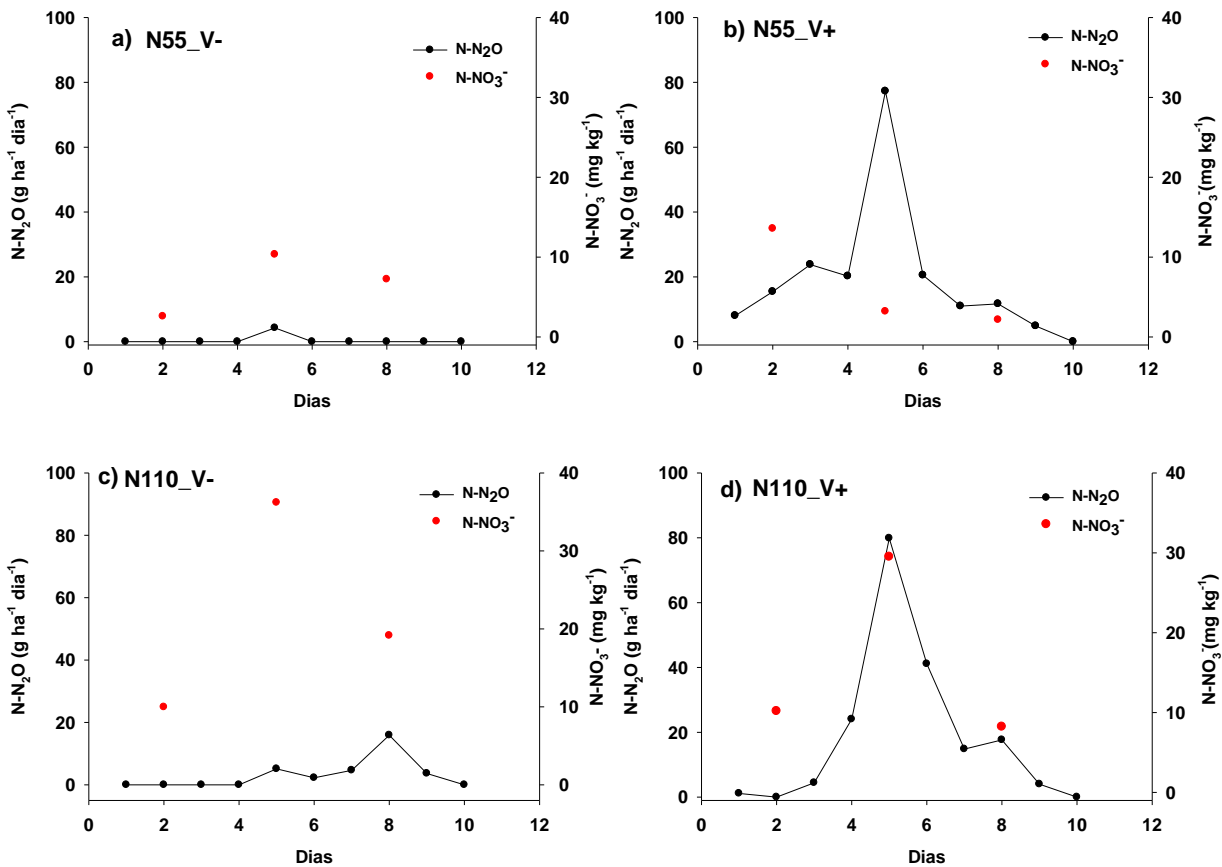


Figura 1 – Média das emissões de N-N₂O proveniente do fertilizante marcado ¹⁵NH₄¹⁵NO₃ e dos teores de N-NO₃⁻ observadas durante o período de avaliação do experimento conduzido em área de cana-de-açúcar. a) 55 kg ha⁻¹ de N, sem vinhaça (N55_V-); b) 55 kg ha⁻¹ de N, com vinhaça (N55_V+); c) 110 kg ha⁻¹ de N, sem vinhaça (N110_V-) e d) 110 kg ha⁻¹ de N, com vinhaça (N110_V+). (n = 4).