

# Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

Rosana Faria Vieira



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio Ambiente  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

---

# Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

Rosana Faria Vieira

*Embrapa  
Brasília, DF  
2017*

Essa publicação pode ser adquirida na:

**Embrapa Meio Ambiente**

Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho  
Caixa Postal 69  
CEP 13820-000 Jaguariúna, SP  
Fone: +55 (19) 3311-2700  
Fax: +55 (19) 3311-2640  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição  
Embrapa Meio Ambiente

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ana Paula Contador Packer

Secretária-Executiva: Cristina Tiemi Shoyama

Membros: Rodrigo Mendes, Ricardo A. A. Pazianotto, Maria Cristina Tordin, Nilce Chaves Gattaz, Victor Paulo Marques Simão, Marco Antônio Gomes (suplente), Joel Leandro de Queiroga (suplente), Vera Lúcia Ferracini (suplente)

Revisão de texto: Nilce Chaves Gattaz

Normalização bibliográfica: Victor Paulo Marques Simão

Tratamento das ilustrações: Paulo Eduardo Marchezini e Silvana Cristina Teixeira

Editoração eletrônica: Silvana Cristina Teixeira

**1ª edição**

Publicação digitalizada (2017)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Meio Ambiente

---

Vieira, Rosana Faria.

Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas / Rosana Faria Vieira.-- Brasília, DF : Embrapa, 2017.

163 p. : il. color.

ISBN 978-85-7035-780-9

1. Nitrogênio. 2. Ciclo do nitrogênio. 3. Agricultura. I. Título.

CDD (21.ed.) 631.46

---

© Embrapa, 2017

# AUTORA

Rosana Faria Vieira

Agrônoma, doutora em solos e nutrição de plantas, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

# PREFÁCIO

O ciclo biogeoquímico do nitrogênio apresenta um conjunto diverso de transformações que envolve a ocorrência deste elemento no solo, no ar e na água e que são, na maioria das vezes, realizadas pelos microrganismos. Muitos destes organismos são especializados na condução de processos específicos. De forma geral, as transformações do N desencadeiam uma ampla rede de reações de oxidação-redução, a partir das quais os microrganismos obtêm energia para algum tipo de atividade relativa ao seu metabolismo. Embora a maior parte das etapas envolvidas no ciclo do N tenha sido identificada há mais de um século, ainda hoje nos deparamos com novas descobertas. Os primeiros 10 anos do século XXI foram extremamente importantes no entendimento das relações funcionais dentro do ciclo deste elemento. Nesse período ocorreu a identificação de novas espécies de microrganismos envolvidas em processos já conhecidos, até a identificação de processos nunca descritos anteriormente. Nos primeiros tópicos deste livro é feita uma descrição das etapas envolvidas na dinâmica do N no solo, até então conhecidas.

O N desempenha papel chave na obtenção de altas produtividades, uma vez que ele ocupa posição de destaque na nutrição mineral de plantas. Entretanto, em decorrência das grandes perdas deste elemento para o ambiente a eficiência de utilização do N pelas culturas é baixa. As preocupações com estas perdas tornam-se cada vez maiores se considerarmos que até 2050 a produção de alimentos deve aumentar em 70% para suprir a demanda de uma população que poderá chegar a 9,1 bilhões. Esta delicada coexistência de efeitos benéficos e deletérios sugere a necessidade premente de entendimento mais profundo do ciclo do N no solo. Nos itens finais deste livro são descritas as rotas e apresentados os processos relacionados com as perdas de N após a aplicação de fertilizantes nitrogenados minerais e/ou orgânicos. São também descritas algumas medidas de mitigação com potencial para incremento da eficiência de uso do N pelas culturas.

Este livro é destinado principalmente a estudantes de Agronomia, que procuram conhecimento básico do ciclo do N no solo, mas que envolvam todos os seus principais processos. O leitor que desejar aprofundar seus conhecimentos sobre a matéria encontrará, no tópico relativo às referências, ampla lista de artigos, boletins e livros, tanto nacionais como internacionais, que lhe fornecerá fontes de informações mais especializadas e pormenorizadas.

A Autora

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	8
2. Mineralização do nitrogênio orgânico (Amonificação).....	10
2.1. Fontes de N orgânico no solo .....	12
2.1.1. Proteínas.....	12
2.1.2. Quitina .....	14
2.1.3. Parede celular.....	14
2.1.4. Ácidos nucleicos .....	15
2.1.5. Ureia .....	16
3. Nitrificação .....	18
3.1. Nitrificação por microrganismos do Domínio Bacteria .....	19
3.2. Nitrificação por microrganismos do Domínio Archaea .....	23
3.3. Fatores que afetam o processo de nitrificação pelas bactérias e arqueias oxidadoras da amônia.....	25
3.4. Nitrificação heterotrófica .....	26
4. Oxidação anaeróbia da amônia (anammox) .....	27
5. Redução assimilatória do nitrato (imobilização) .....	28
6. Desnitrificação .....	31
6.1. Desnitrificação fúngica .....	37
6.2. Desnitrificação por arqueia .....	38
6.3. Processo de desnitrificação por nitrificadores (DN) .....	38
6.4. Codesnitrificação .....	40
6.5. Quimiodesnitrificação.....	40
7. Redução dissimilatória de nitrato para amônio .....	41

---

8. Fixação biológica do nitrogênio .....	43
8.1. Fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas .....	44
8.1.1. Processo de infecção.....	45
8.1.2. Influência de fatores edafoclimáticos na nodulação e fixação simbiótica do N <sub>2</sub> em leguminosas.....	49
8.1.3. Seleção de estirpes eficientes de rizóbio .....	53
8.1.4. Coinoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP).....	56
8.1.5. Taxonomia de rizóbios .....	58
8.2. Fixação de nitrogênio em plantas actinorrízicas.....	64
8.3. Fixação biológica do N <sub>2</sub> em cianobactérias .....	66
8.3.1. Características morfológicas das cianobactérias no estado de crescimento simbiótico .....	70
8.4. Fixação biológica do N <sub>2</sub> em diazotrofos associativos .....	70
8.4.1. Características dos gêneros bacterianos diazotróficos associativos .....	75
9. Ciclo do nitrogênio e seus efeitos no ambiente.....	77
9.1. Volatilização da amônia (NH <sub>3</sub> ) .....	83
9.1.1. Fatores que afetam as emissões de amônia para a atmosfera .....	87
9.1.2. Métodos para reduzir as perdas de amônia por volatilização .....	90
9.2. Lixiviação do nitrato .....	95
9.2.1. Fatores que afetam as perdas de nitrato por lixiviação .....	98
9.3. Emissão de óxido nitroso de solos agrícolas.....	108
9.3.1. Fertilizantes nitrogenados e a emissão de óxido nitroso .....	114
9.3.1.1. Fertilizantes minerais .....	114
9.3.1.2. Fontes orgânicas de nitrogênio .....	117

---

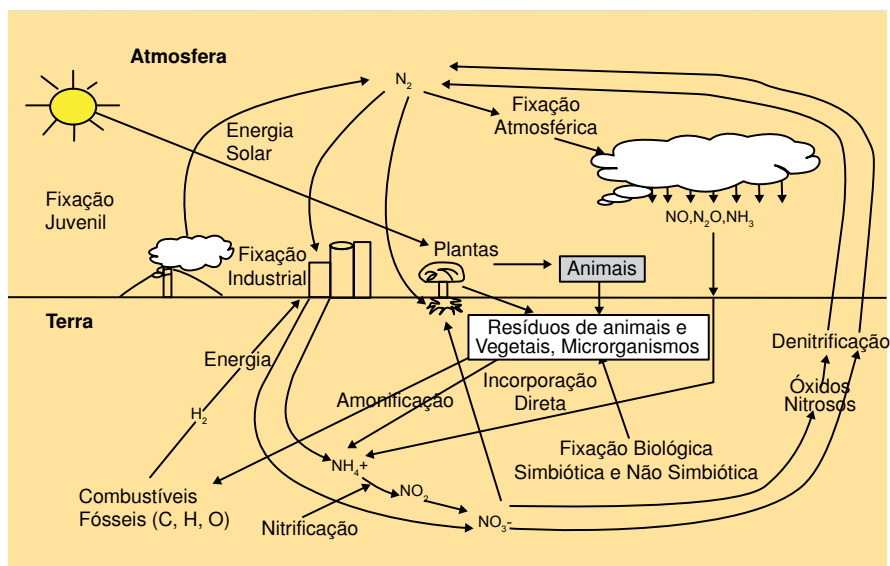
9.3.2. Fator de emissão de óxido nitroso (FE) .....	118
9.3.3. Cultivo de leguminosas e a emissão de óxido nitroso .....	120
9.3.4. Práticas de manejo de solo e a emissão de óxido nitroso .....	123
9.3.5. Práticas de manejo de solo que visam reduzir as emissões de óxido nitroso.....	126
10. Considerações finais .....	128
Referências .....	130



## 1. Introdução

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial requerido por todos os organismos vivos e, frequentemente, limita a produção primária em ecossistemas aquáticos e terrestres. Este elemento é necessário em grandes quantidades, uma vez que é componente essencial de proteínas, ácidos nucleicos e de outros constituintes celulares. As proteínas sozinhas compreendem 60 % ou mais do N das plantas e de células microbianas.

Na litosfera o N está distribuído nas rochas, no fundo dos oceanos e nos sedimentos. Este compartimento, representado pela crosta, contém 98 % do N existente no planeta. Na atmosfera, onde ele existe como gás ( $N_2$ , 78 %), seu estoque é cerca de um milhão de vezes maior que o nitrogênio total contido nos organismos vivos (Figura 1). Apesar de sua abundância na atmosfera, o nitrogênio é o nutriente mais limitante ao crescimento das plantas. Isso ocorre porque o  $N_2$  não pode ser utilizado pela maioria dos organismos, em decorrência da ligação tripla entre os átomos de nitrogênio ( $N \equiv N$ ), o que torna a molécula quase inerte. Para quebrá-la, de modo que seus átomos possam combinar com outros átomos, são necessárias quantidades substanciais de energia.



**Figura 1.** Ciclo do nitrogênio.

Fonte: Gomes et al. (2000).

Aproximadamente 95% do N presente no solo encontram-se na forma orgânica. Somente cerca da metade destes compostos já foram identificados. Além do nitrogênio orgânico existem as formas inorgânicas minerais ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), que são bem caracterizadas, uma vez que podem ser separadas e quantificadas. Embora os seus conteúdos no solo sejam bem menores do que a fração orgânica elas são de grande importância na nutrição das plantas e em vários processos relativos ao ciclo do N. Dentro das duas classes de N existentes no solo, ou seja, a orgânica e a inorgânica, algumas são solúveis e outras são relativamente insolúveis; algumas são móveis no solo e outras são imóveis; algumas são disponíveis para absorção pelas plantas, enquanto outras não o são. Este elemento está sendo continuamente transformado nestas várias formas, por meio de uma complexa rede de reações físicas, químicas e biológicas. O N possui valências estáveis que vão desde -3, como no amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) onde ele está na forma mais reduzida, a +5, como no nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) onde ele está na forma mais oxidada (Tabela 1). Este elemento é, portanto, extremamente versátil, existindo em muitos estados de oxidação.

**Tabela 1.** Estados de oxidação de compostos nitrogenados chave.

Composto	Estado de oxidação
Nitrato - $\text{NO}_3^-$	+5
Dióxido de nitrogênio - $\text{NO}_2$	+4
Nitrito - $\text{NO}_2^-$	+3
Óxido nítrico - NO	+2
Óxido nitroso - $\text{N}_2\text{O}$	+1
Dinitrogênio - $\text{N}_2$	0
Amônia - $\text{NH}_3$	-3
Amônio - $\text{NH}_4^+$	-3

O balanço da quantidade de N mineral no solo pode ser descrito conforme a equação abaixo (DI; CAMERON, 2002):

$$\text{N} = \text{Np} + \text{Nb} + \text{Nf} + \text{Nu} + \text{Nm} - \text{Npl} - \text{Ng} - \text{Ni} - \text{NI} - \text{Ne} \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $p$  é a deposição atmosférica,  $b$  é a fixação biológica do  $N_2$ ,  $f$  é o N aplicado pelo fertilizante,  $u$  é o retorno do N ao solo por meio de urina e fezes,  $m$  é a mineralização do N orgânico,  $pl$  é a absorção pela planta,  $g$  é a perda de formas gasosas de N,  $i$  é a imobilização do N pelos microrganismos,  $l$  é a perda do nitrato por lixiviação e,  $e$  é a perda por erosão e escoamento superficial. Os significados destes componentes do ciclo do N serão descritos posteriormente.

Galloway et al. (2004) classificaram os compostos nitrogenados da natureza, como N-não reativo e N-reativo (Nr). O N não reativo é o  $N_2$  e o Nr é toda forma biológica, fotoquímica e radioativamente ativa de compostos de N presentes na atmosfera e biosfera. Estes incluem formas oxidadas inorgânicas, como óxido nitroso ( $N_2O$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e compostos orgânicos como ureia, aminas, proteínas e ácidos nucleicos.

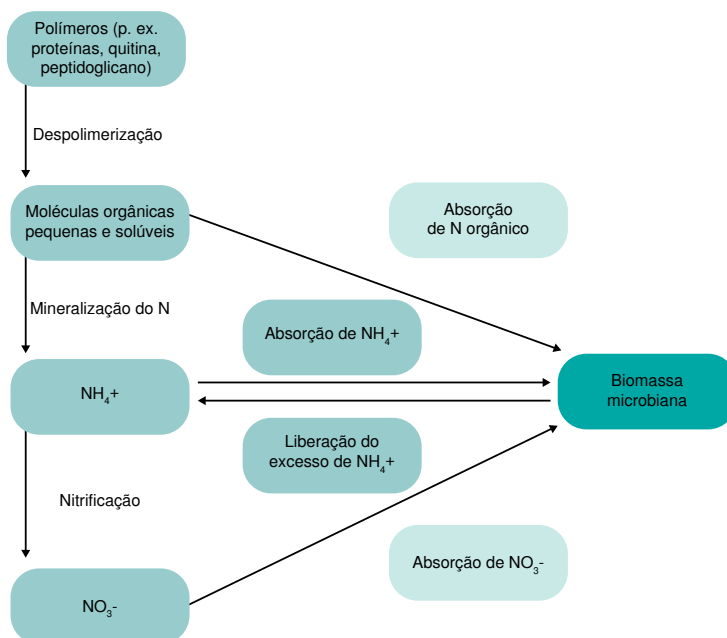
As deposições atmosféricas de formas combinadas de N [ $NH_4^+$ ,  $(NH_x)_y$ ;  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  ( $NO_y$ )] que chegam ao solo, vêm por meio de chuva ou poeira. No Brasil a deposição de  $NH_x$  é menos homogênea que as deposições de  $NO_y$  e, em termos quantitativos, são bem maiores nas regiões Sul e Sudeste em decorrência da atividade agrícola mais intensiva. Nestes locais a deposição de N pode variar de 500 a 2.000  $mg\ m^{-2}\ ano^{-1}$  (FILOSO et al., 2006). Estima-se que a fixação biológica de nitrogênio tenha uma contribuição global para os diferentes ecossistemas da ordem de 258 milhões de toneladas de N por ano, sendo que a contribuição na agricultura é estimada em 60 milhões de toneladas (FIXAÇÃO..., 2017). A fixação não biológica é responsável por, aproximadamente, 10 % da entrada de N na terra, em termos globais. A produção industrial da amônia contribui com 63 %. Outra fonte de N mineral no solo é a decomposição das frações orgânicas. Normalmente, apenas 2 % a 5 % do reservatório orgânico de N são mineralizados por ano, em virtude das frações de difícil decomposição, ditas recalitrantes.

## 2. Mineralização do nitrogênio orgânico (Amonificação)

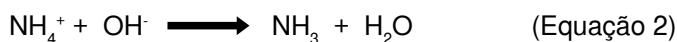
A mineralização do nitrogênio orgânico (MNO<sub>r</sub>) é um processo enzimático resultante da conversão de formas orgânicas de N para formas

inorgânicas disponíveis para as plantas. Ela é conduzida por microrganismos heterotróficos, aeróbios e anaeróbios, que utilizam os resíduos vegetais como fontes de carbono (C), N e energia.

Para ser absorvido pelos organismos o N orgânico (N<sub>or</sub>) é, primeiramente, quebrado em unidades menores pelas enzimas extracelulares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os compostos resultantes podem ser absorvidos diretamente ou serem mineralizados para a forma amoniacal [NH<sub>3</sub>, amônia (forma gasosa); NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, amônio] (Figura 2). No solo, a amônia reage rapidamente com a água para formar íons amônio. Sob condições de pH elevado a amônia predomina e pode ser perdida para a atmosfera (Equação 2).



**Figura 2.** Esquema simplificado da absorção de N pelos microrganismos do solo. Fonte: modificado de Geisseler et al. (2010).



As interações entre as enzimas extracelulares e os constituintes orgânicos e minerais do solo são complexas. Tanto as enzimas como os substratos podem ser adsorvidos às superfícies das argilas, que os estabiliza e os protege da degradação. Se a conformação ativa da enzima é alterada pela adsorção, provavelmente, ela será inativada; mas, se o sítio catalítico não for afetado, a enzima poderá permanecer ativa.

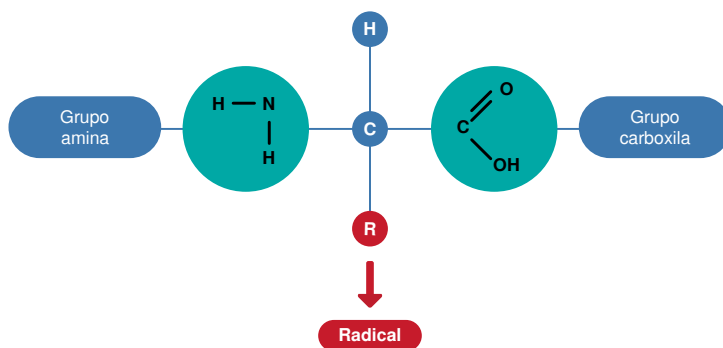
Os fatores que afetam a MNO<sub>r</sub> estão, em grande parte, associados às atividades dos microrganismos do solo, por serem eles os agentes primários responsáveis por aquele processo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A mineralização do NO<sub>r</sub> pode ser conduzida tanto sob condições de alta umidade, onde pode ser estabelecido um ambiente de anaerobiose, como em condições de baixa umidade ou de aerobiose. Nos solos saturados a mineralização é conduzida tanto por microrganismos aeróbios facultativos como por microrganismos anaeróbios. Sob condições de limitada disponibilidade de O<sub>2</sub> a decomposição é mais lenta e incompleta, o que faz com que o rendimento energético seja menor. Variações nas umidades de solo entre 50 % a 70 % da capacidade de campo têm sido consideradas as condições mais adequadas. A temperatura é outro fator que pode afetar a MNO<sub>r</sub>. De modo geral, aumento na temperatura dentro da faixa de 10°C a 40°C acelera substancialmente a mineralização do NO<sub>r</sub>. Um aumento de 2 a 3 vezes na mineralização do NO<sub>r</sub> pode ocorrer a cada 10°C de elevação da temperatura, considerando um intervalo de 10°C - 40°C (CANTARELLA, 2007). O pH do solo é também um importante fator condicionador do processo de mineralização do NO<sub>r</sub>. De modo geral, a faixa de pH em torno de 6 a 7 favorece a atividade dos microrganismos e, por sua vez, constitui-se em condição mais adequada à mineralização do NO<sub>r</sub>.

## 2.1. Fontes de N orgânico no solo

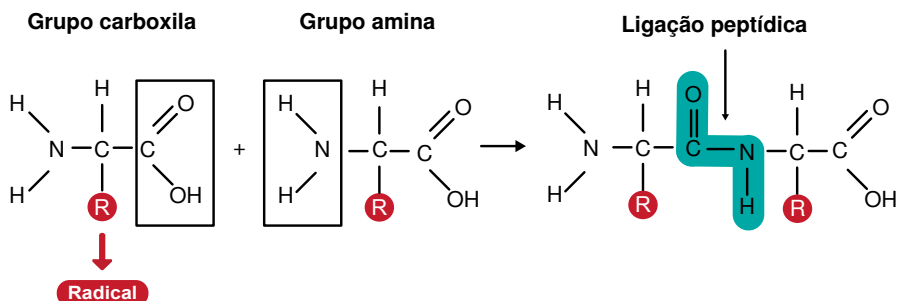
### 2.1.1. Proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Figuras 3 e 4). A união de dois aminoácidos forma uma estrutura denominada de dipeptídeo. A adição de outro aminoácido a um dipeptídeo forma o tripeptídeo. Adições subsequentes de aminoácidos produzem uma

molécula longa, em cadeia, chamada de peptídeo, quando ocorre a união de 4 a 9 aminoácidos ou de polipeptídeos quando ocorre a união de 10 a 2.000 aminoácidos.



**Figura 3.** Fórmula básica de um aminoácido.

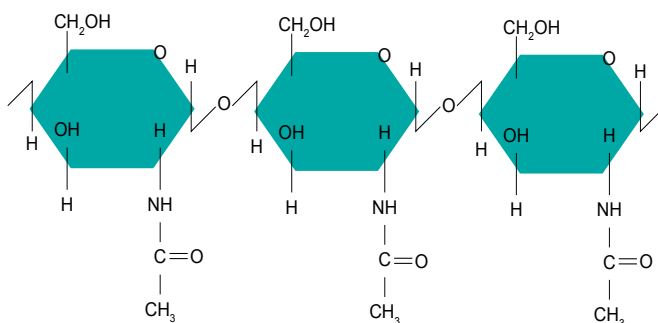


**Figura 4.** Ligação peptídica.

O processo de decomposição das proteínas é realizado em várias etapas. A primeira é denominada proteólise que envolve as ações das enzimas proteases ou proteinases (Tabela 2). Estas enzimas quebram a cadeia protéica em peptídeos menores, que subsequentemente sofrem a ação das peptidases (Tabela 2) que liberam os diversos aminoácidos. Estes aminoácidos sofrem um processo de desaminação liberando o grupo amina na forma de amônia. Exemplos de enzimas proteolíticas isoladas de microrganismos do solo incluem: subtilisina, clostripaína e termolisina.

### 2.1.2. Quitina

A quitina é um polímero não ramificado de *N*-acetil-D-glucosamina (Figura 5). A degradação deste composto é realizada pelas atividades conjuntas das enzimas quitinase e quitobiase (Tabela 2), que são produzidas por grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e arqueias (LI; GREENE, 2010). A quitinase rompe a quitina em dímeros (quitobiose) (Tabela 2), que serão, subsequentemente, clivados para duas moléculas de *N*-acetilglucosamina pela quitobiase.



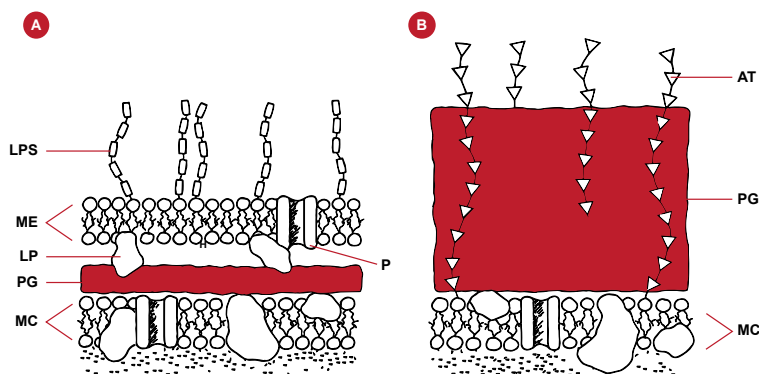
**Figura 5.** Estrutura da quitina.

As bactérias produzem as quitinases principalmente para degradar a quitina para uso como fontes de C e N. Nos fungos, por outro lado, as quitinases tem uma importante função no desenvolvimento e arquitetura da parede celular durante o crescimento ativo destes microrganismos (BHATTACHARYA et al., 2007).

### 2.1.3. Parede celular

A parede celular bacteriana é uma fonte de nitrogênio orgânico composta por uma rede de macromoléculas denominada peptidoglicano. Este polímero, como o próprio nome diz, possui uma parte proteica e uma parte polissacarídica. Esta última é composta de longos filamentos alternados de *N*-acetilmurâmico e de *N*-acetilglicosamina. A hidrólise do peptidoglicano requer a atividade de diferentes amidases, peptidases e glicosidases (Tabela

2). Entre as glicosidases a lizosima é a mais estudada e rompe a ligação  $\beta$  - 1,4 entre os ácidos N-acetilmurâmico e o N-acetilglicosamina. As espessuras das paredes celulares variam entre as bactérias e, associados a outros aspectos, as classificam em bactérias Gram-positivas e em bactérias Gram-negativas (Figura 6).



**Figura 6.** Camada de peptidoglicano em bactérias Gram-negativas (A) e Gram-positivas (B). LPS, lipopolissacarídeo; ME, membrana externa; LP, lipoproteína; PG, peptidoglicano; MC, membrana citoplasmática; AT, ácido teitóico; P, porinas .  
Fonte: Adaptado de Alexander (1998).

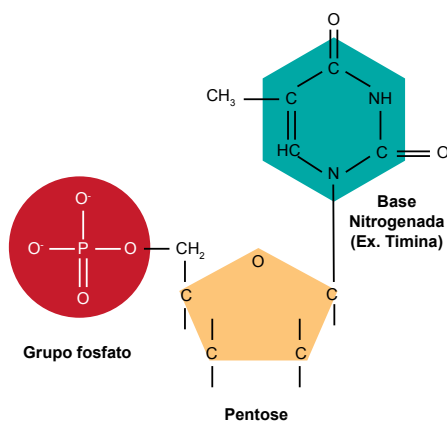
De acordo com a composição da parede celular, as bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas. Esta classificação foi feita por Hans Christian Gram, um bacteriologista dinamarquês, em 1884. O método consiste na adição de corantes específicos em um esfregado de bactéria. As bactérias Gram-positivas (+) tornam-se violetas e as Gram-negativas (-) avermelhadas. Tal método consiste em uma importante etapa da identificação das bactérias. Gram morreu em 1935 sem ter conseguido que fosse reconhecida a importância do seu método de coloração.

### 2.1.4. Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos (RNA, ácido ribonucleico e DNA, ácido desoxirribonucleico) são fontes de N orgânico constituídos por um grupo fosfato, uma base nitrogenada e açúcares pentose (Figura 7). Os ácidos nucleicos são degradados por meio de enzimas denominadas, genericamente, de nucleases (ribonucleases e desoxirribonucleases), que hidrolisam as ligações ésteres entre os grupos fosfatos e os



açúcares pentoses (Tabela 2). As RNases e as DNases dividem-se em exonucleases, que rompem nucleotídeos isolados no final do polímero do ácido nucleico, e, endonucleases, que o clivam, internamente. Nucleotídeos individuais são os produtos finais da ação das nucleases. As nucleotidasas convertem os mononucleotídeos para nucleosídeos e  $\text{PO}_4^{3-}$  inorgânico. As enzimas nucleosidasas hidrolizam os nucleosídeos para as bases purinas - adenina (A) e guanina (G) - e para as bases pirimidinas - timina (T), citosina (C) e uracila (U) -, liberando a componente pentose. Estes são, subsequentemente, convertidos para  $\text{NH}_3$  pelas reações catalisadas pelas enzimas amidohidrolases e amidinohidrolases.

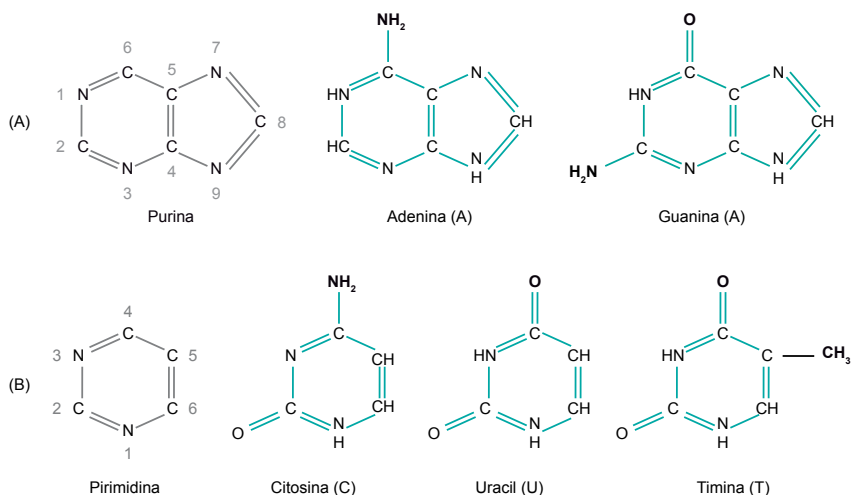


**Figura 7.** Estrutura básica de um nucleotídeo e sua composição: uma base nitrogenada, uma pentose (açúcar) e um grupo fosfato.

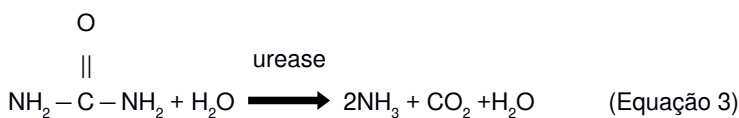
### 2.1.5. Ureia

A ureia é outra fonte de N orgânico liberada continuamente no ambiente por meio de processos biológicos tal como a excreção de urina de mamíferos. Em ruminantes a ureia representa cerca de 50 a 75 % do N total excretado. Este composto também surge no solo como produto da degradação do aminoácido arginina e do ácido úrico, que é excretado por pássaros, répteis e a maioria dos insetos terrestres, como produto primário da detoxificação. As purinas e pirimidinas que fazem parte dos ácidos nucleicos também são

fontes de ureia no solo (Figura 8). A ureia pode ser também adicionada ao solo por meio de fertilizante, onde ela é hidrolisada para amônia e  $\text{CO}_2$  pela enzima urease (Tabela 2), conforme a equação 3. Esta enzima pode ser originária de microrganismos e de plantas, sendo, por isto, de ampla distribuição nos solos.



**Figura 8.** Estrutura das bases púricas (A) e das bases pirimídicas (B).



### Enzima urease:

- É produzida pelas bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e plantas.
- Pode ser sintetizada constitutivamente por alguns organismos.
- A síntese da urease é reprimida quando as células estão crescendo na presença de fontes de N, como o  $\text{NH}_4^+$  ou outras fontes alternativas de N.

**Tabela 2.** Resumo das enzimas envolvidas na degradação do N orgânico.

Substrato	Enzima	Produto
Proteína	Proteinases, Proteases	Peptídeos, aminoácidos
Peptídeos	Peptidases	Aminoácidos
Quitina	Quitinase	Quitobiase
Quitobiase	Quitobiase	N-acetilglucosamina
Peptidoglicano	Amidases Peptidases, Glicosidases	Aminoacúcares
DNA e RNA	Desoxirribonuclease Ribonucleases	Nucleotídeos
Nucleotídeos	Nucleotidases	Nucleosídeo e $PO_4^{3-}$ inorgânico
Nucleosídeo	Nucleosidase	Bases purinas Bases pirimidinas Componente pentose
Bases purinas e pirimidinas	Amidohidrolase Amidinohidrolase	$NH_3$ (amônia)
Ureia	Urease	$CO_2$ e $NH_3$

### 3. Nitrificação

A nitrificação é um processo de oxidação do amônio (amônia, em termos de substrato) para nitrito e, subseqüentemente, para nitrato ( $NO_3^-$ ) realizado por microrganismos quimioautotróficos, que obtêm o C do  $CO_2$  e a energia da oxidação química para a síntese de seus constituintes celulares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O  $NH_4^+$  é utilizado como doador de elétrons e o  $O_2$  como acceptor de elétrons.

Por muitos anos as bactérias oxidadoras da amônia (BOA) foram consideradas os únicos organismos capazes de conduzir o processo de nitrificação. Entretanto, a identificação do gene chave responsável pela oxidação da amônia (monoxigenase da amônia, *amoA*) em Crenarchaeota e o isolamento do *Nitrosopumilus maritimus* (KÖNNEKE et al., 2005), hoje colocada no filo Thaumarchaeota (BROCHIER-ARMANET et al., 2008), demonstraram que as arqueias também são capazes de conduzir o primeiro passo da nitrificação (AOA).

### Histórico da descoberta do processo da nitrificação:

- Houzeau (1872) descreveu o primeiro passo da nitrificação.
- Entre 1873-1877, este processo foi atribuído à ação de microrganismos fermentativos.
- Warington (1878) mostrou que a nitrificação é um processo que ocorre em dois passos.
- Winogradsky (1890) confirma o papel de bactéria no processo de nitrificação, após o isolamento do primeiro organismo oxidador da amônia. O modo de vida foi descrito como quimioautotrófico.
- Winogradsky (1890) isola a bactéria nitrificadora, *Nitrosomonas europaea*.
- De 1890 a 2004, os cientistas acreditavam que somente bactérias mediavam o primeiro passo da nitrificação.
- Em 2004-2005, o conhecimento sobre os microrganismos responsáveis pela condução do processo de nitrificação muda radicalmente com a descoberta de que outros microrganismos, como as arqueias, também estariam envolvidos na oxidação da amônia.

O nitrato oriundo da nitrificação é, em geral, a forma predominante de N em solos cultivados, bem aerados, exceto por um curto período de tempo, após a adição de fertilizantes amoniacais. Apesar disso, o amônio, em adição ao glutamato e glutamina, que servem como doadores-chaves de N para as reações biossintéticas em todas as células, são considerados como fontes preferenciais de N para muitos microrganismos (WONG et al., 2008). A absorção de nitrato requer a sua redução no interior da célula, o que envolve gastos de energia.

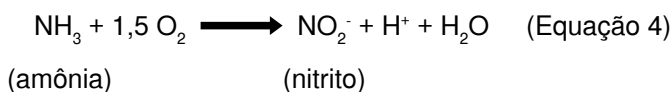
### 3.1. Nitrificação por microrganismos do Domínio Bacteria

As bactérias que realizam a nitrificação são restritas às  $\beta$  e  $\gamma$ -Proteobacteria e dividem-se em dois grupos: bactérias oxidadoras da amônia (BOA) e bactérias oxidadoras do nitrito (BON). As *Nitrosomonas* (nitrificadores primários) convertem a amônia para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e as *Nitrobacter* (nitrificadores secundários) convertem o  $\text{NO}_2^-$  para  $\text{NO}_3^-$ . A espécie *Nitrosomonas europaea* é a bactéria mais estudada em relação à oxidação da amônia. Entretanto, ela não é a bactéria nitrificadora primária mais comum nos solos.

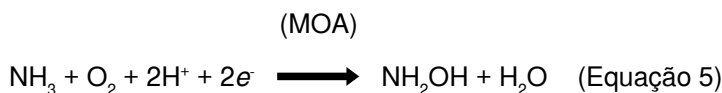
As duas etapas da nitrificação são denominadas nitritação e nitratação:

- Nitritação - é a oxidação da amônia para nitrito.
- Nitratação - é a oxidação do nitrito para nitrato.

A reação de conversão da amônia para  $\text{NO}_2^-$  é descrita abaixo:



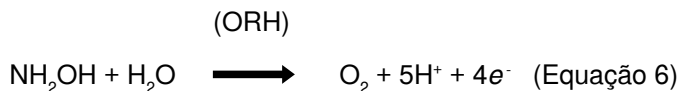
Essa reação de oxidação envolve a transferência de  $6e^-$  (elétrons), rende  $66 \text{ kcal mol}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  e envolve dois passos. O primeiro passo é a conversão da  $\text{NH}_3$  para hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) pela enzima monooxigenase da amônia (MOA). Nessa reação, dois elétrons são necessários para a redução de um dos átomos de  $\text{O}_2$  para água (Equação 5).



A reação acima é endergônica e requer uma quantidade pequena de energia. Ela não está acoplada à síntese de ATP.

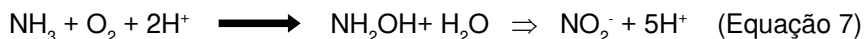
Em 2015, Daims et al. (2015) e van Kessel et al. (2015) encontraram um novo grupo de sequência da enzima monooxigenase da amônia, que codifica o primeiro passo da nitrificação.

A hidroxilamina é convertida, por meio de vários passos não definidos, para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela enzima oxidoredutase da hidroxilamina (ORH) (Equação 6). Ao contrário da monooxigenase da amônia, que é uma proteína integral de membrana, a oxidoredutase da hidroxilamina é periplasmática.



A energia produzida na reação 6 é utilizada para fixar o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Dois dos elétrons produzidos passam através da cadeia de transporte

de elétrons para o oxigênio, enquanto os outros dois são usados na reação da monooxigenase da amônia. A equação geral pode ser assim descrita (Equação 7).



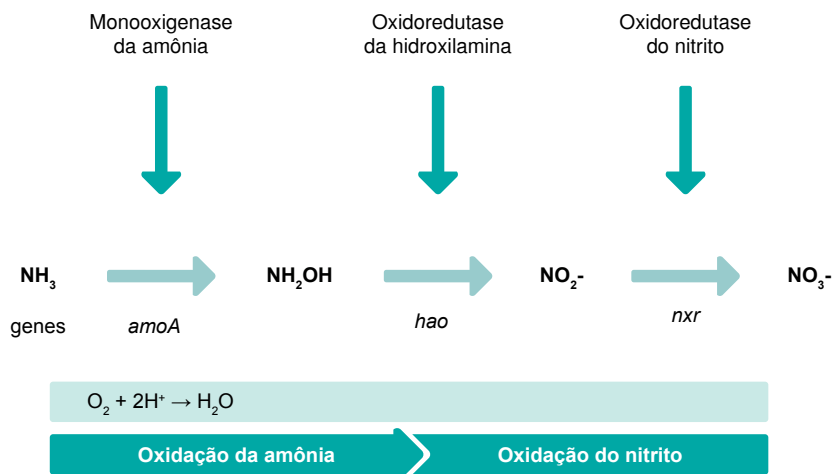
Os estudos sobre a ecologia das comunidades de bactérias oxidadoras da amônia baseavam-se nas extrapolações de dados obtidos a partir de estudos feitos em meio de cultura com a bactéria *Nitrosomonas europaea*, cujo genoma foi inteiramente sequenciado. Os recentes avanços nas técnicas moleculares, para análise direta de toda a comunidade microbiana do solo, têm revelado que as bactérias do gênero *Nitrospira* spp., mais que as *Nitrosomonas* spp., são as BOA dominantes na maioria dos solos. As *Nitrosomonas* spp. prevaleceriam, principalmente, em situações onde os solos tivessem recebido altas quantidades de N, ao contrário das *Nitrospira* spp., que requerem baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  na solução do solo (TAYLOR; BOTTOMLEY, 2006). A estrutura da comunidade das BOA é, portanto, afetada pelas condições edáficas, que incluem, além do teor de nitrogênio, outros fatores que serão discutidos adiante.

Após a oxidação da amônia, o nitrito formado na equação 7 é oxidado a nitrato. Nesta reação o oxigênio necessário à formação do nitrato é obtido da molécula de água e serve como acceptor de elétrons.



Esse processo de oxidação é conduzido pela oxidoreductase do nitrito, que é uma enzima ligada à membrana. Esta reação ocorre em um único passo e rende baixas quantidades de energia, ou seja, 18 kcal mol<sup>-1</sup> de nitrito. Assim, aproximadamente 100 moles de nitrito são oxidados para fixar de 1 mol de CO<sub>2</sub>, enquanto que, na primeira etapa da nitrificação, a oxidação de 35 moles de amônia alcançam o mesmo fim. Este baixo ganho energético da oxidação do nitrito para nitrato demonstra que as bactérias envolvidas no segundo passo da nitrificação necessitam processar quantidades maiores de substrato.

Em consequência disso, a oxidação do  $\text{NO}_2^-$  ocorre com maior velocidade do que a oxidação do amônio, fazendo com que o nitrito raramente se acumule no solo. Tal fato é de extrema importância para as *Nitrosomonas* spp. cuja atividade é inibida pela acumulação daquele ânion. A Figura 9 apresenta um esquema resumido do processo da nitrificação.



**Figura 9.** Esquema resumido do processo de nitrificação e os genes que codificam para as enzimas envolvidas. *amoA*, monooxigenase da amônia; *hao*, oxidoredutase da hidroxilamina; *nxr*, oxidoredutase do nitrito.

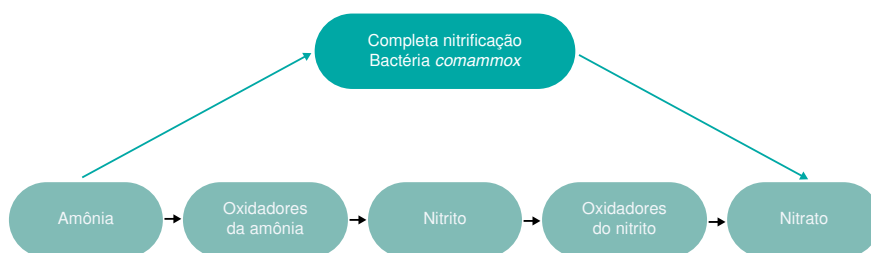
A condução do processo de nitrificação sempre foi considerada como a ação sequencial de grupos distintos de microrganismos (Tabela 3). Entretanto, Costa et al. (2006) postularam a provável existência de bactéria que poderia oxidar amônia para nitrito e, posteriormente, para nitrato, sob determinadas condições. Passados nove anos, Kessel et al. (2015) e Daims et al. (2015) demonstraram que o gênero *Nitrospira* pode governar todo o processo de nitrificação. Kessel et al. (2015) relataram que os genomas de duas espécies deste gênero foram capazes de codificar todas as enzimas necessárias para a oxidação da amônia via nitrito para nitrato. A identificação e cultivo destes organismos por Daims et al. (2015) e Kessel et al. (2015) abre mais uma porta para a descoberta de novas vias do ciclo do nitrogênio. A condução dos dois passos seria altamente favorável para o microrganismo em termos energéticos.

O termo *comammox* (*complete ammonia oxidizer*, oxidador completo da amônia) foi utilizado para descrever o processo (Figura 10).

**Tabela 3.** Exemplos de bactérias nitrificadoras.

Espécies
<i>Nitrosomonas communis</i>
<i>Nitrosomonas europaea</i>
<i>Nitrosomonas eutropha</i>
<i>Nitrosomonas mobilis</i>
<i>Nitrosolobus multiformis</i>
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
<i>Nitrobacter vulgaris</i>
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>
<i>Nitrospira briensis</i>
<i>Nitrobacter alkalicus</i>

Fonte: Koops et al. (2001) e Poly et al. (2008).



**Figura 10.** Ciclo do nitrogênio revisado.

### 3.2. Nitrificação por microrganismos do Domínio Archaea

Leininger et al. (2006) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem que, entre os procaríotos oxidadores do amônio, os microrganismos do Domínio Archaea poderiam predominar nos solos. O trabalho destes autores foi conduzido em 12 solos agrícolas oriundos de regiões climáticas diferentes. Cópias do gene *amoA* das arqueias foram 3.000 vezes mais abundantes nas áreas estudadas, do que cópias do mesmo gene em



bactérias. Apesar disso, dúvidas em relação ao potencial de atividade das arqueias, no processo de nitrificação, ainda prevalecem, uma vez que a maior abundância do gene *amoA* não implica, necessariamente, na sua expressão (Tabela 4). Segundo Wessén e Hallin (2011) as BOA têm maior diversidade ecofisiológica do que as AOA e, portanto, apresentam potencial para cobrir uma maior gama de habitats. Jia e Conrad (2009) verificaram maior atividade de oxidação da amônia pelas bactérias, embora as arqueias fossem mais abundantes no solo. Por outro lado, He et al. (2007) obtiveram correlações positivas e significativas entre as taxas potenciais de nitrificação e o tamanho das populações, tanto de arqueias, como de bactérias oxidadoras da amônia (BOA). Estudos de análises genômicas comparativas indicam que as BOA e as AOA podem diferir de forma marcante em relação às suas vias metabólicas e fisiológicas (WALKER et al., 2010).

**Tabela 4.** Resultados da avaliação do processo de oxidação da amônia no solo, obtidos por diferentes autores.

Resultados	Citação
As AOA são mais abundantes que as BOA em solos de diferentes origens.	Leininger et al. (2006)
As abundâncias de AOA e de BOA foram correlacionadas com as atividades potenciais de oxidação da amônia.	He et al. (2007)
Tanto as AOA como as BOA são ativas na oxidação da amônia, em solos agrícolas.	Jia e Conrad (2009)
A abundância das BOA ou das AOA não está ligada à efetiva atividade no processo de nitrificação. Embora as AOA fossem mais abundantes, as BOA foram mais ativas na oxidação da amônia, em solo agrícola.	Jia e Conrad (2009)
A abundância das AOA foi positivamente relacionada com a adição de carbono orgânico ao solo.	Wessén et al. (2010)
Comunidades de microrganismos oxidadores da amônia têm sido associadas ao estágio de crescimento de plantas, como observado em milho e feijão guandu	Zhang et al. (2015a)
A rizosfera parece ter uma maior influência na nitrificação do que práticas de fertilidade.	Rudisill et al. (2016)

BOA: bactérias oxidadoras da amônia

AOA: arqueias oxidadoras da amônia

### **3.3. Fatores que afetam o processo de nitrificação pelas bactérias e arqueias oxidadoras da amônia**

#### ***Fertilizantes nitrogenados***

O efeito do uso de fertilizantes nitrogenados na abundância ou atividade de arqueias oxidadoras da amônia e de BOA ainda é contraditório. Existem relatos que a população de BOA aumentou de  $4 \times 10^6$  células  $g^{-1}$  de solo para  $35$  e  $66 \times 10^6$  células  $g^{-1}$  de solo, em decorrência da aplicação de  $1,5$  ou  $7,5$  mM de sulfato de amônio, respectivamente (OKANO et al., 2004). Ao contrário desses resultados, outros autores não observaram diferenças significativas no tamanho da comunidade de BOA, em solos fertilizados ou não, com nitrogênio (HALLIN et al., 2009). Akiyama et al. (2013) demonstraram que, embora as arqueias contribuam para a oxidação da amônia, a resposta das bactérias é maior após a aplicação de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, segundo Gannes et al. (2014), dados de campo que estabeleçam correlações entre os níveis naturais de amônio ou outra forma de N no solo, com as AOA, ainda são escassos.

#### ***pH***

Do mesmo modo, ainda não existe um consenso quanto ao efeito do pH na atividade das bactérias e das arqueias na oxidação da amônia. Alguns autores demonstraram maior atividade das arqueias em solos ácidos e das BOA em solos calcáreos (HUANG et al., 2012), mas respostas contrárias a estas também têm sido obtidas (YING et al., 2010).

#### ***Umidade do solo***

O teor de umidade dos solos é outro fator a ser considerado em relação à abundância dos microrganismos envolvidos na nitrificação. As arqueias parecem ser mais tolerantes ao estresse de água que as bactérias (GLEESON et al., 2010) e isso pode estar relacionado à disponibilidade de  $O_2$ . A enzima MOA das arqueias tem maior afinidade pelo oxigênio do que as bactérias, indicando uma melhor adaptação destes microrganismos em

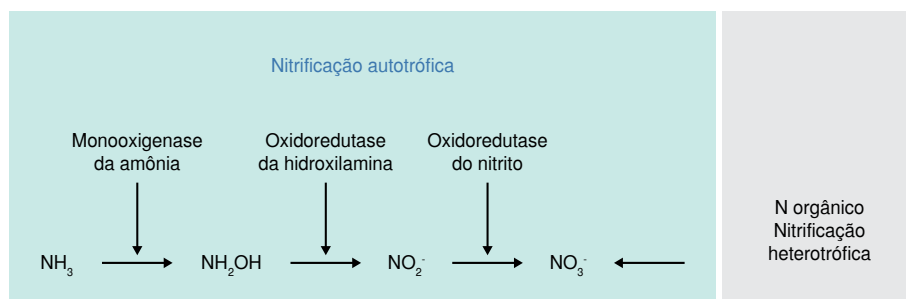
ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio (MARTENS-HABBENA; STAHL, 2011).

### **Metais pesados**

A nitrificação é um dos processos do ciclo do N mais sensível aos metais pesados. Estes elementos afetam de forma diferenciada as BOA e as AOA. Mertens et al. (2009) relataram que as BOA podem se adaptar melhor em área contaminada com Zn, do que as AOA. Por outro lado, segundo Li et al. (2009) as AOA são mais tolerantes ao Cu do que as BOA.

### **3.4. Nitrificação heterotrófica**

A nitrificação heterotrófica é definida como a oxidação do N orgânico para nitrato, embora alguns estudos sugerem que os nitrificadores heterotróficos podem também utilizar substratos inorgânicos (ZHANG et al., 2014) (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema demonstrando o processo de nitrificação heterotrófica.

Na nitrificação heterotrófica, o processo de oxidação da amônia não está ligado à produção de energia, como ocorre na nitrificação autotrófica. Do mesmo modo, as enzimas que regulam a nitrificação por microrganismos heterotróficos (Tabela 5) são diferentes daquelas da nitrificação autotrófica.

**Tabela 5.** Exemplos de microrganismos nitrificadores heterotróficos.

Bactérias	Fungos
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Aspergillus wentii</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Penicillium sp</i>
<i>Bacillus badius</i>	.
<i>Burkholderia capacia</i>	

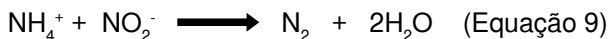
Fonte: Hayatsu et al. (2008).

A nitrificação conduzida por fungos, um microrganismo heterotrófico, foi primeiramente descrita no ano de 1894 (STUTZER; HARTLEB, 1894) e, desde então, muitos trabalhos demonstraram que a produção de  $\text{NO}_3^-$  é um fenômeno disseminado entre aqueles microrganismos. A nitrificação heterotrófica seria predominante em ambientes que não fornecem condições adequadas para as bactérias nitrificadoras autotróficas (ISLAM et al., 2007). Os fungos podem ser os principais responsáveis pela nitrificação em solos ácidos, em solos salinos e em solos com pH neutro (YOKOYAMA et al., 2012). Segundo Laughlin et al. (2008), a nitrificação heterotrófica é também um processo de grande importância em solos de pastagem.

Na Europa ocidental foi observado que, além dos fungos, bactérias heterotróficas foram também capazes de conduzir o processo de nitrificação em solos ácidos de florestas de coníferas. Nestas condições, a bactéria *Arthrobacter* sp. pareceu ser a mais adaptada à condução daquele processo (BRIERLEY; WOOD, 2001).

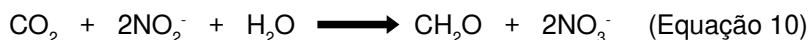
#### 4. Oxidação anaeróbia da amônia (*anammox*)

A *anammox* é um processo de oxidação da amônia sob condições anaeróbias. Desde a identificação deste processo por Strous et al. (1997), várias bactérias capazes de utilizar esta via já foram caracterizadas. A *anammox* envolve a oxidação do amônio, utilizando o nitrito como acceptor de elétrons, para produzir nitrogênio gasoso conforme a equação 9:



Esse processo pode dominar a produção de  $\text{N}_2$  em ambientes aquáticos (STEVENS; ULLOA, 2008), sedimentos marinhos (RICH et al., 2008) e mares congelados (RYSGAARD et al., 2008). Neste processo, não ocorre a produção do óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) devido à combinação do amônio com o nitrito. Os organismos que realizam a *anammox* apresentam em suas células um compartimento denominado anamoxossoma, que é o local onde a oxidação da amônia ocorre. Juntas a desnitrificação e a *anammox* são responsáveis pelo retorno do  $\text{N}_2$  para a atmosfera.

Do mesmo modo que as bactérias nitrificadoras clássicas, as bactérias que realizam a oxidação anóxica da amônia também são organismos autotróficos. Portanto, eles são capazes de crescer tendo o  $\text{CO}_2$  como única fonte de carbono para a produção de seus compostos celulares (Equação 10).



Embora a atividade da *anammox* em ambientes terrestres fosse até recentemente pouco conhecida, o trabalho conduzido por Shen et al. (2013a) revelou a presença de bactérias responsáveis por este processo em 32 solos coletados em diferentes localizações na China. Quatro gêneros de bactérias capazes de realizar este processo foram identificados por meio da análise filogenética dos genes 16S rRNA, sendo a *Candidatus Brocardia* a mais dominante. Em outro estudo foi demonstrado que, além do *Candidatus Brocardia*, a *Candidatus Kuenenia* também predomina em determinados tipos de solo (BAI et al., 2015).

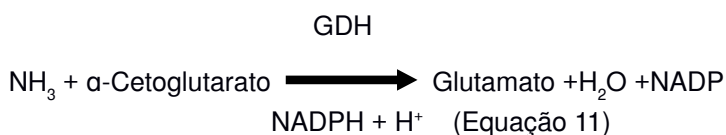
## 5. Redução assimilatória do nitrato (Imobilização)

A imobilização do nitrogênio é definida como a transformação do N inorgânico ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) em N orgânico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O N é absorvido pelas plantas e microrganismos tanto na forma reduzida ( $\text{NH}_4^+$ ) como na forma oxidada ( $\text{NO}_3^-$ ). Neste último caso, o nitrato tem que

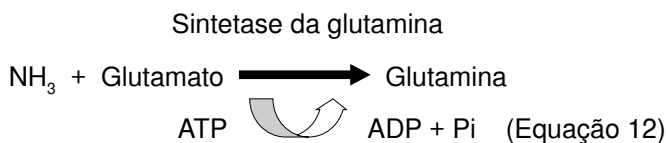
ser, primeiramente, reduzido dentro da célula para se ligar aos esqueletos de carbono, que serão posteriormente polimerizados para formarem moléculas complexas. Esta redução é um processo que requer energia, o que faz com que o  $\text{NH}_4^+$  seja preferencialmente absorvido pelos microrganismos.

Os microrganismos assimilam o amônio (amônia como substrato) por duas vias: desidrogenase do glutamato (GDH) e sintetase da glutamina-sintase do glutamato (GS/GOGAT) (Equações 11, 12 e 13). A primeira via torna-se ativa quando o  $\text{NH}_4^+$  está presente em concentrações relativamente altas ( $> 0,5 \text{ mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$  de solo). Neste caso a desidrogenase do glutamato, na presença de equivalentes redutores, incorpora aquele íon ao  $\alpha$ -cetogluturato para formar glutamato. Porém, na maioria dos solos o amônio está presente em baixas concentrações, resultando em decréscimo da sua concentração intracelular. Neste caso, os microrganismos utilizam a segunda via, onde o amônio, primeiramente, se junta ao glutamato para formar glutamina. Posteriormente, o  $\text{NH}_4^+$  é transferido da glutamina para o  $\alpha$ -cetogluturato, que resulta na formação de duas moléculas de glutamato. Uma vez incorporado ao glutamato, o amônio pode ser transferido para outras moléculas para formar aminoácidos adicionais.

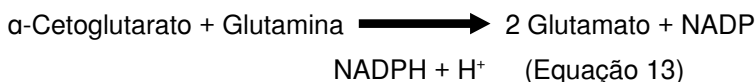
Primeira via:



Segunda via:



Sintase do glutamato



A predominância do processo de imobilização (Figura 12) sobre o processo de mineralização, ou vice-versa, depende da relação C/N dos constituintes orgânicos do solo. De forma geral, resíduos com razões C/N maiores que 30 promovem a imobilização líquida do N, uma vez que os requerimentos desse nutriente pelos microrganismos tornam-se maiores que o fornecido pelos processos de decomposição da matéria orgânica. À medida que estes compostos são metabolizados a relação C/N diminui e, por conseguinte, a imobilização do N. Razões C/N abaixo de 20, frequentemente, levam a um aumento nos níveis de N mineral no solo. Tais valores servem como regra quando o C e o N estão em compostos com taxas similares de degradação. Alguns compostos contêm grandes quantidades de C e de N em formas que se degradam lentamente (mesmo com razões C/N menores de 20) e, neste caso, o N orgânico não pode servir como fonte prontamente disponível daquele elemento.



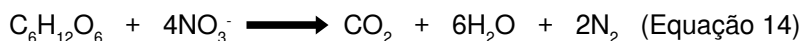
Foto: Morel Pereira Barbosa Filho

**Figura 12.** Deficiência de nitrogênio causada pela imobilização de nitrogênio pelos microrganismos, em plantas de feijão, na fase inicial de crescimento, em área após cultivo de milho.

Fonte: Barbosa Filho et al. (2005). Reproduzida com autorização.

## 6. Desnitrificação

A desnitrificação é um processo classicamente definido como a redução microbiológica de nitrato para óxido nitroso ( $N_2O$ ) ou N molecular ( $N_2$ ). Atualmente, essa definição é considerada insatisfatória, uma vez que está bem estabelecido que os óxidos gasosos de N são também produzidos durante a nitrificação e durante a redução microbiana do nitrato para amônio. Em decorrência disso, a maioria dos microbiologistas define a desnitrificação como uma redução respiratória do nitrato ou nitrito para as formas gasosas de NO,  $N_2O$  ou  $N_2$ , acoplada à fosforilação durante o transporte de elétrons. Isto significa que na ausência de oxigênio para a respiração aeróbia normal, os microrganismos utilizam o nitrato como acceptor terminal de elétrons, o que é denominado de respiração anaeróbia e pode ser assim visualizada (Equação 14).



Pela equação acima verifica-se que para conduzir o processo de desnitrificação, os microrganismos também necessitam de matéria orgânica oxidável, que atuará como fonte de C e de elétrons.

1950 – Primeiro estudo da dinâmica da produção de  $N_2O$  no solo.

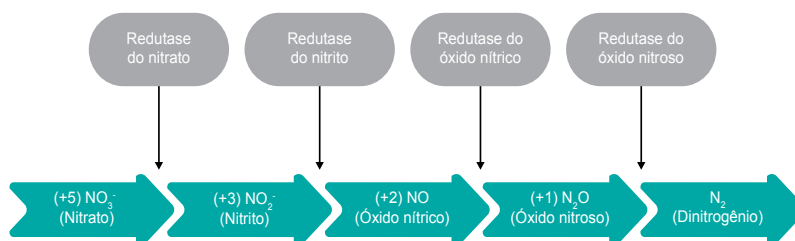
1956 – Estabelecida a relação entre a quantidade de  $NO_3^-$  no solo e a emissão de  $N_2O$ .

A primeira indicação de que os microrganismos nitrificadores poderiam também produzir  $N_2O$  foi relatada por Corbert (1935). Posteriormente, outras evidências foram surgindo.

- Falcone et al. (1962) foram os primeiros a publicar evidências de que a *Nitrosomonas europaea* tem a capacidade enzimática para produzir  $N_2O$ .
- Hooper (1968) e Ritchie e Nicholas (1972) forneceram também evidências de que a redução enzimática do nitrito pela *Nitrosomonas europaea* resulta na produção do  $N_2O$ .
- Yoshida e Alexander (1970) foram os primeiros a demonstrar que células de *Nitrosomonas europaea*, envolvida no primeiro passo da nitrificação, produzem  $N_2O$  durante a oxidação do amônio ou da hidroxilamina a nitrito.
- Ritchie e Nicholas (1972) demonstraram em seus estudos clássicos com células de *Nitrosomonas europaea* e extratos livres de células acrescentados de  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  e  $NH_2OH$  marcados com  $^{15}N$ , que este microrganismo produz  $N_2O$  por meio da redução do  $NO_2^-$ , com  $NH_2OH$  como doador de elétrons. Isso foi demonstrado tanto em condições aeróbias como anaeróbias.
- Poth e Focht (1985) confirmaram por meio da técnica de marcação com  $^{15}N$  que a produção de  $N_2O$  pelas bactérias oxidadoras autotróficas de  $NH_4^+$  resulta de um processo redutivo no qual os organismos usam  $NO_2^-$  como acceptor de elétrons, especialmente quando o  $O_2$  é limitante.



O primeiro passo da desnitrificação consiste na redução do nitrato para nitrito e é catalisado pela enzima redutase do nitrato, cuja síntese e atividade são inibidas pelo oxigênio. A redutase do nitrito catalisa a conversão de nitrito para óxido nítrico. Esta enzima é encontrada no periplasma e existe em duas formas, uma contendo Cu e outra na forma heme. A redutase do óxido nítrico, uma proteína ligada à membrana, catalisa a conversão do óxido nítrico (NO) para óxido nitroso ( $N_2O$ ) e também tem a sua síntese inibida pelo oxigênio e induzida por várias formas de óxidos de nitrogênio. A redutase do óxido nitroso, uma proteína encontrada no periplasma, contém Cu e converte óxido nitroso para  $N_2$ . A atividade desta enzima é inibida a baixo pH e é mais sensível ao oxigênio que as outras três enzimas. A desnitrificação é, portanto, um importante processo biológico pela qual o N reativo pode retornar à atmosfera na forma de  $N_2$ . A rota do processo de desnitrificação é usualmente representada como descrito na Figura 13.



**Figura 13.** Resumo do processo de desnitrificação.

Apesar do processo da desnitrificação ser tradicionalmente conhecido como fonte de  $N_2O$ , outros processos estão também envolvidos na emissão deste gás, ou seja: nitrificação e desnitrificação por nitrificadores. Tais processos podem ocorrer simultaneamente nos solos e suas contribuições relativas para a emissão total desse gás diferem sob diferentes condições ambientais.

As bactérias desnitrificadoras compreendem cerca de 0,1 a 5 % da população de microrganismos total dos solos. Mais de 60 gêneros já foram identificados. Embora tradicionalmente os microrganismos desnitrificadores sejam heterotróficos e pertençam à Proteobacteria, microrganismos

autotróficos, fitotróficos, litotróficos e organotróficos, desnitrificam sob certas condições. Entre estes microrganismos podem ser citados as bactérias *Thiobacillus denitrificans*, *Alcaligenes eutropha*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* e *Rhodobacter azotoformans*.

A despeito da diversidade de bactérias desnitrificadoras presentes no solo, elas são dominadas por membros do gênero *Pseudomonas*. Espécies dos gêneros *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Bacillus* são também comuns. Além destes gêneros, bactérias normalmente associadas à fixação biológica do  $N_2$  (p. ex. *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*) desnitrificam sob certas condições (OKADA et al., 2005). Algumas arqueias e eucariotos (KRAFT et al., 2011) são também capazes de conduzir a desnitrificação. Segundo Wallenstein et al. (2006), a composição e a densidade dos microrganismos desnitrificadores podem afetar a atividade do processo de desnitrificação, embora nem sempre essa relação seja encontrada (MILLER et al., 2008).

Vários são os fatores edafoclimáticos que podem afetar o processo de desnitrificação (Tabela 6).

### **Umidade e textura do solo**

As propriedades físicas como macro e microporosidade, aeração e densidade influenciam as taxas de emissão de  $N_2O$ . Na umidade de 60% da capacidade de campo, ocorre maior produção de  $N_2O$  em solos argilosos, comparativamente, aos arenosos. Isso está, provavelmente, relacionado à maior atividade de desnitrificação nos microsítios anaeróbios formados no solo argiloso, em decorrência dos menores tamanhos dos poros. Solos arenosos são fontes potenciais de  $N_2O$  em condições úmidas, quando os microporos e os macroporos estão cheios de água (100 % CC) (PIHLATIE et al., 2004). A emissão de  $N_2O$  de solos orgânicos são, geralmente, maiores do que de solos minerais (VELTHOF; OENEMA, 1995).

### **Oxigênio**

Conforme descrito anteriormente, a disponibilidade de oxigênio tem forte influência sobre a desnitrificação, uma vez que este processo, em geral,

ocorre sob condições anóxicas. As enzimas envolvidas nesta etapa do ciclo do N variam na sua sensibilidade à presença de oxigênio (MORLEY et al., 2008). O  $N_2O$  pode ser o produto dominante do processo de desnitrificação poucos dias após a ocorrência de chuvas ou de irrigação (WEBB et al., 2004), em decorrência da maior sensibilidade da redutase do óxido nitroso ao oxigênio.

Em altas concentrações de oxigênio o metabolismo aeróbio dos desnitrificadores é favorecido, de modo que a redução do  $NO_3^-$  não ocorre. Embora o processo de desnitrificação seja considerado somente anaeróbio, ele pode também ocorrer em solos aparentemente aeróbios. A distribuição de sua atividade nesses solos é extremamente heterogênea e está, provavelmente, associada à quantidade e localização da matéria orgânica decomponível (CHRISTENSEN et al., 1990), que promove o consumo de  $O_2$  pelos microrganismos heterotróficos e tornam as condições anóxicas.

Conforme dito no parágrafo acima, a desnitrificação ocorre sob condições anaeróbias ou anóxicas, uma vez que as enzimas envolvidas no processo são sensíveis ao oxigênio. Porém, existem relatos de que determinadas bactérias são capazes de conduzir o processo de desnitrificação sob condições aeróbias, em que o  $NO_3^-$  é gradualmente reduzido para  $N_2$ . Segundo Ji et al. (2015), a correspiração do nitrato e do oxigênio é o resultado de uma adaptação microbiana que permite a degradação de nitrogênio tóxico.

Xu et al. (2013) demonstraram que em solos ácidos de florestas subtropicais a fonte principal de  $N_2O$  é a desnitrificação aeróbia, o que sugere que tal via não deveria ser negligenciada na quantificação deste gás. Algumas das bactérias capazes de realizar o processo de desnitrificação sob condições aeróbias foram identificadas como *Mesorhizobium* sp. (OKADA et al., 2005), *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512 (SU et al., 2004), *Burkholderia cepacia* (MATSUZAKA et al., 2003), *Klebsiella pneumonia* CF-S9 (PADHI et al., 2013), entre outras. Esses microrganismos são encontrados em ambientes diversos, o que demonstra que a desnitrificação aeróbia é uma variante representada por várias bactérias desnitrificadoras, não sendo, portanto, considerada rara exceção.

## ***Nitrogênio***

A aplicação de fertilizantes nitrogenados estimula a desnitrificação, por aumentar o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  no solo. A razão  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  aumenta com a maior abundância deste ânion no solo, uma vez que ele é preferível ao  $\text{N}_2\text{O}$  como acceptor de elétrons (SCHLEGEL, 1992 citado por WRAGE et al., 2001).

## ***Carbono solúvel e prontamente decomponível***

Materiais orgânicos como resíduos de plantas, exsudatos de raízes, esterco ou matéria orgânica nativa do solo são fontes de carbono e energia para os organismos desnitrificadores heterotróficos. O processo de desnitrificação do solo, portanto, aumenta com o maior conteúdo de C orgânico, especialmente o C solúvel em água (HENRY et al., 2008). Entretanto, não está claro se os efeitos de diferentes fontes de C neste processo são predominantemente bioquímicos, ou se atuam, indiretamente, alterando a composição da comunidade bacteriana (MILLER et al., 2008).

## ***pH***

O pH é um importante fator que controla o processo de desnitrificação, em decorrência da sensibilidade das enzimas envolvidas à acidez do solo (SAGGAR et al., 2013). Nesta condição, a redução da atividade da redutase do óxido nitroso aumenta a relação  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  emitidos do solo. O pH também afeta a estrutura da comunidade e a proporção de grupos de microrganismos envolvidos na produção de  $\text{N}_2\text{O}$ .

## ***Metais pesados***

Os efeitos de metais pesados na desnitrificação são menos estudados do que os efeitos sobre os outros processos do ciclo do N, talvez porque a sua inibição não traria maiores problemas, quando analisada do ponto de vista agrônomo. No entanto, os diferentes passos na redução do nitrato a  $\text{N}_2$  parecem diferir na sua tolerância a metais pesados, o que poderia agravar as consequências ecológicas da poluição do solo. A inibição seletiva da redutase

do óxido nitroso, por exemplo, poderia aumentar a emissão desse gás para a atmosfera. Segundo alguns autores, a redução do  $N_2O$  é mais afetada pelos metais pesados do que a sua produção (HOLTAN-HARTWIG et al., 2002). Por outro lado, sabe-se que o cobre (Cu) tem um papel crítico na emissão de  $N_2O$ , uma vez que é requerido pela enzima redutase do óxido nitroso.

### **Temperatura**

A temperatura é um importante fator controlador da atividade microbiana no solo e, portanto, tem um efeito pronunciado nas emissões de  $N_2O$ . Ele afeta a atividade dos desnitrificadores por meio de sua ação nas taxas de evaporação e conseqüente mudança do espaço poroso preenchido com água (AGUILERA et al., 2013).

**Tabela 6.** Resultados relativos aos fatores que podem afetar o processo de desnitrificação.

Resultados obtidos	Referência
Observada forte influência da abundância e da atividade de microrganismos envolvidos na desnitrificação, em solo de pastagem usado para hibernação do gado.	Chronáková et al. (2009)
As fortes relações encontradas entre as emissões mensais de $CO_2$ e $N_2O$ sugerem que a produção de $N_2O$ pela desnitrificação é fortemente afetada pela decomposição da matéria orgânica do solo.	Toma et al. (2010)
Aumento da disponibilidade de N, por meio da fertilização, somente ocasionará um aumento da emissão de $N_2O$ , quando houver um concomitante aumento na disponibilidade de água no solo. A magnitude deste aumento está associada à disponibilidade de C.	Gelfand et al. (2015)
Variação de pH do solo, dentro de uma estreita faixa (5,4 - 5,9), teve um efeito considerável na emissão de $N_2O$ , quando o processo de desnitrificação foi a fonte dominante deste gás.	Russenes et al. (2016)

Métodos moleculares têm sido utilizados no estudo da composição, diversidade e abundância da comunidade de microrganismos desnitrificadores,

amplificando-se genes funcionais envolvidos neste processo. Estes genes incluem: *napA* e *narG* (redutase do nitrato), *nirS* e *nirK* (redutase do nitrito), *gnorB* e *cnorB* (redutase do óxido nítrico) e *nosZ* (redutase do óxido nitroso). Nem toda bactéria com capacidade para conduzir o processo de desnitrificação contém todos os genes necessários para que o  $N_2$  seja produzido. Estimativa feita por Jones et al. (2008) demonstra que um terço dos genomas contendo os genes *nirK/nirS* e *norB* não contém o gene *nosZ* requerido para produzir  $N_2$ . Em decorrência da pobre cobertura dos *primers*, a análise das comunidades redutoras do nitrato no solo é, geralmente, subestimada (GREEN et al., 2010). Ademais, muitos organismos que contém genes da redução do nitrato e do nitrito não são necessariamente desnitrificadores (GILES et al., 2012).

### 6.1. Desnitrificação fúngica

A desnitrificação fúngica foi relatada por Shoun e Tanimoto (1991) em *Fusarium oxysporum* e, mais tarde, em outros fungos, tais como *Cylindrocarpon tonkinense*, *Gibberella fujikuroii* e *Trichosporon cutaneum* (SHOUN et al., 1992). Existem relatos que os fungos ectomicorrízicos, *Paxillus involutus* e *Tylospora fibrillosa* são também capazes de produzir  $N_2O$  (PRENDERGAST-MILLER et al., 2011). Segundo Cheng et al. (2015) é possível que a desnitrificação por fungos ocorra, principalmente, em solos ácidos.

Pelo menos 119 espécies fúngicas, representando cerca de 60 gêneros, possuem a capacidade de produzir  $N_2O$ . Noventa por cento dos fungos que produzem  $N_2O$  pertencem ao filo Ascomycota, seguido pelos Basidiomycota e Zygomycota. Fungos representativos dos Ascomycota incluem *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (MOTHAPO et al., 2015)

A atividade de desnitrificação em fungos requer uma quantidade mínima de  $O_2$  para ser induzida. O processo ocorre na mitocôndria onde funciona como respiração anaeróbia, do mesmo modo como ocorre o processo de desnitrificação em bactérias. Na maioria dos casos, o principal produto da desnitrificação fúngica é o  $N_2O$  (MAEDA et al., 2015), uma vez que a maioria

destes microrganismos não possuem o gene responsável pela codificação da enzima redutase do óxido nitroso (TAKAYA, 2009). Além disto, a redutase dissimilatória do  $\text{NO}_3^-$  (NAR), que catalisa a redução do  $\text{NO}_3^-$  para  $\text{NO}_2^-$ , é incomum nos fungos, o que faz com que grande parte destes microrganismos iniciem o processo da desnitrificação com a redução do  $\text{NO}_2^-$  (ZHOU et al., 2001).

Experimentos utilizando antibióticos que inibem a atividade fúngica demonstraram acentuado decréscimo na emissão de  $\text{N}_2\text{O}$ , o que confirma a importância daqueles microrganismos na emissão deste gás (MACLAIN; MARTENS, 2006). Em solos de floresta, pastagem e em regiões semiáridas, acredita-se que o processo de desnitrificação seja conduzido, principalmente, pelos fungos. Segundo Wei et al. (2014), as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  de solos agrícolas que receberam aplicação superficial de fertilizantes orgânicos granulares foram atribuídas, principalmente, à desnitrificação fúngica. Em alguns solos, Herold et al. (2012) demonstraram que a atividade dos fungos neste processo foi sempre menor que a atividade das bactérias. Apesar destes resultados a contribuição dos fungos no processo de desnitrificação e consequente produção do  $\text{N}_2\text{O}$  em áreas cultivadas ainda não está clara.

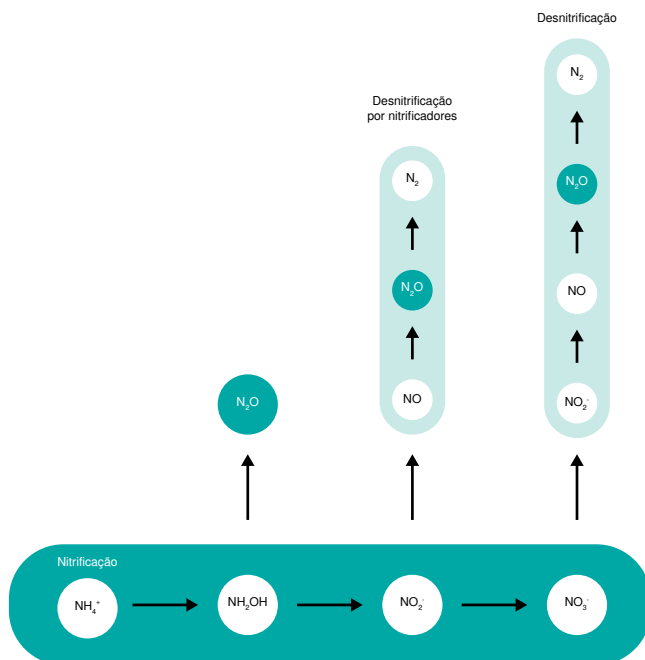
## 6.2. Desnitrificação por arqueia

O papel das arqueias na condução do processo de desnitrificação ainda é pouco conhecido, embora já tenha sido constatado que estes microrganismos são capazes de reduzir nitrato via nitrito e  $\text{N}_2\text{O}$ , para  $\text{N}_2$ . Poucos genes e enzimas envolvidos na desnitrificação por estes microrganismos foram investigados (KRAFT et al., 2011). Entretanto, sabe-se que as arqueias diferem das bactérias na organização dos genes e na estrutura e regulação das enzimas responsáveis pela desnitrificação (PHILIPPOT, 2002).

## 6.3. Processo de desnitrificação por nitrificadores (DN)

A produção de óxido nitroso no solo é resultante de transformações microbianas de compostos nitrogenados pelos processos de nitrificação e desnitrificação. No último processo, o óxido nitroso é produzido pelos desnitrificadores como um intermediário e, às vezes, produto final da redução do nitrato. Na nitrificação, o óxido nitroso é produzido como um subproduto

da oxidação da amônia. Neste último processo, o intermediário instável (NOH) formado durante a oxidação do  $\text{NH}_2\text{OH}$  para  $\text{NO}_2^-$  é espontaneamente decomposto para óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Na DN, o  $\text{N}_2\text{O}$  é um intermediário da redução do nitrito para  $\text{N}_2$  (Figura 14) (WRAGE et al., 2001). A DN é, portanto, uma via da nitrificação e deveria ser rotineiramente considerada, quando se avaliam as fontes de emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo (KOOL et al., 2011).



**Figura 14.** Processo de desnitrificação por nitrificadores.

As sequências de reações da DN são conduzidas somente por um grupo de microrganismos denominados oxidadores autotróficos da  $\text{NH}_3$ . Assim, a DN contrasta com o processo conjunto de nitrificação/desnitrificação, em que diferentes grupos de microrganismos podem, juntos, transformar  $\text{NH}_3$  no produto final,  $\text{N}_2$ . Acredita-se que as enzimas requeridas pelos organismos que conduzem a DN sejam essencialmente as mesmas da oxidação da amônia e da desnitrificação. No entanto, muito pouco é conhecido sobre a DN, em parte, devido à ausência de um método adequado para sua determinação e, também, em decorrência das diferentes designações atribuídas a esta via.



#### 6.4. Codesnitrificação

A codesnitrificação refere-se à produção de  $N_2O$  e  $N_2$  durante o processo convencional da desnitrificação, quando alguns compostos nitrogenados (p. ex. aminas, denominados de cosubstrato) são supridos, em adição ao  $NO_3^-$ , ao  $NO_2^-$  e ao  $NO$  (SPOTT et al., 2011). A variedade de compostos que pode ser usada como cossustrato é grande, mas ainda existem dúvidas sobre quais deles seriam realmente ativos neste processo.

Vários microrganismos conduzem o processo da codesnitrificação e, entre eles, estão incluídas espécies pertencentes aos Domínios Bacteria, Archaea e Eucarya. Fungos como *Fusarium solani* e *Cylindrocarpon tonkinense* são capazes de emitir  $N_2$  como produto da codesnitrificação, quando há disponibilidade de aminoácidos (SHOUN et al., 1992). Ainda não está claro se o produto final da codesnitrificação ( $N_2$  ou  $N_2O$ ) depende das espécies de microrganismos, que catalizam o processo, ou do tipo de cossustrato (SU et al., 2004).

Embora a ocorrência da codesnitrificação já tenha sido demonstrada em solos sob pastagem, a sua importância em outros ecossistemas ainda não está clara (LAUGHLIN; STEVENS, 2002). Segundo Selbie et al. (2015), naqueles solos, a codesnitrificação é responsável por grandes perdas de  $N_2$ , em detrimento do  $N_2O$ .

#### 6.5. Quimiodesnitrificação

A quimiodesnitrificação é a decomposição química de intermediários da oxidação do  $NH_4^+$  para  $NO_2^-$ , ou do próprio  $NO_2^-$ , por reações com compostos orgânicos ou inorgânicos (p. ex.  $Fe^{+2}$  ou  $Cu^{+2}$ ). É uma reação não enzimática que ocorre, geralmente, em condições de acidez. Sob tais condições, o principal produto é o  $NO$ , embora o  $N_2O$  também seja produzido (CHALK; SMITH, 1983).

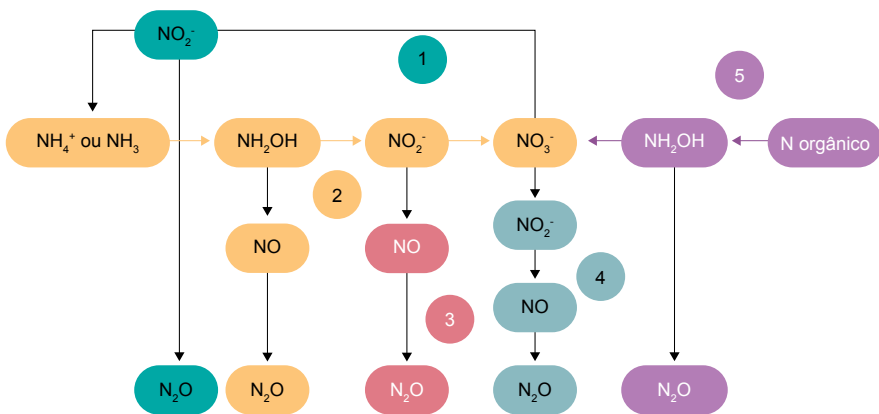
Embora exista um consenso da comunidade científica sobre a existência da formação abiótica de gases traços de nitrogênio, pouco é conhecido sobre a magnitude deste processo no ciclo global de N do solo. Isso poderia levar a uma superestimação dos processos biológicos responsáveis pela emissão

daqueles gases, quando quantificados sob diferentes condições climáticas e edáficas (HEIL et al., 2016).

## 7. Redução dissimilatória de nitrato para amônio

A redução dissimilatória de nitrato para amônio (RDNA), ou amonificação do nitrato, é uma das vias menos conhecidas do ciclo do N e, frequentemente, ignorada nos balanços desse elemento no solo (RÜTTING et al., 2011). Neste processo, o nitrato é utilizado pelos microrganismos como receptor de elétrons quando a disponibilidade de  $O_2$  é baixa e fontes de C são utilizadas como doadoras de elétrons. Na primeira etapa da RDNA o nitrato é reduzido para nitrito e, em sequência, para  $NH_4^+$ . Com a formação desse cátion, por meio daquele processo, pode-se incrementar a retenção de N no solo, com reflexos na eficiência de uso do N pelas plantas (TEMPLER et al., 2008).

Existem relatos de que a RDNA produz  $N_2O$ , como subproduto, com o aumento do pH, possivelmente como um mecanismo para reduzir o  $NO_2^-$ , que é prejudicial a muitos microrganismos e que tende a acumular em condições mais básicas. A desnitrificação e a RDNA são os únicos processos microbiológicos do solo capazes de remover  $NO_3^-$  e produzir  $N_2O$  (Figura 15). Entretanto, as condições que favorecem um ou outro processo ainda têm que ser determinadas (KRAFT et al., 2014).



**Figura 15.** Processos de produção de  $N_2O$  no solo. 1- redução dissimilatória do nitrato para amônia; 2- nitrificação autotrófica; 3- desnitrificação por nitrificadores; 4- desnitrificação; 5- nitrificação heterotrófica.

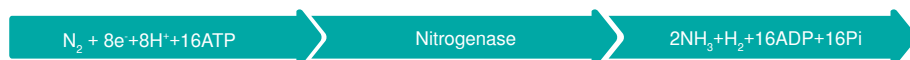
A RDNA é conduzida por várias bactérias do solo como anaeróbios obrigatórios (*Clostridium*), anaeróbios facultativos (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*) e aeróbios (*Pseudomonas*, *Arthrobacter*), incluindo várias espécies de rizóbio (POLCYN, PODESZWA, 2009). Estirpes do gênero *Arthrobacter*, que são abundantes no solo e consideradas bactérias aeróbias obrigatórias, são capazes de realizar a RDNA, quando incubadas anaerobicamente (ESCHBACH et al., 2003). Segundo Mohan e Cole (2007) não existem bactérias capazes de realizar tanto a desnitrificação como a RDNA. Entretanto, Behrendt et al. (2010) demonstraram que espécies de *Paenibacillus*, além de conduzir o processo da RDNA, também conduzem os processos de nitrificação heterotrófica e de desnitrificação. A RDNA é também conduzida por fungos (ZHOU et al., 2001). Alguns destes microrganismos realizam um processo denominado `fermentação do amônio` (ZHOU et al., 2001). O processo consiste na redução do nitrato para amônio, acoplado à oxidação catabólica de doadores de elétrons (etanol) para acetato, gerando ATP. A energia produzida é utilizada para manter o crescimento dos microrganismos sob condições anaeróbias. Nesta reação, o nitrato atuará como acceptor terminal de elétrons para a fermentação, mas não para a respiração anaeróbia.

A presença de plantas diferentes altera a atividade e a abundância de microrganismos redutores dissimilatórios do nitrato, em consequência da disponibilidade diferenciada de exsudatos de raízes e de oxigênio (PHILIPPOT et al., 2009). A decomposição destes compostos por microrganismos heterotróficos estimula a redução do  $\text{NO}_3^-$ , uma vez que induzem condições de anaerobiose. Porém, poucos estudos têm investigado o efeito daqueles compostos sobre a RDNA. Algumas informações são disponíveis para plantas de zonas úmidas, mas os resultados não são conclusivos (MATHESON et al., 2002). Existe também evidências de ocorrência significativa da RDNA em solos de floresta (RÜTTING et al., 2008) e em arrozais (YIN et al., 2002), após a adição da glicose (WAN et al., 2009). Em solos agrícolas, Inselfbacher et al. (2010) não encontraram forte contribuição daquele processo, sob as condições estudadas. Essa descoberta demonstra a necessidade de reavaliação das condições sob as quais a RDNA ocorre.

## 8. Fixação biológica do nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo enzimático em que o  $N_2$  é reduzido a  $NH_3$  pela ação de microrganismos de vida livre, associados às plantas ou simbiontes. Evolutivamente, acredita-se que a FBN tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de nitrogênio se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento dos óxidos de nitrogênio (nitratos e nitritos) pelos organismos teria, provavelmente, limitado seus crescimentos e ocasionado uma pressão seletiva, que favoreceu o aparecimento da diazotrofia (LEMOS, 2011). Este termo refere-se a microrganismos diazotróficos, ou seja, organismos com capacidade de fixar o  $N_2$ .

Apesar de a atmosfera ser composta de 78 % de gás dinitrogênio ( $N_2$ ) organismos eucariotos, como plantas e animais, não conseguem utilizar este elemento diretamente. O problema básico para a fixação do nitrogênio é a presença da ligação tripla ( $N\equiv N$ ), que torna este gás extremamente estável à temperatura ambiente. O rompimento desta tripla ligação por microrganismos requer a enzima nitrogenase (Figura 16). Os genes que codificam para esta enzima são amplamente encontrados no Domínio Bacteria e mesmo no Domínio Archaea (MARTINEZ-ROMERO, 2006).



**Figura 16.** Esquema da ação da nitrogenase.

São conhecidos três tipos de nitrogenase: uma que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe), outro em que o vanádio (V) substitui o Mo (nitrogenase-2), em condições onde a concentração desse elemento é baixa, e, uma terceira, que não parece conter nem molibdênio nem vanádio. A enzima nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, uma vez que esta molécula pode reagir com o componente Fe das proteínas. As bactérias *Azotobacter* spp., um diazotrófico aeróbio do solo (MARTINEZ-ROMERO, 2006) e *Rhodospseudomonas palustris*, uma bactéria fotossintetizante (LARIMER et al., 2004) apresentam os três tipos de nitrogenase, o que é uma vantagem quando o Mo é limitante nos solos (BELLENGER et al., 2011).

A proteção da nitrogenase da molécula de  $O_2$  não é um problema para as bactérias anaeróbias, mas poderia se tornar um grande obstáculo para espécies aeróbias, tais como cianobactérias, bactérias aeróbicas de vida livre (*Azotobacter* e *Beijerinckia*) e para as bactérias que fixam o  $N_2$  em simbiose com leguminosas. Entretanto, estes microrganismos possuem formas de evitar o contato do  $O_2$  com a enzima nitrogenase. Nas espécies de *Azotobacter*, o seu elevado metabolismo respiratório mantém baixos os níveis de  $O_2$  nas células. Outras bactérias são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares, que limitam a difusão de  $O_2$  para o interior das células. Nas cianobactérias, a fixação do nitrogênio ocorre em células especiais denominadas heterocistos, que possuem somente o fotossistema I (usado para gerar ATP pelas reações mediadas pela luz) e não geram oxigênio. Na associação simbiótica com leguminosas, a fixação do  $N_2$  ocorre em estruturas denominadas nódulos. Após a formação destes, diversas proteínas são sintetizadas e uma delas, a leghemoglobina, controla o suprimento de oxigênio para os tecidos nodulares.

Os microrganismos fixadores de  $N_2$  podem existir como organismos de vida livre e em associações com diferentes graus de complexidade com as plantas. Estes microrganismos podem ser divididos em:

1. Fixadores não-simbióticos ou de vida livre;
2. Fixadores associativos, que formam uma relação casual e pobremente estruturada com raízes ou porções aéreas das plantas; e
3. Fixadores simbióticos que fixam o  $N_2$  em associações organizadas com plantas superiores.

### **8.1. Fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas**

A fixação biológica do  $N_2$  (FBN) em leguminosas é um processo chave para a sustentabilidade agrícola devido ao seu reduzido impacto no ambiente, em relação à utilização de fertilizantes nitrogenados. Estes fertilizantes são produzidos por meio da síntese química da amônia, que gera grandes quantidades de  $CO_2$ , que é um gás de efeito estufa.

A fixação biológica do nitrogênio em plantas da família Leguminosae ocorre pela associação simbiótica com bactérias coletivamente conhecidas como

rizóbio, que interagem com as raízes para formar estruturas especializadas denominadas nódulos. Nos nódulos, o rizóbio na forma pleiomórfica (bacteróide) fixa o  $N_2$  atmosférico e o converte para uma forma combinada, a amônia, que pode ser utilizada pela planta hospedeira. Essa reação é endergônica e para que ela ocorra é necessário o fornecimento de energia armazenada na forma de ATP (HOFFMANN, 2007). A planta fornece aos rizóbios fontes de carbono e ambiente favorável à fixação do  $N_2$ . As taxas de fixação de  $N_2$  variam com o hospedeiro, com o microssimbionte e com as condições ambientais. Leguminosas de grãos fixam de 25 a 200 kg N ha<sup>-1</sup> por ciclo de crescimento e suprem de 40 a 100 % das necessidades de N da planta.

### 8.1.1. Processo de infecção

A formação do nódulo é resultante de um processo complexo, que envolve vários estágios. Primeiramente, ocorre uma intensa troca de sinais entre as bactérias e as plantas hospedeiras, que inicia com a exsudação de compostos flavonoides e isoflavonoides pelas raízes (Tabela 7). As bactérias respondem a esses sinais desencadeando a expressão coordenada de uma série de genes da nodulação – *nod/noll/noe*, necessários à síntese e secreção de lipoquitooligossacarídeos, denominados fatores Nod. Estes genes, quando ativados, induzem a bactéria a produzir outras moléculas, que ativarão genes da planta hospedeira, responsáveis pela continuidade do processo de infecção, até a formação dos nódulos. Os flavonoides são continuamente liberados na rizosfera, mas a sua concentração e os vários tipos aumentam na presença da bactéria simbiótica compatível. Estes compostos podem ser simultaneamente indutores de uma espécie de rizóbio e repressores de outras (BEGUM et al., 2001).

**Tabela 7.** Exemplos de indutores de genes da nodulação e as leguminosas que os produzem.

Composto	Leguminosa	Espécie de rizóbio	Citação
Daidzeína	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Kosslak et al. (1987)
Genisteína	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Sinorhizobium fredii</i>	Kosslak et al. (1987)

Continua...

**Tabela 7.** Continuação.

Composto	Leguminosa	Espécie de rizóbio	Citação
Estaquidrina	<i>Alfafa</i>		Phillips et al. (1992)
Trigonelina	<i>Alfafa</i>		Phillips et al. (1992)
Naringenina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> <i>Rhizobium etli</i>	Rhijnet et al. (1994)
Daidzeína	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium etli</i> <i>Rhizobium tropici</i>	Bolanos-Vasquez e Werner (1997)
Ácido eritrônico	<i>Lupinus albus</i>		Gagnon e Ibrahim (1998)
Ácido tetrônico	<i>Lupinus albus</i>		Gagnon e Ibrahim (1998)
Naringenina	<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viceae</i>	Begum et al. (2001)
Hesperetina	<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viceae</i>	Begum et al. (2001)
Luteolina	<i>Medicago sativa</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Peck et al. (2006)
Apigenina	<i>Crotalaria podocarpa</i>	<i>Methylobacterium nodulans</i>	Reniera et al. (2008)
Genisteína	<i>Phaseolus vulgaris</i>		Nápoles et al. (2009)

As etapas do processo de infecção e desenvolvimento dos nódulos radiculares são listadas abaixo.

- a. As bactérias enviam sinais químicos para a planta por meio dos produtos dos ‘fatores Nod’, provocando o encurvamento do pelo radicular, o início da divisão celular no córtex da raiz e a indução do meristema do nódulo.
- b. Após a adesão das bactérias aos pelos radiculares, ocorre a dissolução da parede celular, permitindo a entrada das bactérias nas raízes.
- c. Esse processo dá início à formação de um cordão de infecção, que se desenvolve e se estende até o córtex da raiz, transportando a bactéria para o meristema do nódulo. Entretanto, em decorrência da diversidade de espécies de leguminosas, não é adequado fazer generalizações quanto ao processo de infecção (nem sempre é através do cordão de infecção) e às formas e modos de desenvolvimentos dos nódulos.
- d. Os rizóbios se transformam em bacteroides e não se dividem mais. Tal transformação foi descrita por Beijerinck (1888), como a

transformação bacteriana da forma arredondada para células em forma de Y. Os bacteroides são rodeados por uma membrana denominada peribacteroide, formando uma estrutura denominada simbiossomo. A fixação do nitrogênio inicia-se após a formação dos bacteroides.

- e. Durante o processo de estabelecimento da simbiose, a planta também expressa proteínas específicas do nódulo que se chamam nodulinas. Entre elas, pode-se citar a leghemoglobina, que, como dito anteriormente, tem a função de proteger a nitrogenase dos efeitos danosos do oxigênio. Ela se localiza no citosol das células da planta infectada pelos bacteroides e confere uma coloração rósea aos nódulos funcionais (Figura 17). Após a senescência desta proteína, os nódulos tornam-se esverdeados. Nódulos ineficientes na fixação do  $N_2$  apresentam coloração interna branca ou esverdeada desde a sua formação.
- f. Quando os nódulos se deterioram, as bactérias passam ao solo. Embora os bacteroides percam a capacidade de divisão, algumas bactérias que permaneceram em fase latente dentro dos nódulos, proliferam no solo utilizando como nutrientes os produtos dos nódulos em decomposição. Deste modo, as bactérias podem iniciar o processo de infecção em outras raízes ou manter-se em estado livre no solo.

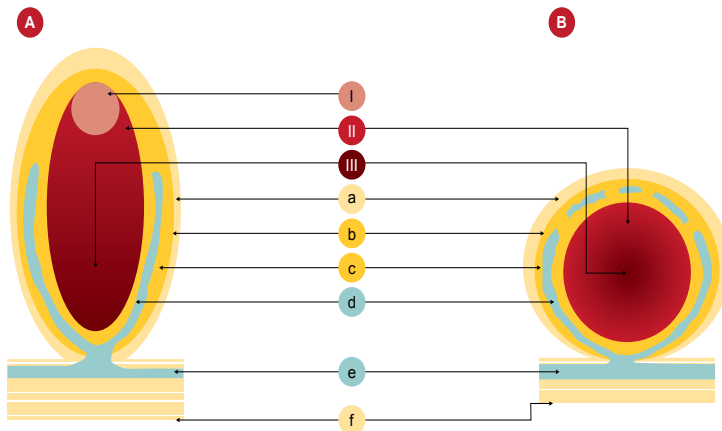
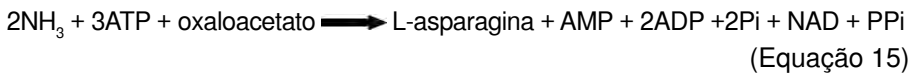


Foto: Ieda de Carvalho Mendes

**Figura 17.** Nódulos apresentando a coloração avermelhada decorrente da presença da leghemoglobina.



Em geral, os nódulos dividem-se em dois tipos: determinados e indeterminados (Figura 18). Os nódulos indeterminados possuem forma cilíndrica em decorrência da manutenção do meristema apical ativo, que produz novas células para crescimento ao longo da vida do nódulo, como, por exemplo, em alfafa. A amônia produzida pelos bacteroides é exportada para a célula hospedeira e convertida via glutamina, glutamato e aspartato para asparagina, que é transportada para a parte aérea. A equação geral pode ser assim descrita:



**Figura 18.** (A), nódulo de crescimento indeterminado. (B), nódulo de crescimento determinado. (I), meristema nodular; (II), zona infectada; (III), zona infectada senescente; (a), córtex externo; (b), endoderme; (c), córtex interno; (d) feixes vasculares do nódulo; (e), feixes vasculares da raiz; (f), epiderme da raiz.

Fonte: adaptado de Moreira e Siqueira (2006).

Os nódulos determinados não possuem meristema persistente e apresentam forma arredondada, como por exemplo, os de feijão e soja. Embora a glutamina e a asparagina sejam produzidas, elas são utilizadas para sintetizar purina, tal como a xantina. Esta é convertida pelas células

vizinhas não infectadas para ureídeos, alantoína e ácido alantoico, que são transportados para a parte aérea das plantas.

As espécies e estirpes de rizóbios variam na amplitude de hospedeiros com os quais eles podem formar nódulos. Esta amplitude pode ser estreita, como no caso do *Sinorhizobium meliloti*, que nodula *Medicago* e os gêneros relacionados, *Melilotus* e *Trigonella*, ou amplo, como no caso do *Rhizobium* sp. NGR234 (renomeada *Sinorhizobium* sp. NGR234), que é capaz de formar nódulos com espécies de 112 gêneros de plantas, incluindo a não leguminosa, *Parasponia*. Dependendo da leguminosa, um único nódulo pode conter várias estirpes de rizóbio, mas na maioria das vezes apenas uma estirpe é encontrada (MARTINEZ-ROMERO, 2003). Entretanto, é também comum encontrar em uma única raiz vários nódulos, cada um contendo estirpes diferentes (BROMFIELD et al., 2001).

### **8.1.2. Influência de fatores edafoclimáticos na nodulação e fixação simbiótica do $N_2$ em leguminosas**

Em geral, os fatores que limitam o crescimento da planta também limitam a fixação simbiótica do  $N_2$ , tanto por efeitos diretos sobre a formação e função dos nódulos, como pela diminuição da capacidade da planta em suprir nutrientes para os nódulos. Portanto, uma estirpe de rizóbio persistente e competitiva poderá não expressar a sua total capacidade para fixar nitrogênio se determinados fatores, edáficos ou climáticos, impuserem limitações sobre o vigor da planta hospedeira. Abaixo são descritos alguns fatores que afetam a fixação do  $N_2$  em leguminosas.

### **Nitrogênio**

Quando a concentração de N mineral no solo excede um determinado valor mínimo, que é variável entre culturas, há um efeito negativo na adesão das bactérias às raízes, no processo de infecção e desenvolvimento nodular e na atividade da nitrogenase. Em razão desse efeito adverso, a fertilização nitrogenada não é, usualmente, recomendada para as leguminosas que podem fixar o  $N_2$  atmosférico. Em alguns casos, porém, a aplicação de uma

pequena dose de N no plantio pode estimular a FBN, dependendo da espécie de planta e das condições de crescimento (GAN et al., 2004).

### **Fósforo**

O P é utilizado em vários processos bioquímicos e moleculares da planta, particularmente na aquisição, armazenamento e utilização de energia. Teores insuficientes no solo limitam a FBN, com reflexo na redução do número e da biomassa dos nódulos, bem como na diminuição da atividade da nitrogenase (SULIEMAN; TRAN, 2015).

### **Molibdênio**

O molibdênio é componente de dois tipos de nitrogenases essenciais à fixação biológica do N<sub>2</sub> nos nódulos radiculares. Almeida et al. (2013) relataram que sementes de feijão enriquecidas com alta concentração de Mo aumentaram a atividade da nitrogenase no estágio vegetativo, em plantas inoculadas com rizóbio. Do mesmo modo, Vieira et al (1998) obtiveram maior atividade da nitrogenase em plantas de feijão que foram fertilizadas com Mo (Tabela 8).

**Tabela 8.** Efeito da aplicação do Mo na atividade da nitrogenase em *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em solo de alta fertilidade.

N no plantio (kg ha <sup>-1</sup> )	Molibdênio (g ha <sup>-1</sup> )		Significância do Mo
	0	40	
0	2,94	8,28	*
20	1,91	3,57	*
Significância do N	ns	*	

ns e \* - Não significativo e significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste de Duncan. Vieira et al. (1998).

### **Cobalto**

O cobalto (Co) é um elemento essencial aos microrganismos fixadores de  $N_2$ , uma vez que ele é necessário para a síntese da cobalamina (vitamina B12), que participa das reações metabólicas para a biossíntese da leghemoglobina (CERETTA et al., 2005). Na tabela 9 são apresentados alguns resultados de pesquisas sobre os efeitos do Co e do Mo na fixação de  $N_2$  atmosférico.

### **Níquel**

O níquel é um micronutriente para as plantas, por ser componente estrutural das enzimas urease e hidrogenase, que desempenham função no metabolismo do nitrogênio nas plantas leguminosas. Segundo Franco (2015), a aplicação de doses baixas de Ni (45 e 90 mg kg<sup>-1</sup>) via semente proporciona aumento de massa seca de parte aérea, de massa seca de nódulos e da produção de grãos de soja.

### **Acidez**

Em solos ácidos a fixação do  $N_2$  pode ser reduzida em consequência do efeito direto da concentração de íons  $H^+$ , pela presença de níveis tóxicos de alumínio e manganês ou, ainda, pela deficiência de cálcio, fósforo ou molibdênio. A acidez pode diminuir o número de rizóbios no solo e limitar a ligação das bactérias aos pelos radiculares.

**Tabela 9.** Resultados da fixação simbiótica de  $N_2$  em cultivos de feijão e soja que receberam adubação molíbdica e de cobalto.

Local	Resultados	Referências
Paraná	A adição de Mo nos solos LRe e LEa cultivados com soja por mais de oito anos aumentou a eficiência de fixação biológica do $N_2$ e a produtividade da soja; o solo LRd não respondeu à adição desse nutriente.	Campo e Lantmann (1998)

Continua...

**Tabela 9.** Continuação.

Local	Resultados	Referências
Ponta Grossa, PR	A aplicação de Mo e, ou Co na semente de soja não alterou a nodulação e a eficiência do processo biológico de fixação de N <sub>2</sub> , avaliada pela absorção de N e pela concentração de N nas folhas e nos grãos.	Marcondes e Caires (2005)
Botucatu, SP	A nodulação em soja é afetada pela dose e via de aplicação de molibdênio, sendo que maior número e massa de nódulos foram obtidos com a aplicação do micronutriente via semente.	Toledo et al. (2010)
Maracaju, MS	O Mo proporcionou incrementos na produtividade e no teor de proteínas dos grãos de soja.	Gelain et al. (2011)
Paulínia, SP	Respostas positivas ao Mo e ao Co foram observadas no número de nódulos, vagens e grãos, com aumentos de até 240 kg ha <sup>-1</sup> no rendimento da soja.	Dourado Neto et al. (2012)

### ***Temperatura***

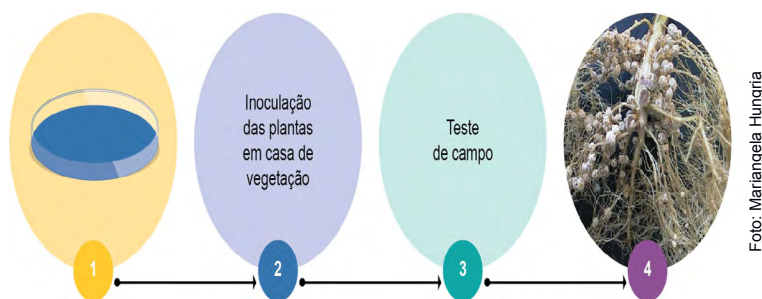
A temperatura influencia a sobrevivência do rizóbio no solo, o desenvolvimento dos nódulos e o período de tempo em que eles permanecem ativos. As temperaturas ótimas para nodulação e fixação de nitrogênio variam de acordo com as espécies de rizóbio, mas ficam dentro de uma estreita faixa na vizinhança dos 30°C.

### ***Baixa umidade no solo***

A fixação do N<sub>2</sub> em leguminosas é altamente sensível à deficiência de água no solo. A resposta do processo simbiótico ao estresse de umidade depende do estágio de crescimento da planta. Em geral, ele é mais prejudicial à nodulação e fixação do N<sub>2</sub>, quando ocorre durante o crescimento vegetativo do hospedeiro.

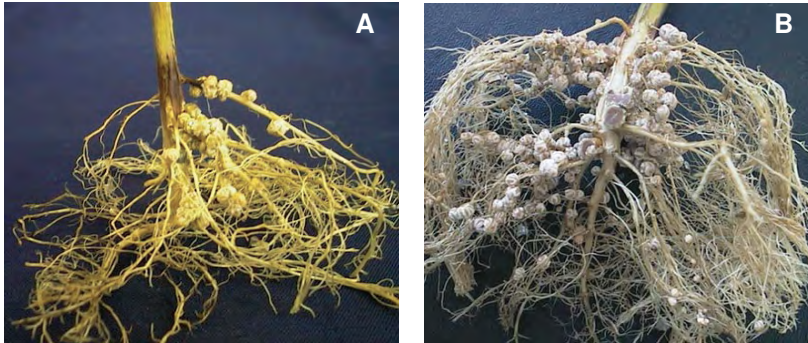
### 8.1.3. Seleção de estirpes eficientes de rizóbio

A recomendação de estirpes para uso como inoculante microbiano de interesse agrícola depende de uma análise técnica da eficiência agrônômica dessas bactérias. Como o processo simbiótico pode ser afetado por várias condições edafoclimáticas, as estirpes devem ser adaptadas às condições regionais onde elas serão utilizadas. A Figura 19 mostra de forma resumida as etapas do processo de seleção de estirpes eficientes de rizóbio.



**Figura 19.** Fases para seleção de estirpes de rizóbio. (1) Isolamento de rizóbios de nódulos, em placa de Petri, com meio de cultura apropriado. (2) Teste da eficiência simbiótica das bactérias em casa de vegetação. (3) Teste de eficiência simbiótica, a campo, sob diferentes condições edafoclimáticas (4) Nódulos de soja. Fonte: (Hungria et al., 2007).

Para a inoculação da soja são recomendadas quatro estirpes de rizóbio: duas da espécie *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), uma da espécie *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 ou CPAC 15) e outra da espécie *B. diazoefficiens* (SEMIA 5080 ou CPAC 7), anteriormente também nomeada *B. japonicum* (DELAMUTA et al., 2013). As combinações mais utilizadas têm sido a SEMIA 587 + SEMIA 5019, em áreas já cultivadas no sul do País, e a SEMIA 5079 + SEMIA 5080, nos Cerrados (HUNGRIA et al., 2007). A utilização das estirpes de rizóbio na soja supre totalmente a demanda da planta em nitrogênio, o que faz com que o Brasil seja considerado um país modelo na aplicação dos benefícios provenientes da fixação biológica de  $N_2$  (Figuras 20 e 21).



**Figura 20.** Nodulação inicial das raízes: (A) parcial ou ‘fraca’ e (B) bem sucedida. A nodulação primária parcial pode ser atribuída à falta de rizóbios fisiologicamente aptos a infectar as raízes naquele momento, bem como a fatores limitantes da planta hospedeira e do ambiente.

Fonte: Hungria et al. (2007).

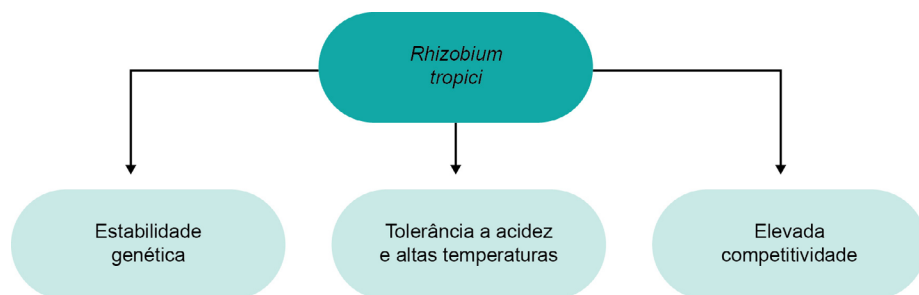


**Figura 21.** Soja inoculada e não inoculada com rizóbio.

- O inoculante consiste de uma cultura de rizóbio previamente selecionada, misturada a um veículo, normalmente a turfa.
- Os inoculantes turfosos são vendidos no Brasil desde a década de 1950.
- Mais de 95 % do mercado de inoculantes para leguminosas na América do Sul são destinados à cultura da soja (HUNGRIA, 2011a).
- No Brasil, são produzidos mais de 27 milhões de doses de inoculantes de soja, incluindo os exportados para alguns países da América do Sul e da África.
- A inoculação da soja com rizóbio é responsável por uma economia estimada em mais de 20 bilhões de reais por ano, que deixam de ser gastos com fertilizantes nitrogenados.
- A análise dos resultados de pesquisas de seleção, recomendação de estirpes e controle de qualidade dos inoculantes é feita pela Relare (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). Ela é formada por um grupo de instituições de pesquisa e empresas produtoras de inoculantes. O Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento) legaliza e rege a legislação para a produção de inoculantes comerciais, em âmbito federal.

Para o feijoeiro as estirpes de rizóbio recomendadas para inoculantes comerciais contêm duas estirpes: *R. tropici* (CIAT 899, SEMIA 4077 e 4088) (Figura 22) e *Rhizobium freirei* (PRF 81, SEMIA 4080). Em experimento conduzido em Dourados, MS, Pelegrin et al. (2009) demonstraram que a inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* CIAT 899 promoveu rendimentos de grãos equivalentes à aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N. Do mesmo modo, a inoculação do feijoeiro com estirpes de rizóbio isoladas no Distrito Federal ocasionou rendimentos semelhantes aos da testemunha que recebeu adubação nitrogenada e as que foram inoculadas com as estirpes de referência *Rhizobium tropici* CIAT 899 e PRF 81 (MOSTASSO et al., 2002). Rendimentos do feijoeiro inoculado com as estirpes UFLA 02-100, UFLA 02-86 e UFLA 02-127 também foram semelhantes ao da testemunha com aplicação de 70 kg ha<sup>-1</sup> de N, e ao das plantas inoculadas com a estirpe CIAT 899 (SOARES et al., 2006a). Em um trabalho desenvolvido por Ferreira et al. (2012), em casa-de-vegetação, utilizando a cultivar BRS MG Talismã, verificou-se que plantas inoculadas com as estirpes UFLA 04-195, UFLA 04-173 e UFLA 04-202 apresentaram número e massa seca de nódulos e eficiência simbiótica semelhantes ao da estirpe CIAT 899.





**Figura 22.** Algumas características da espécie *R. tropici* que a torna adequada para utilização em inoculante comercial.

O caupi (*Vigna unguiculata* L.) é uma leguminosa de grande importância nutricional, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Embora o caupi seja considerado uma espécie promíscua, por sua habilidade de formar nódulos com várias espécies bacterianas, os rendimentos máximos são obtidos com a inoculação de estirpes do gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes de *Bradyrhizobium*, UFLA 3-84 (SEMIA 6461), BR 3267 (SEMIA 6462, *Bradyrhizobium yuamigense*), INPA 03-11B (SEMIA 6463) e BR 3262 (SEMIA 6464, *Bradyrhizobium pachyrhizi*) são atualmente recomendadas para a inoculação de feijão caupi (LEITE et al., 2017; ZILLI et al., 2011). Segundo Soares et al. (2006b), a inoculação dessa cultura, sob condições de campo, com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B contribuiu, de forma significativa, para o aumento no rendimento de grãos, sendo semelhante ao da testemunha com 70 kg ha<sup>-1</sup> de N.

### **8.1.4. Coinoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP)**

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) pertencem a um grupo heterogêneo e benéfico de microrganismos encontrados na rizosfera, na superfície das raízes ou associados a elas e que são capazes de aumentar o crescimento de plantas e protegê-las de doenças e estresses abióticos (GRAY; SMITH, 2005). Dentre as BPCP, estirpes dos gêneros *Azospirillum*,

*Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* e *Paenibacillus* são frequentemente descritas como potenciais promotoras do crescimento de plantas. Dentre os efeitos positivos destas bactérias, podem ser citados: fixação de  $N_2$ , produção de fitohormônios, aumento da solubilização de fosfato, aumento na absorção de água e de nutrientes, controle de fitopatógenos, entre outros. Os fitohormônios têm grande impacto no crescimento de raízes.

A coinoculação de leguminosas com rizóbio e BPCP tem sido proposta como uma tecnologia capaz de aumentar a nodulação, estimular o crescimento de plantas e beneficiar o processo de fixação de  $N_2$ . Os efeitos benéficos são associados à maior produção de raízes laterais e à diferenciação de um maior número de células epidérmicas em pelos radiculares susceptíveis de serem infectados pelos rizóbios. Pode ocorrer uma secreção aumentada de substâncias flavonoides, que estão envolvidas na ativação dos genes da nodulação no rizóbio (STAR et al., 2012). A coinoculação permite também que o processo de exsudação de flavonoides persista por um período maior de tempo (BURDMAN et al., 1997).

A escolha das BPCP a serem utilizadas depende de um amplo trabalho de seleção, uma vez que a coinoculação também pode interferir de forma negativa na colonização das raízes pelo rizóbio (BERGGREN et al., 2005). O potencial do gênero bacteriano *Azospirillum* spp. em aumentar a nodulação e crescimento de leguminosas, quando coinoculada com rizóbio, é amplamente estudada. Burdman et al. (1997) verificaram, sob condições de campo, que a inoculação do feijoeiro (cv. Bulgarian) com as espécies de rizóbio *R. etli* TAL182 e *R. tropici* CIAT899 aumentou o rendimento de sementes em 13 %, enquanto que com a coinoculação (*Azospirillum brasilense* estirpe Cd), o aumento foi de 23 %. Hungria et al. (2013) relataram que em feijoeiro-comum a inoculação das sementes com *Rhizobium tropici* aumentou a produtividade em 8,3 % (98 kg ha<sup>-1</sup>), enquanto que com a coinoculação do rizóbio com *Azospirillum* o aumento foi de 19,6 % (285 kg ha<sup>-1</sup>). Os genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. variam em termos de resposta à nodulação, quando coinoculadas com *Azospirillum* e *Rhizobium* (REMANS et al., 2008). Análise genética revelou uma base genética (Quantitative Trait Loci) no genoma do feijoeiro relacionada à resposta diferencial ao *Azospirillum* entre os genótipos de feijão BAT477 e DOR364. Em estudo de campo, em três locais diferentes

de Cuba, a coinoculação de *Rhizobium* (*R. etli* CNPAF512 e 6bIII) com *Azospirillum brasiliense* Sp245 aumentou a quantidade de  $N_2$  fixado e o rendimento do *Phaseolus vulgaris* DOR364, comparativamente à inoculação somente com rizóbio, em todas as áreas estudadas. O contrário ocorreu com o genótipo BAT477. O efeito das BPCP sobre a nodulação do feijoeiro pode também depender da nutrição da planta com fósforo (REMANS et al., 2007). Estes autores demonstraram que *A. brasiliense* Sp245 e *B. subtilis* LMG 7135 aumentaram a nodulação sob condições de alto P, mas não sob condições de limitação deste nutriente.

Vários estudos têm também demonstrado a eficácia da coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em aumentar o rendimento dos grãos (HUNGRIA et al., 2015), em manter a nodulação sob condições de estresses hídricos moderados (CEREZINI et al., 2016) e em promover a precocidade da nodulação (CHIBEBA et al., 2015). Esta tecnologia foi aprovada e registrada para utilização com esta leguminosa pela agência regulatória no Brasil (CHIBEBA et al., 2015).

A parceria de pesquisa entre a Total Biotecnologia e a Embrapa resultou na produção do Azo Total Max, que é um inoculante promotor de crescimento de plantas, desenvolvido para a coinoculação da cultura da soja e do feijoeiro. Ele é composto pela bactéria da espécie *Azospirillum brasiliense*, que confere à planta uma série de benefícios, como produção de fitohormônios, resistência a doenças e a seca, entre outros. Este produto é totalmente compatível com os rizóbios e é uma estratégia, já aprovada pelo Mapa, de aumento de produção a baixo custo.

### **8.1.5. Taxonomia de rizóbios**

No século XIX, Beijerinck (1888) isolou e cultivou bactérias de nódulos radiculares e propôs-lhes o nome *Bacillus radicumicola* a estes microrganismos. Inicialmente, os pesquisadores consideravam o rizóbio uma espécie única, capaz de nodular todas as leguminosas. Nos anos seguintes, algumas modificações foram feitas na nomenclatura do rizóbio:

- Frank (1889) substituiu o nome *Bacillus radicumicola* para *Rhizobium leguminosarum*.

- Em 1898 surgiu a primeira fábrica de inoculante nos Estados Unidos.
- Löhnis e Hansen (1921) propuseram a divisão do rizóbio em dois grupos de acordo com a taxa de crescimento em meio de cultura. O termo rizóbio de crescimento rápido passou a referir-se às bactérias associadas a alfafa, trevo, feijão e ervilha. As bactérias de crescimento lento foram exemplificadas pelas bactérias de soja e caupi.
- Fred et al. (1932) reconheceram pelo menos seis espécies do gênero *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* e *R. lupini*), baseando-se nos hospedeiros e em algumas diferenças morfológicas e fisiológicas das bactérias. Nenhuma mudança nessa nomenclatura foi feita até 1982.
- A constatação de que cada estirpe ou isolado de rizóbio poderia nodular um grupo específico de hospedeiros levou ao conceito de inoculação cruzada, com as leguminosas sendo agrupadas de acordo com o rizóbio com o qual elas formavam nódulos. Mais de 20 grupos de inoculação cruzada foram identificados, com as bactérias do grupo do trevo, alfafa, feijão, tremoço, ervilha e soja, sendo denominadas como espécies separadas de um único gênero *Rhizobium* (ex: *R. trifolii* para trevo). Embora a especificidade ainda seja um ponto importante na identificação do rizóbio, outras características passaram a ter maior importância na sua classificação, por diferentes razões:
- Os estudos iniciais envolveram principalmente leguminosas de importância agrícola. Estudos com leguminosas menos tradicionais tornaram obscuros os limites da inoculação cruzada.
- A estirpe bacteriana NGR234, originalmente isolada de *Lablab purpureus*, o feijão-lablabe, forma nódulos com diferentes espécies de leguminosas e com uma espécie não-leguminosa (*Parasponia andersonii*) (STANLEY; CERVANTES, 1991).
- Em alguns gêneros, tais como *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, o plasmídeo pSym concentra a maioria dos genes requeridos para a nodulação e fixação

de nitrogênio (DING et al., 2013). A perda espontânea ou induzida destes plasmídeos, por algum fator, resulta em perda da capacidade de nodulação da bactéria, prejudicando a sua identificação. O genoma de *Rhizobium tropici*, por exemplo, inclui vários plasmídeos e, em um deles, o plasmídeo simbiótico (pSym), estão os genes necessários à nodulação e FBN. Em *Bradyrhizobium*, a informação genética para a simbiose encontra-se no DNA cromossomal, o que torna as espécies desse gênero mais estáveis, podendo explicar, dentre outros fatores, o êxito da biofertilização em soja.

- Os novos métodos taxonômicos desenvolvidos para comparar estirpes, com base em diferentes características, resultaram em agrupamentos cada vez mais distantes daqueles baseados na capacidade específica da bactéria para nodular a planta hospedeira.
- Diante das limitações da infecção da planta como o maior determinante taxonômico, outros caminhos começaram a ser trilhados para melhor catalogar os rizóbios. A taxonomia numérica reforçou as diferenças entre os grupos de rizóbio de crescimento rápido e lento e levou à consolidação de algumas espécies dentro de cada grupo. Em 1984, dois gêneros foram descritos: *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Três espécies foram nomeadas para o gênero *Rhizobium*: *R. loti*, *R. meliloti* e *R. leguminosarum*, com três biovares, *viceae*, *phaseoli* e *trifolii*. O gênero *Bradyrhizobium* compreendeu todas as estirpes de crescimento lento; somente uma espécie foi nomeada: *B. japonicum*, o microssimbionte de soja. Todas as outras estirpes de crescimento lento foram descritas como *Bradyrhizobium* spp., ou seja, o chamado grupo caupi ou bradirizóbios tropicais.

Atualmente, os rizóbios são divididos em vários gêneros, que são classificados como: *Rhizobium*, *Ensifer* (inicialmente *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Nos últimos anos, além das bactérias tradicionalmente conhecidas como rizóbios, foram identificados novos gêneros como simbiontes de leguminosas. Estes incluem, entre outros, os gêneros *Aminobacter*, *Microvirga*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* e *Shinella* pertencentes às  $\alpha$ -Proteobactérias (‘Alfa-rizóbios’) (WILLEMS, 2006) e *Burkholderia* e *Cupriavidus* pertencentes às  $\beta$ -Proteobactérias (‘Beta-rizóbios’) (MOULIN et al., 2001).

Abaixo são comentadas algumas características relativas aos gêneros de rizóbio. Muitas das espécies citadas a seguir podem já ter sido, ou não, renomeadas. O número de publicações descrevendo novas espécies isoladas de nódulos de leguminosas cresceu de forma vertiginosa nos últimos anos e, apenas no sentido de ilustração, alguns nomes são apresentados.

### **Gênero *Rhizobium***

Nas últimas décadas o número de espécies bacterianas, identificadas e catalogadas, capazes de fixar N<sub>2</sub>, quando em simbiose com leguminosas, aumentou quase que exponencialmente (LINDSTRÖM et al., 2010). A taxonomia de rizóbios que nodulam *Phaseolus vulgaris* foi a que passou por maiores alterações taxonômicas desde a descrição do *Rhizobium phaseoli*, baseada unicamente na habilidade da bactéria em nodular seu hospedeiro.

Do ano de 2001 até os dias de hoje, várias espécies novas de *Rhizobium* foram isoladas, dentre as quais podem ser citadas: *R. multihospitium*, *R. helanshanense*, *R. qilianshanense*, *R. paranaense* e *R. acidisoli* (SHAMSELDIN et al., 2017). Algumas espécies como *R. galegae*, *R. vignae*, *R. huautlense* e *R. alkalisoli* foram renomeadas no gênero *Neorhizobium* gen. nov. (MOUSAVI et al., 2014).

### **Gênero *Sinorhizobium* (*Ensifer*)**

Este gênero foi originalmente proposto por Chen et al. (1988) para incluir *Rhizobium fredii*, a então nova espécie *Sinorhizobium xinjiangense* e, posteriormente, a espécie *Rhizobium meliloti*. Dois biovares foram propostos para a espécie *S. meliloti*: *S. meliloti* bv. *medicaginis* e *S. meliloti* bv. *meliloti*, que são eficientes na fixação simbiótica em *M. laciniata* e *M. sativa*, respectivamente (CARMEN VILLEGAS et al., 2006). Este gênero inclui ainda as espécies *S. saheli* e *S. teranga* (LAJUDIE et al., 1994). Estas últimas espécies foram divididas em bv. *sesbaniae* e bv. *acaciae*, que compreendem as estirpes que nodulam *Sesbania* e *Acacia*, respectivamente. Espécies adicionais incluem: *S. abri* (OGASAWARA et al., 2003), *S. mexicanum* e *S. chiapanecum* (RINCÓN-ROSALES et al., 2008).

Muitas das bactérias nomeadas no gênero *Sinorhizobium* foram renomeadas para o gênero *Ensifer*. Entretanto, algumas argumentações ainda continuam a serem feitas sobre a adequabilidade de se utilizar o nome *Ensifer* ao invés de *Sinorhizobium* (LI et al., 2011; WANG et al., 2013). Conforme disposto por Li et al, até 2011, onze espécies de *Sinorhizobium* tinham sido descritas e nove foram reclassificadas para o gênero *Ensifer*. O nome *Ensifer sojae* foi proposto para estirpes bacterianas isoladas de nódulos de soja cultivada em solos salinos e alcalinos (LI et al., 2011). Nova espécie associada a *Glycine* spp. foi posteriormente nomeada *Ensifer glycinis* (YAN et al., 2016).

### **Gênero *Mesorhizobium***

O gênero *Mesorhizobium* foi proposto para cinco espécies de *Rhizobium* que são filogeneticamente relacionadas e diferentes do grande grupo filogenético que inclui *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Sinorhizobium* (JARVIS et al., 1997). Wang et al. (1999) descreveram e propuseram uma espécie nova, *M. amorphae*, após intensiva análise de rizóbios isolados de *Amorpha fruticosa*, na China. Esta espécie de rizóbio contém plasmídeo simbiótico de 930 kb, ao contrário da maioria das outras espécies de *Mesorhizobium*, que, à exceção do *M. huakuii* (JARVIS et al., 1997), carregam os genes simbióticos em seus cromossomos. Outras espécies incluem: *M. loti*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. huakuii*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum*, *M. temperatum*, *M. septentrionale*, *M. gobiense*, *M. tarimense*, *M. shangrilense*, *M. robiniae* (LARANJO et al., 2014). *M. shonense*, *M. hawassense* e *M. abyssinicae* foram isoladas de nódulos de raízes de árvores leguminosas (DEGEFU et al., 2013).

### **Gênero *Azorhizobium***

A única espécie nomeada neste gênero era a *Azorhizobium caulidonans*, que nodula caule e raízes de *Sesbania rostrata*. As estirpes que nodulam o caule de *Sesbania* diferem dos rizóbios de crescimento rápido por terem um único flagelo lateral e por serem incapazes de utilizarem muitos dos carboidratos comumente metabolizados pelos rizóbios. Rizóbios isolados de

nódulos de *Sesbania virgata*, em 2006, foram nomeados *A.doebereineriae* (MOREIRA et al., 2006). Em 2013 uma nova espécie de *Azorhizobium* foi descrita e nomeada *A. oxalatiphilum* (LANG et al., 2013).

### **Gênero *Bradyrhizobium***

Este gênero era inicialmente composto por apenas uma espécie, *B. japonicum*, isolada a partir de nódulos de raízes de soja. Já a partir da década de 80, vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum*, o que levou Kuykendall et al. (1992) a sugerir a subdivisão de *Bradyrhizobium em duas espécies*, *B. japonicum* e *B. elkanii*. Outras espécies incluem: *B. pachyrhizi*, *B. jicamae*, *Bradyrhizobium huanghuaihaiense*, *Bradyrhizobium daqingense*, *Bradyrhizobium ganzhouense*, *B. valentinum* (DURÁN et al., 2014). *B. manausense* e *B. ingae* foram isoladas de nódulos de feijão-caupi e da árvore conhecida como ingá, respectivamente (SILVA et al., 2014). Em 2016, quatro novas espécies oriundas de solos de diferentes regiões brasileiras foram nomeadas *Bradyrhizobium brasilense*, *Bradyrhizobium forestalis*, *Bradyrhizobium piauiense* e *Bradyrhizobium neoglycine* (COSTA, 2016).

### **Gêneros não tradicionais de rizóbio**

Bactérias do gênero *Burkholderia* (Tabela 10) já foram isoladas de nódulos de *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum* (MOULIN et al., 2001), de nódulos de *Mimosa caesalpiniiifolia* (CHEN et al., 2008) e de nódulos de *Mimosa bimucronata* e *Mimosa scabrella* (CHEN et al., 2007). Espécies do gênero *Ralstonia* (*Ralstonia taiwanensis* (renomeada *Cupriavidus*) e *Ralstonia eutropha* foram isoladas de nódulos de *Mimosa*, na China (CHEN et al., 2001) e na Índia (TRIPATHI, 2002), respectivamente. Na Espanha, *Phyllobacterium trifolii* foi isolada de nódulos de *Trifolium pratense*. A *P. trifolii* é também capaz de formar nódulos em *Lupinus* spp. (VALVERDE et al., 2005). Na Espanha, a espécie *Ochrobactrum cytisi*, foi isolada de *Cytisus scoparius* (ZURDO-PIÑEIRO et al., 2007).



**Tabela 10.** Espécies de *Burkholderia* isoladas de nódulos de leguminosas.

Espécies de <i>Burkholderia</i>	Hospedeiro
<i>Burkholderia tuberum</i>	Leguminosas tropicais
<i>Burkholderia phymatum</i>	Leguminosas tropicais
<i>Burkholderia nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i> , <i>Mimosa scabrella</i>
<i>Burkholderia sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
<i>Burkholderia mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>Burkholderia symbiotica</i>	<i>Mimosa</i> spp.

Fonte: Descritas em Sheu et al. (2012).

## 8.2. Fixação de nitrogênio em plantas actinorrízicas

As plantas actinorrízicas são arbustos ou árvores que habitam os mais diversos ecossistemas e se adaptam a condições ambientais extremas, como solos salinos, terrenos pantanosos e ambientes polares (SANTI et al., 2013). Elas desenvolvem simbiose com estirpes de actinobactérias multicelulares, Gram-positivas, do gênero *Frankia*, da família Frankiaceae, resultando na formação de nódulos fixadores de nitrogênio. Tal microrganismo é também capaz de fixar N<sub>2</sub> em vida livre sob condições aeróbias. Nenhuma das espécies hospedeiras de *Frankia* são plantas de interesse agrícola, mas apresentam importância econômica como produtoras de madeira, lenha e são também de interesse silvícula. Outro aspecto que ressalta a importância ecológica das plantas actinorrízicas é a taxa de fixação de nitrogênio que é igual ou mais alta que nas leguminosas (BUSSE, 2000). Paschke et al. (1989), por exemplo, relataram que as taxas de acumulação de nitrogênio em plantações de *Alnus* variou de 60 a 320 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

Pelo menos duzentas e vinte espécies de angiospermas, pertencentes a oito gêneros e distribuídas em oito famílias, formam nódulos radiculares fixadores de nitrogênio com espécies de *Frankia*. Tal fato mostra a grande diferença entre a simbiose actinorrízica e a simbiose conduzida pelos rizóbios,

em que os gêneros hospedeiros, em sua maioria, pertencem à família das Leguminosae (SANTI et al., 2013).

Os nódulos actinorrízicos são perenes e têm a forma de estruturas coraloides com muitos lóbulos. Cada lóbulo é uma raiz lateral modificada. Os tamanhos dos nódulos variam com a planta e é muito comum encontrá-los com dimensões que vão de 3 a 5 cm de diâmetro.

As actinobactérias do gênero *Frankia* produzem um micélio vegetativo composto de filamentos septados, onde é encontrada a vesícula, uma célula esférica de parede grossa, que é o sítio da fixação de nitrogênio. A vesícula madura é circundada por um envelope de lipídeos que parece funcionar como uma barreira à difusão de oxigênio, protegendo a enzima nitrogenase da inativação por aquela molécula. Ao contrário da maioria das plantas actinorrízicas, o microrganismo *Frankia* encontrado em nódulos de *Casuarina* é desprovido de vesículas.

O microrganismo pode penetrar as raízes do macrossimbionte de forma intracelular, via cordão de infecção, ou intercelularmente, dependendo da planta hospedeira. A infecção intracelular ocorre em Betulaceae, Casuarinaceae e Myricaceae. Concomitantemente com a infecção do pelo radicular, são induzidas as divisões das células no córtex da raiz. O cordão de infecção cresce em direção às células corticais em divisão, onde, após a infecção, ocorre intensa ramificação das hifas de *Frankia*. Esta estrutura é denominada de pré-nódulo. Enquanto o pré-nódulo desenvolve, a formação de um nódulo primitivo é induzida no periciclo da raiz. As hifas no cordão de infecção crescem do pré-nódulo para o nódulo primitivo. Dependendo das espécies de plantas hospedeiras, mais de um nódulo primitivo pode ser formado para cada pré-nódulo. Na infecção intercelular, as hifas de *Frankia* penetram as raízes entre as células epidérmicas e colonizam o córtex da raiz (RACETTE; TORREY, 1989). Durante esta colonização, as raízes do córtex secretam determinadas substâncias que induzem a formação do nódulo primitivo no periciclo da raiz. As hifas de *Frankia* infectam as células primitivas do apoplasto por meio de intensa ramificação. A infecção intercelular ocorre em plantas hospedeiras das famílias Rhamnaceae, Elaeagnaceae e Rosaceae.

Para o isolamento das bactérias dos nódulos, os lóbulos devem ser desinfectados cuidadosamente e colocados em meio de cultura líquido ou sólido. O primeiro isolamento com sucesso de uma espécie de *Frankia* ocorreu em 1978, de nódulos de raízes de *Comptonia peregrina*. As estirpes de *Frankia* que são cultiváveis crescem lentamente em meio sólido, podendo levar de 3 a 7 dias para que a colônia seja visível (BENSON et al., 2011). Depois de um mês de incubação, as colônias ainda são pequenas. Como poucas cepas de *Frankia* são cultiváveis, aquelas que crescem em meio de cultura são mais saprofíticas ou possuem requerimentos nutricionais menos restritos, como as que ocorrem nas Betulaceae (*Alnus*). Até 2013, cerca de 200 estirpes de *Frankia* já haviam sido isoladas de plantas actinorrízicas (SANTI et al., 2013).

### 8.3. Fixação biológica do N<sub>2</sub> em cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria e incluem formas unicelulares e multicelulares filamentosas. Elas apresentam papel fundamental no processo de evolução da vida na terra, uma vez que foram os primeiros organismos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica. A produção de oxigênio pelas cianobactérias foi responsável pela oxidação da atmosfera terrestre há 2,2 - 2,4 bilhões de anos e contribuíram substancialmente para a produção primária durante a Era Proterozóica (KNOLL, 2008). O modo nutricional dominante é o autotrófico. Elas são amplamente distribuídas em diversos ambientes, aquáticos e terrestres, e apresentam adaptações para colonizar habitats desfavoráveis.

Além de realizar a fotossíntese oxigênica as cianobactérias também fixam o N<sub>2</sub> atmosférico, que são os dois principais processos para a manutenção da vida na terra. As cianobactérias diazotróficas podem ser de vida livre ou simbióticas. Esta associação ocorre em angiospermas (gênero *Gunnera*), gimnosperma (gêneros *Cycas*, *Macrozamia* e *Ceratozomia*), pteridófitas (*Azolla*, Figura 23) e briófitas (gêneros *Anthosceros*, *Blasia*, *Cavicularia* e *Sphagnum*) (Tabela 11).



**Figura 23.** *Azolla filiculoides*.

**Tabela 11.** Organismos que formam simbiose com cianobactérias fixadoras de nitrogênio.

Organismos do Domínio <i>Eukarya</i>	Gênero da planta	Cianobionte
Angiosperma	<i>Gunnera</i>	<i>Nostoc</i>
Gimnosperma	<i>Cycas</i> , <i>Macrozamia</i> e <i>Ceratozomia</i>	<i>Nostoc</i>
Pteridófita	<i>Azolla</i>	<i>Anabaena</i>
Briófita	Diversos gêneros ( <i>Blasia</i> , <i>Porella</i> etc)	<i>Nostoc</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Chlorogloeopsis</i>

Fonte: Adaptado de RAI et al. (2000), com modificações.

As espécies de cianobactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico o fazem por meio de células especializadas, denominadas heterocistos (Figura 24). Estas estruturas tem a função de fornecer ambiente microaeróbico adequado para a nitrogenase e suprir o N combinado para as células vegetativas no resto do filamento. Os heterocistos são células tipicamente maiores do que as células vegetativas e possuem envoltório celular mais espesso, com duas

camadas adicionais, que limitam a difusão de oxigênio para o ambiente intracelular, protegendo a enzima nitrogenase dos efeitos danosos daquela molécula. Os heterocistos compreendem cerca de 5-10 % das células de um filamento. Em algumas cianobactérias filamentosas não heterocitadas, a nitrogenase está confinada a um tipo específico de células, os diazocitos (BERMAN-FRANK et al., 2001).

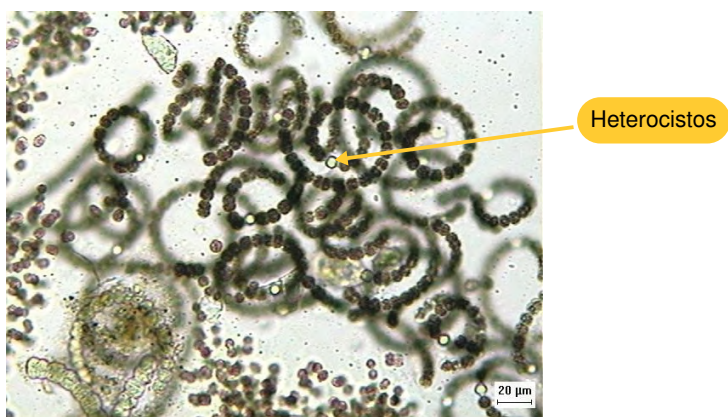


Foto: Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

**Figura 24.** Filamentos de cianobactérias (*Dolichospermum circinale* Rabenhorst ex Bornet & Flahault) mostrando os heterocistos especializados na fixação biológica do  $N_2$ .

Associações simbióticas com pteridófitas são limitadas ao gênero *Azolla*, que é uma pequena samambaia aquática flutuante. Ela vem sendo explorada como fonte de nitrogênio para a agricultura na forma de adubo verde ou de biofertilizante para o arroz. Este tipo de tecnologia pode suprir todo o nitrogênio requerido no cultivo de arroz em solo alagado, como os que ocorrem na China, Índia e Vietnã (NIERZWICKI-BAUER, 1990). O N é liberado da *Azolla* no ambiente externo após a sua decomposição e mineralização.

A maior parte das associações da *Azolla* com as cianobactérias ocorre com espécies dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*. As cianobactérias fixadoras de nitrogênio são abrigadas na cavidade foliar do vegetal, localizada no lóbulo dorsal das folhas (ZHENG et al., 2009). Estes simbiontes permanecem associados com o hospedeiro ao longo de seu ciclo de vida.

A *Azolla* foi utilizada por séculos para enriquecer campos de arroz com o nitrogênio fixado.

- As primeiras menções da *Azolla* parecem estar em um antigo dicionário chinês que apareceu há cerca de 2000 anos.
- A *Azolla* já era usada, por volta do século XI, no Vietnã.
- Na década de 1980, houve interesse renovado nesta associação simbiótica em decorrência da demanda por uma tecnologia agrícola menos dependente de energia fóssil.

O desenvolvimento da simbiose ocorre a partir de uma primorosa comunicação entre os dois simbioss, que resulta na conversão de filamentos em hormogônio que funcionam como elementos de infecção (MEEKS, 1998). Esses hormogônios são filamentos deslizantes, curtos e com células menores que as células dos filamentos vegetativos. Após entrar no hospedeiro, os hormogônios revertem-se novamente para filamentos com heterocistos capazes de fixar o  $N_2$ .

O nitrogênio fixado dentro do heterocisto como amônia é primeiro convertido para glutamina, pela enzima sintetase da glutamina e, na forma de aminoácido é transportado para as células vegetativas adjacentes. Em troca, carboidratos, provavelmente sacarose, fluem das células vegetativas para os heterocistos. A sintase da sacarose ou, talvez, sintase da sacarose fosfato (PORCHIA et al., 1996), está presente em alta atividade, especificamente, nas células vegetativas, enquanto a invertase alcalina, que converte sacarose para glicose, é restrita aos heterocistos. As hexoses resultantes da quebra da sacarose são catabolizadas nos heterocistos e fornecem agentes redutores para a nitrogenase.

Filamentos de *Anabaena* ou *Nostoc*, quando crescem na presença de uma fonte de nitrogênio combinado, tal como  $NH_4^+$  ou  $NO_3^-$ , podem apresentar somente células vegetativas indistinguíveis umas das outras. No entanto, quando a fonte de N é removida, os heterocistos aparecem dentro de uma a duas gerações celulares, ao longo do filamento, a intervalos relativamente regulares. Os heterocistos parecem ser os únicos locais de fixação de  $N_2$  dentro dos filamentos, à exceção do que ocorre com a espécie *Anabaena variabilis* estirpe ATCC 29413 (e umas poucas estirpes intimamente relacionadas), que expressa uma nitrogenase específica de célula vegetativa sob condições anóxicas (THIEL et al., 1995).

### **8.3.1. Características morfológicas das cianobactérias no estado de crescimento simbiótico**

A autosuficiência das cianobactérias formadoras de heterocistos, em relação à fixação do  $N_2$ , pode ser responsável pelas estruturas de plantas relativamente simples, que abrigam estes organismos, em contraste com aquelas que abrigam os rizóbios. Infecção por rizóbios induz na planta a formação de nódulos, enquanto as estruturas dos hospedeiros habitadas pelas cianobactérias existem mesmo na ausência da simbiose, embora algumas transformações na organização simbiótica final sejam dependentes do processo de infecção. Os rizóbios, dentro dos nódulos das leguminosas, se diferenciam em bacteroides, uma forma não existente no seu ambiente de crescimento fora da planta. A morfologia das células de algumas cianobactérias é também afetada pelas associações simbióticas, mas, ao contrário dos rizóbios, as suas diferenças estão mais na proporção ou medida de suas células. As células vegetativas das cianobactérias, dentro de alguns hospedeiros, são quatro vezes maiores que as células vegetativas de cianobactérias de vida livre, assim como o são também os heterocistos. Estas estruturas existem nas cianobactérias de vida livre, mas não na frequência com que elas são encontradas quando estes microrganismos estão associados às plantas (MEEKS; ELHAI, 2002).

### **8.4. Fixação biológica do $N_2$ em diazotrofos associativos**

Os diazotrofos associativos são microrganismos que contribuem para o crescimento da planta, colonizando tanto a superfície quanto o interior das raízes, sem a formação de estruturas diferenciadas. Espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola, como as gramíneas (Tabela 12). Estas bactérias têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas, desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* da rizosfera de cana-de-açúcar por Döbereiner e Ruchel (1958).

**Tabela 12.** Espécies de bactérias diazotróficas associativas e seus respectivos hospedeiros.

Espécies bacterianas	Hospedeiro de onde as bactérias foram isoladas	Fonte
<i>A.lipoferum</i>	Arroz, cana-de-açúcar	Tarrand et al. (1978)
<i>H.seropedicae</i>	Milho, sorgo, cana-de-açúcar, arroz, várias plantas forrageiras	Baldani et al. (1986)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Arroz	Fujii et al. (1987)
<i>E. cloacae</i>	Arroz	Fujii et al. (1987)
<i>A.halopraeferans</i>	<i>Leptochloa fusca</i> (L.) Kunth	Reinhold e Hurek (1987)
<i>G.diazotrophicus</i>	Cana-de-açúcar, café, <i>Eleusine coracana</i> , <i>Ananas comosus</i>	Cavalcante e Döbereiner (1988)
<i>A.amazonense</i>	Sorgo	Pereira et al. (1988)
<i>A.irakense</i>	Arroz	Khammas et al. (1989)
<i>H.rubrisubalbicans</i>	Arroz, cana-de-açúcar	Baldani et al. (1996)
<i>A. halopraeferens</i>	<i>Leptochloa fusca</i>	Reinhold et al. (1987)
<i>B. vietnamiensis</i>	Arroz	Tran Van et al. (2000)
<i>A. brasiliense</i>	Arroz, cana-de-açúcar, trigo	Tarrand et al. (1978)
<i>Pseudomonas spp.</i>	Coqueiro	Fernandes et al. (2001)
<i>G. azotocaptans</i>	Café	Fuentes-Ramírez et al. (2001)
<i>G. johannae</i>	Café	Fuentes-Ramírez et al. (2001)
<i>H. frisingense</i>	<i>Spartina pectinata</i> , <i>Miscanthus sinensis</i> , <i>Miscanthus sacchariflorus</i> , <i>Pennisetum purpureum</i>	Kirchhof et al. (2001)
<i>B. tropica</i>	Milho	Reis et al. (2004)
<i>B. unamae</i>	Milho, cana-de-açúcar, café	Caballero-Mellado et al. (2004)
<i>A.melinis</i>	<i>Melinis minutiflora</i> Beauv	Peng et al. (2006)
<i>A. oryzae</i>	Arroz	Xie e Yokota (2006)
<i>B. silvatlantica</i>	Milho, cana-de-açúcar	Perin et al. (2006)
<i>S. azotifigens</i>	Arroz	Xie e Yokota (2006)
<i>G. kombuchae</i>	Kombuchá	Dutta e Gachhui (2007)
<i>A. canadense</i>	Milho	Mehnaz et al. (2007a)
<i>A. zeae</i>	Milho	Mehnaz et al. (2007b)
<i>B. phenoliruptrix</i>	<i>Mimosa flocculosa</i>	Zuleta et al. (2014)

A., *Azospirillum*; H., *Herbaspirillum*; G., *Gluconacetobacter*; E., *Enterobacter*; B., *Burkholderia*, S., *Sphingomonas*



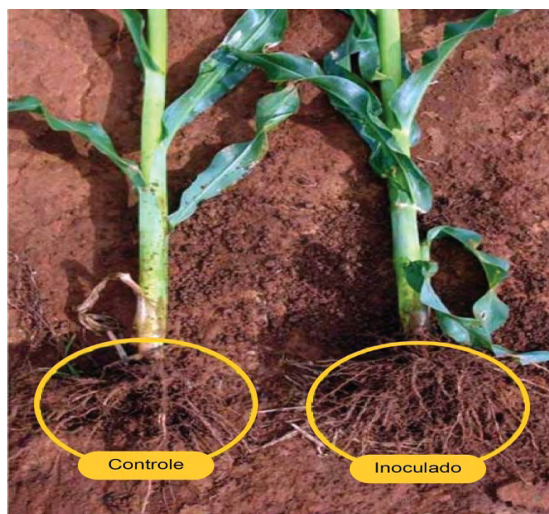
Na fixação biológica associativa de  $N_2$ , as bactérias podem ser classificadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1997). No primeiro grupo estão envolvidos todos os microrganismos que colonizam a superfície das raízes. Os endofíticos facultativos são as bactérias que colonizam a superfície e o interior das raízes, enquanto os endofíticos obrigatórios colonizam o interior de raízes e tecidos aéreos de plantas (Tabela 13).

**Tabela 13.** Classificação de algumas bactérias fixadoras de  $N_2$  com relação à região da planta que é colonizada.

Espécie bacteriana	Região da planta que é colonizada
<i>Azospirillum</i> spp. (exceto <i>A. halopraeferans</i> )	Endófito facultativo
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Endófito obrigatório
<i>Herbaspirillum</i> spp.	Endófito obrigatório
<i>Azoarcus</i> spp.	Endófito obrigatório
<i>Burkholderia</i> sp.	Endófito obrigatório

Fonte: Baldani et al. (1997).

Uma bactéria que tem sido alvo de muitos estudos é a *Azospirillum brasilense*. O efeito benéfico da inoculação de plantas com essa espécie é descrito em vários estudos (HUNGRIA, 2011b; SILVA, 2013) (Figura 25). É impossível dizer com certeza se os efeitos observados (quando há) são decorrentes da fixação do  $N_2$  associada à planta, ou a fatores, como efeitos hormonais e aumento na absorção de N do solo, em decorrência do maior crescimento das raízes, induzido pelas bactérias. Segundo Didonet et al. (2000) a inoculação de *Azospirillum* em plantas de trigo provocou aumento significativo de raízes devido, possivelmente, à produção de fitohormônios, principalmente auxinas, produzidos pelas bactérias.



**Figura 25.** Efeito da inoculação de milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* no crescimento radicular em ensaios conduzidos a campo. Fonte: Hungria (2011b).

Garcia de Salamone et al. (1996) mostraram que alguns genótipos de milho cultivados em vasos apresentaram aumento significativo no conteúdo de N e rendimento de grãos, após inoculação com *Azospirillum brasilense*. Na Argentina, um levantamento feito em 273 ensaios de inoculação com *A. brasilense* demonstrou que em 76 % dos casos houve aumento médio na produtividade de trigo de 256 kg ha<sup>-1</sup> e, em 85 % dos casos, ocorreu um aumento médio na produtividade do milho de 472 kg ha<sup>-1</sup> (DÍAZ-ZORITA; FERNANDEZ CANIGIA, 2008). Do mesmo modo Mazzuchelli et al. (2014) observaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* em sementes de milho aumentou a produção do grão em 21,9 %, em relação ao controle. Outros estudos conduzidos em casa-de-vegetação e a campo também demonstraram efeitos positivos da inoculação com espécies de *Azospirillum* na cultura do trigo (GANGULY et al., 1999), do arroz (BALANDREAU et al., 2002) e da cana-de-açúcar (SHANKARIAH; HUNSIGI, 2001). Lipório et al. (2015) associou os efeitos benéficos da inoculação de sementes com *A. brasilense* a uma redução da adubação nitrogenada em 50 %. Trabalho

conduzido por Hungria et al. (2010) demonstrou que a inoculação do milho com estirpes de *Azospirillum*, sob condições de campo, aumentou o seu rendimento em 24-30 %, em relação ao controle não inoculado. Para o trigo o aumento foi de 13-18 %.

Grande variedade de bactérias diazotróficas já foi isolada da rizosfera e endorizosfera de cana utilizando meios de cultura sem o nitrogênio. Um dos trabalhos pioneiros e relevantes sobre a contribuição da FBN para gramíneas foi realizado por Urquiaga et al. (1992). Neste estudo os autores descobriram, por meio de técnicas isotópicas de  $^{15}\text{N}$ , que algumas variedades de cana-de-açúcar poderiam obter cerca de 60 % do N necessário para o seu desenvolvimento, por meio da associação com bactérias endofíticas.

Embora a *Gluconacetobacter diazotrophicus* e a *Herbaspirillum* spp. pareçam ser as bactérias isoladas em maior número na cana, é impossível atribuir a fixação do  $\text{N}_2$  a qualquer bactéria específica, uma vez que não se conhece a correlação entre o número de bactérias diazotróficas e a sua capacidade para fixar  $\text{N}_2$  (JAMES; OLIVARES, 1998). Urquiaga et al. (2012) relataram uma contribuição do N derivado da FBN variando de 29 a 68 %, em variedades de cana-de-açúcar comerciais. Segundo Pereira et al. (2013), algumas variedades de cana, quando inoculadas, chegam a acumular mais matéria seca do que em tratamento com uso de fertilizante nitrogenado. Os efeitos positivos da inoculação da cana com bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$ , além de variarem com o genótipo da planta, é também dependente do tipo de solo e das condições ambientais (OLIVEIRA et al., 2006; URQUIAGA et al., 1995). Este processo também depende de condições ótimas de suprimento de água, disponibilidade de P, K e micronutrientes, principalmente, o molibdênio.

A Embrapa Agrobiologia lançou em 2008 o primeiro inoculante contendo bactérias diazotróficas para utilização na cana-de-açúcar. O inoculante é uma mistura de estirpes de cinco espécies bacterianas isoladas daquela cultura (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) (Figura 26).



Foto: Verônica Massena Reis

**Figura 26.** Cana-de-açúcar sem adubo biológico a esquerda e com adubo biológico a direita. Embrapa Agrobiologia.

### **8.4.1. Características dos gêneros bacterianos diazotróficos associativos**

#### ***Azospirillum***

O gênero *Azospirillum* foi descrito por Tarrand et al. (1978) e situado no Domínio Bacteria na subdivisão  $\alpha$ -Proteobacteria. Espécies de *Azospirillum* são heterotróficas aeróbias, que fixam  $N_2$  sob condições microaeróbias. O gênero possui atualmente pelo menos quatorze espécies identificadas: *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983); *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987); *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989); *A. largomobile* (DEKHIL et al., 1997); *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2006); *A. melinis* (PENG et al., 2006); *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007); *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. doebereineriae*, *A. zaeae*, *A. rugosum* e *A. agrícola* (LIN et al., 2016)

A distribuição ecológica de *Azospirillum* spp. é extremamente ampla, podendo ser considerada uma bactéria universal que coloniza plantas em diferentes *habitats*. Essas bactérias podem penetrar nas raízes para crescer endofiticamente em ambientes intercelulares. Embora a primeira espécie do grupo a ser isolada foi *Azospirillum lipoferum*, a *Azospirillum brasilense* é melhor caracterizada em nível fisiológico e molecular. Existe ainda uma carência de informações sobre os mecanismos envolvidos na interação

planta-bactéria e como a bactéria contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas.

### ***Gluconacetobacter***

O gênero *Gluconacetobacter* pertence à classe  $\alpha$ -Proteobacteria. Das 16 espécies, pelo menos, já descritas, em torno de quatro são capazes de fixar nitrogênio. *Gluconacetobacter* (inicialmente *Acetobacter*) *diazotrophicus* era considerada uma bactéria endofítica associada somente com cana-de-açúcar e a outras duas plantas que acumulam sacarose. Posteriormente, ela foi encontrada em associação com outros hospedeiros como: *Coffea arabica*, *Eleusine coracana* e *Ananas comosus*. Além de fixar nitrogênio atmosférico, *Gluconacetobacter diazotrophicus* produz hormônios de crescimento, como o ácido indol acético (AIA); é tolerante a vários antibióticos, como estreptomicina, tetraciclina e rifampicina; e possui atividade antagonista aos patógenos *Xanthomonas albilineans* e ao fungo *Colletotrichum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY et al., 2000).

### ***Herbaspirillum***

As espécies deste gênero estão incluídas na classe  $\beta$ -Proteobacteria, são Gram-negativas, possuem representantes microaerofílicas, toleram drásticas mudanças de pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986). Estas bactérias foram isoladas de grande número de hospedeiros e muitas espécies já foram descritas: *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986); *H. rubrisulbalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. huttiense* subsp. *huttiense*, *H. hiltneri*, *H. rhizosphaerae*, *H. huttiense* subsp. *putei*, *H. canariense* e *H. soli* (revisto por MONTEIRO et al., 2012). *H. seropedicae* é a espécie melhor caracterizada e tem baixa taxa de sobrevivência em solos naturais. Em solos estéreis, ela é menos afetada, indicando que fatores bióticos interferem com a sua sobrevivência (BALDANI et al., 1997). As espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans* podem ser diferenciadas por meio do uso preferencial de diferentes fontes de C.

### **Burkholderia**

O gênero *Burkholderia* pertence à classe  $\beta$ -Proteobacteria. São bactérias Gram-negativas em forma de bastonetes móveis, com três a vários flagelos. O gênero *Burkholderia* compreende, pelo menos, 62 espécies capazes de fixarem  $N_2$  (<http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html>), incluindo *Burkholderia vietnamiensis*, *B. kururiensis*, *B. tuberum*, *B. phynatum*, *B. unamae*, *B. tropica* e *B. silvatlantica*. Esta última espécie foi isolada de raízes de cana-de-açúcar por Perin et al. (2006). A espécie *B. vietnamiensis* foi isolada da rizosfera de plantas de arroz cultivadas no Vietnã e, quando inoculada nesta cultura, pode ocasionar aumentos de 13–22% no rendimento de grãos (TRÂN VAN et al., 2000).

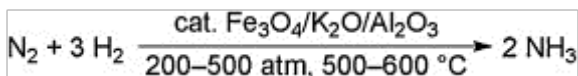
### **Azoarcus**

*Azoarcus* spp. foram originalmente isoladas como diazotróficos endofíticos na gramínea *Kallar*, que é uma planta  $C_4$  não domesticada, e amplamente encontrada em regiões tropicais e subtropicais (CHAUHAN et al., 2015). Este gênero pertence à classe  $\beta$ -Proteobacteria e à família Rhodocyclaceae e, embora compreenda pelo menos 7 espécies, somente 2 são capazes de fixar nitrogênio, ou seja, *Azoarcus indigens* e *Azoarcus communis*, que foram descritas em associação com *Leptochloa fusca* (L.) Kunth, no Paquistão. Posteriormente, *Azoarcus indigens* foi também isolada da cultura do arroz no Nepal. Enzimas como celulasas, exoglucanase e uma endoglucanase, sempre detectadas em *Azoarcus*, podem contribuir para o processo de infecção deste endófito na planta.

## **9. Ciclo do nitrogênio e seus efeitos no ambiente**

A produção em larga escala dos fertilizantes nitrogenados foi a principal alteração feita pelo homem no ciclo do N. Apesar desse nutriente já ter a sua essencialidade às plantas demonstrada por Saussure (1804), no século XIX, a ampla utilização de fertilizantes contendo N só foi possível com a descoberta da síntese química da amônia ( $NH_3$ ), pelo processo Haber-Bosch. Nesse processo, a amônia é formada a partir do hidrogênio proveniente

do gás natural e o N<sub>2</sub> do ar, sob altas temperaturas e pressão conforme a equação 16.



(Equação 16)

(cat: catalisador, substância que afeta a taxa de reação química sem fazer parte do produto final)

A reação envolvida no processo Haber-Bosch foi descoberta pelo cientista alemão Fritz Haber e patenteada no ano de 1908. Em 1910, a empresa BASF, na Alemanha, comprou a patente. Carl Bosch, engenheiro metalúrgico da empresa, conseguiu produzir a amônia em escala industrial. O processo Haber-Bosch foi considerado a mais importante reação química até então descoberta e, literalmente, mudou a agricultura mundial, aumentando a produtividade das culturas de forma extraordinária. Em 2013, a produção anual de amoníaco foi estimada em 140 milhões de toneladas, dos quais cerca de 80 % foram usados na indústria de fertilizantes (ESTADOS UNIDOS, 2017a) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Consumo mundial de fertilizantes nitrogenados por país.

País	Consumo mundial de fertilizantes (1000 t de nutriente)	
	2011	2013
Brasil	3366	3808
China	33800	35010
India	17300	16731
Estados Unidos	12231	11690
Paquistão	3209	3179
Canadá	2297	2457
Itália	568	594
Nigéria	334	415

Fonte: Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes (2016).



## Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

A produção de fertilizantes nitrogenados não apenas permitiu que o número de pessoas alimentadas aumentasse, mas também, associada à revolução verde, permitiu que a população mundial ultrapassasse, em 2012, a marca de 7 bilhões de habitantes. Sem a fixação industrial de nitrogênio, originada pelo processo Haber-Bosch, seria necessário um aumento de 225 % no espaço destinado ao cultivo agrícola para atender uma população estimada de 9,2 bilhões em 2050 (DAWSON; HILTON, 2011).

### Processo Haber-Bosch

Sir William Ramsay, um químico escocês, previu, em 1898, que o mundo poderia passar por uma grande catástrofe, em decorrência da escassez de fertilizantes nitrogenados, antevista para meados do século XX. Isto provocaria uma redução desastrosa na produção mundial de alimentos. Na época, o nitrogênio era obtido de depósitos naturais de nitratos de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e potássio ( $\text{KNO}_3$ ) ou de excrementos de aves marinhas (guanos). Sabe-se que o nitrogênio é um elemento diferenciado de outros, em decorrência da ausência de um reservatório potencialmente disponível nas rochas (ROBERTSON; VITOUSEK, 2009).

O trabalho do químico Fritz Haber e do engenheiro William Carl Bosch, ambos alemães, não permitiu que os fatos previstos por Ramsey ocorressem. Haber e Bosch criaram um processo no qual conseguiram sintetizar a amônia a partir de seus elementos constituintes.

Fritz Haber – criou o processo de produção de fertilizante nitrogenado em 1908.

Carl Bosch – tornou o processo mais seguro e permitiu a sua utilização em larga escala. A primeira indústria entrou em operação em 1913.

A produção industrial de  $\text{NH}_3$  serviu como base para a produção de vários fertilizantes nitrogenados (Figura 27) e teve um importante papel na produção de alimentos no mundo. Sem o processo Haber-Bosch, cerca da metade da população mundial estaria, hoje, sem condições de receber uma alimentação adequada. Isto fez com que este processo fosse considerado a mais importante invenção do século XX.

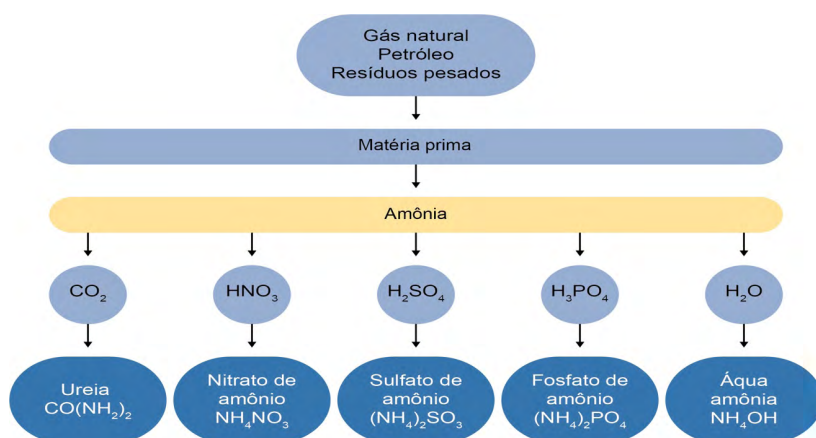


Figura 27. Fluxograma da produção de fertilizantes nitrogenados.



## Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

Apesar da grande importância do processo Haber-Bosch, a produção de amônia gera problemas em termos ambientais. Ela consome de 1 - 2 % do suprimento mundial de energia anual e gera mais de 300 milhões de TM de CO<sub>2</sub>, que é um gás de efeito estufa. A quantidade mundial de CO<sub>2</sub> emitida pode chegar a 1 % da quantidade liberada em atividades industriais, quando é considerado o transporte, o empacotamento e a aplicação dos fertilizantes (JENKINSON, 2001). Em decorrência disto, a possibilidade de produção de fertilizantes nitrogenados minerais a partir de fontes renováveis de energia tem sido amplamente discutida (FRATTINI et al., 2016).

### Produção de fertilizantes nitrogenados no Brasil

- A primeira fábrica de fertilizantes nitrogenados no Brasil começou a operar em 1963, em Cubatão, São Paulo.
- A produção interna de fertilizantes nitrogenados no ano de 2010 atendeu, aproximadamente, 24 % da demanda.
- O Brasil importa 75 % dos fertilizantes nitrogenados.

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado na agricultura mundial. Ele é produzido pela reação do CO<sub>2</sub> com a amônia anidra. O alto consumo da ureia é decorrente de sua maior concentração de N (44 - 46 %) na forma amídica, do baixo custo relativo, da alta solubilidade em água, da baixa corrosividade, da compatibilidade com um grande número de outros fertilizantes e defensivos e pela boa assimilação dos produtos de sua hidrólise (CANTARELLA et al., 2008). Apesar de a amida ser um composto orgânico, a ureia é considerada, de acordo com a Lei nº 6.894 de 16/12/1980, como fertilizante mineral, por ser obtido de forma sintética e por ser rapidamente solubilizada.

### Consumo global total de fertilizantes nitrogenados

1970 – 31 milhões de toneladas  
2000 – 82 milhões de toneladas  
2009 – excederam 102 milhões de toneladas (SNYDER; FIXEN, 2012)  
2050 – previsão de até 180 milhões de toneladas (BINDRABAN et al., 2015)

De 2001 a 2010, o uso global de ureia cresceu a uma taxa de 3,8 % ao ano. Estima-se que, até 2017, cinquenta e cinco novas fábricas de ureia serão abertas, com metade delas sendo construídas na China (HEFFER;

PRUD´HOMME, 2013). A produção de ureia neste país triplicou entre as décadas de 1989 para 1999, e hoje é responsável por, aproximadamente, um terço do consumo mundial de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

A ureia foi isolada da urina humana, em 1773, por Hillaire Rouelle, e foi a primeira molécula orgânica a ser sintetizada a partir de compostos inorgânicos, por Wöhler, em 1828.

O sulfato de amônio é a segunda fonte de fertilizante nitrogenado mais utilizada no Brasil. Este fertilizante, além de conter 23 % de N em sua composição, é uma importante fonte de enxôfre (23 %). Todavia, o seu elevado custo de produção por unidade de N e a sua baixa disponibilidade na forma granulada fazem com que a sua utilização na agricultura não apresente uma maior evolução (CANTARELLA, 2007). O nitrato de amônio é o terceiro fertilizante nitrogenado mais utilizado no Brasil e é constituído de 50 % N-nítrico e 50% N-amoniacal (Tabela 15).

**Tabela 15.** Percentagem de nitrogênio em alguns fertilizantes nitrogenados.

Fertilizante	N (%)
Amônia anidra	82
Ureia	45 - 46
Nitrato de amônio	34
Sulfato de amônio	20
Fosfato diamônico (DAP)	17
Nitrato de cálcio	14
Fosfato monoamônico (MAP)	11

O aumento do consumo de fertilizantes nitrogenados para obtenção de maiores produtividades das culturas (Figura 28 e Tabela 16) tem sido um assunto muito debatido por órgãos competentes, em decorrência dos problemas ambientais advindos do seu uso. A eficiência de utilização do N pelas plantas é baixa, o que substanciaria as suas perdas para o ambiente. Estas estariam relacionadas à volatilização da amônia ( $\text{NH}_3$ ), à lixiviação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e à emissão de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Todos estes processos serão discutidos adiante.

## Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas



**Figura 28.** Evolução do consumo aparente de N no Brasil.

Fonte: International Plant Nutrition Institute (2016).

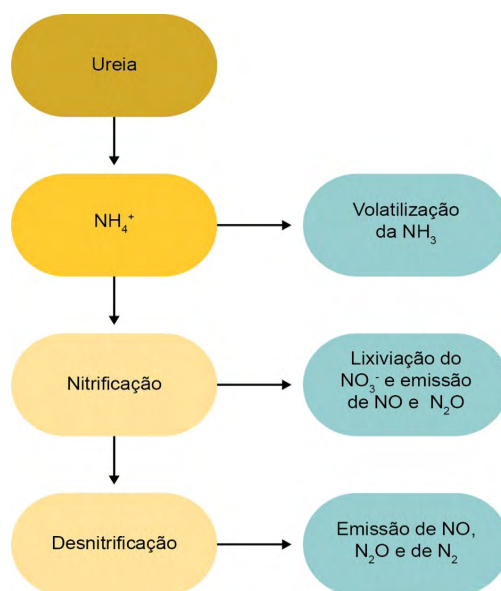
**Tabela 16.** Consumo de fertilizantes nitrogenados em alguns estados brasileiros, em 2009 e 2015.

Estados	Consumo de fertilizantes (em 1000 TM)	
	2009	2015
Mato Grosso	3.518.532	5.629.235
Paraná	3.136.468	3.903.517
Rio Grande do Sul	2.942.736	3.667.275
Minas Gerais	3.025.381	3.508.805
São Paulo	3.112.221	3.472.310
Bahia	1.440.693	1.761.957
Maranhão	364.685	531.293
Sergipe	70.285	89.535
Roraima	14.462	9.808
Acre	1.197	2.983

Fonte: International Plant Nutrition Institute (2016).

### 9.1. Volatilização da amônia (NH<sub>3</sub>)

A volatilização é a perda de nitrogênio na forma de amônia (NH<sub>3</sub>), que pode levar a uma baixa eficiência de utilização de fertilizantes nitrogenados. A amônia perdida por volatilização pode ser proveniente tanto do fertilizante aplicado quanto da mineralização da matéria orgânica (Figura 29).



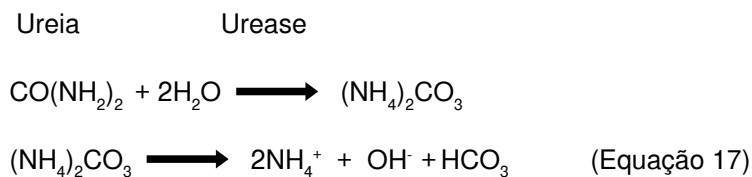
**Figura 29.** Processos de perdas de N no solo.

A ureia, quando aplicada na superfície do solo, é hidrolisada pela ação da enzima urease, e resulta na formação de carbonato de amônio, que se decompõe rapidamente originando amônio, bicarbonato e hidroxila. Essa rápida hidrólise consome íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) e provoca aumento localizado do pH do solo, nas regiões próximas aos locais de aplicação. Este aumento transitório do pH altera o equilíbrio entre o amônio e a amônia no solo. Quanto maior o pH na zona de aplicação, maior o potencial de volatilização da amônia (Figura 30).



Foto: Heitor Cantarella

**Figura 30.** Câmaras para medição da volatilização de amônia. (Instituto Agronômico de Campinas).



### Enzima urease

A presença da urease no solo foi detectada pela primeira vez por Rotini (1935). Posteriormente, surgiram os trabalhos publicados por Conrad (1940, 1942 e 1943).

Esta enzima é encontrada em bactérias, arqueias, fungos, algas, plantas e invertebrados.

Em tecidos vegetais, concentra-se, principalmente, nas sementes e raízes.

Possui níquel em seu sítio ativo.

A intensificação do uso de fertilizantes nitrogenados, nas últimas décadas, tem aumentado a emissão global de  $\text{NH}_3$  e provocado efeitos adversos nas mudanças climáticas globais, no ambiente e na saúde pública. Na atmosfera, a amônia possui um tempo de residência que varia entre uma e duas semanas.

Sua concentração é maior próximo ao seu local de origem, diminuindo rapidamente com a distância, devido à dispersão atmosférica e deposição seca (DRAGOSITS et al., 2002). Essa distância pode variar de poucos metros a alguns quilômetros. Quando, eventualmente, a amônia é transformada para amônio na atmosfera, por meio de reações químicas, ela pode ser deslocada por milhares de quilômetros até ser depositada, principalmente, pela precipitação. A amônia pode também reagir na atmosfera com óxidos de enxôfre para formar sulfato de amônio, que chega ao solo por meio da chuva, e causa acidificação. Embora a  $\text{NH}_3$  não tenha efeito direto no aquecimento global (GOOD; BEATTY, 2011), ela pode ser oxidada na atmosfera para  $\text{N}_2\text{O}$ , que é um gás de efeito estufa.

A deposição de  $\text{NH}_3$  em ecossistemas naturais afeta de forma negativa o balanço de nutrientes e a diversidade biológica (Tabela 17). Vegetação adaptada a baixos suprimentos de N tem o seu crescimento comprometido a favor de espécies que se desenvolvem, de forma mais vigorosa, com o aumento da disponibilidade daquele elemento (PITCAIRN et al., 2003). Pode também ocorrer decréscimo na resistência de plantas a doenças e a geadas.

**Tabela 17.** Estimativas de fontes e depósitos de amônia atmosférica.

Fontes e sorvedouros	Quantidade de amônia (Tg N ano <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>
Queima de combustíveis fósseis	2
Queima de biomassa	5
Superfície marinha	13
Resíduo de animal doméstico	32
Excremento humano	4
Emissões do solo	19
Deposição úmida	46
Deposição seca	10
Oxidação pelo radical OH	1

<sup>(1)</sup> Tg =  $10^{12}$  g; Fonte: Feliz e Cardoso (2004).

Todo fertilizante que tem como base o  $\text{NH}_4^+$  e a  $\text{NH}_3$  tem o potencial para sofrer perdas de N pelo processo de volatilização. Estas perdas podem atingir valores tão altos como 78 % do N aplicado e pode variar dependendo das práticas de manejo e condições ambientais (TASCA et al., 2011). No caso do arroz inundado, por exemplo, 20% a 80% do N do fertilizante podem ser perdidos por meio daquele processo (ZHU, 1992). Em solo cultivado com milho perdas de 78 % de  $\text{NH}_3$  podem ocorrer após a aplicação de fertilizante nitrogenado na superfície do solo (LARA CABEZAS et al., 1997). Por esta razão, a maioria dos estudos experimentais e inventários caracterizando as emissões de  $\text{NH}_3$  tem focado sobre fontes agrícolas (Figura 30).

A produção animal é responsável por grande parte da emissão de amônia para a atmosfera (MOSIER, 2001). Em decorrência da maior demanda pelo consumo de carne, o número de animais domésticos tem aumentado muito nos últimos anos. Por exemplo, embora entre 1960 e 2000 a população mundial tenha dobrado, o número daqueles animais triplicou (OENEMA, 2006). A amônia origina-se, principalmente, de áreas de confinamento de animais e de áreas de pastagem com intenso pastoreio de gado. O armazenamento e a utilização de esterco provenientes destes animais são também considerados fontes em potencial de  $\text{NH}_3$ . Picos de emissões deste gás podem ocorrer imediatamente após o espalhamento de esterco no solo, impactando de forma negativa a vegetação adjacente (DRAGOSITS et al., 2006).

Na avicultura de corte, a emissão de amônia pode influenciar de forma negativa tanto o ambiente onde os animais são criados como as comunidades urbanas próximas a eles. A origem deste gás está na decomposição do ácido úrico presente nas excretas das aves. Altas quantidades de amônia, nos ambientes produtivos de frangos de corte, podem predispor o animal a doenças respiratórias e outros desconfortos fisiológicos. No Brasil, não existem limites legais para a exposição de aves à amônia, mas alguns exportadores de carne de frango adotam o limite de exposição de, no máximo, 20 ppm. O controle das emissões de amônia, nestas circunstâncias, pode ser diminuído pela adição de alguns produtos químicos e pelo controle da umidade (MEDEIROS et al., 2008).

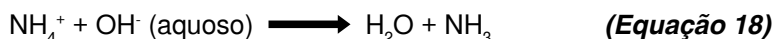
A amônia pode também ser volatilizada de instalações de criação de suínos. Ela origina-se da decomposição do nitrogênio orgânico das fezes,

urina e do resto de ração desperdiçada que fica no chão. Hoje, o controle da nutrição destes animais é uma forma de diminuir as emissões de  $\text{NH}_3$  (AARNINK; VERSTEGEN, 2007).

### **9.1.1. Fatores que afetam as emissões de amônia para a atmosfera**

#### ***pH do solo***

As concentrações relativas de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$  são determinadas pelo pH da solução do solo. Conforme descrito anteriormente, quando a ureia é aplicada no solo, a sua hidrólise, resultante da ação da urease, converte o  $\text{R-NH}_2$  para  $\text{NH}_4^+$ . Por consumir  $\text{H}^+$  do meio, essa reação promove a elevação do pH no micrositio abaixo do grânulo do fertilizante (SOMMER et al., 2004), favorecendo a desprotonação do  $\text{NH}_4^+$  à  $\text{NH}_3$ , que é a forma gasosa passível de ser perdida por volatilização. Esta elevação do pH decorrente da hidrólise da ureia, faz com que o aumento do teor de  $\text{NH}_3$  próxima ao grânulo e sua subsequente perda, ocorra mesmo em solo com pH ácido. Em solos alcalinos ou com  $\text{pH} > 7$  qualquer fertilizante nitrogenado que contém N amoniacal está sujeito a perdas de  $\text{NH}_3$  por volatilização (CANTARELLA, 2007). Em valores de pH abaixo de 7, quase todo o nitrogênio amoniacal está presente na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ).



#### ***Temperatura***

De forma geral, maiores emissões de amônia estão associadas a temperaturas mais elevadas, uma vez que nestas condições a hidrólise da ureia é maior. Conseqüentemente, este processo ocorre com maior intensidade entre as 10 h e 15 h. Nas temperaturas baixas de inverno, as perdas de N por volatilização podem ser menores de 5,5 % do N aplicado como ureia (VIERO et al., 2014). Portanto, o potencial de volatilização de  $\text{NH}_3$  é maior em regiões tropicais, principalmente nos cultivos de verão, do que em regiões subtropicais ou de clima temperado.



### ***Umidade do ar***

Esse fator é importante porque influencia na taxa de evaporação de água do solo. Se a umidade do ar estiver muito baixa, o solo pode secar antes que a hidrólise da ureia ocorra, diminuindo a perda do N por volatilização (SOMMER et al., 2004). Contudo, se o solo estiver seco e a umidade do ar for alta, haverá perda de  $\text{NH}_3$  devido à alta higroscopicidade da ureia (SOMMER, et al., 2004). A umidade relativa do ar está também relacionada à formação de orvalho, que em determinadas situações é suficiente para solubilizar o fertilizante e iniciar o processo de hidrólise enzimática.

### ***Sistema de preparo do solo e ocorrência de chuvas***

As perdas de N por volatilização de  $\text{NH}_3$  podem ser controladas ou significativamente reduzidas se a ureia for incorporada ao solo, tanto por meios mecânicos como pela água de chuva ou de irrigação (CANTARELLA, 2007). Os volumes de água considerados suficientes para a incorporação da ureia podem variar dependendo do tipo de manejo do solo. Enquanto em áreas de solo descoberto 10 a 20 mm de chuva ou irrigação sejam suficientes para incorporar a ureia no solo (HARGROVE, 1988), em áreas com plantio direto as quantidades podem ser bem maiores (FRENEY et al., 1994).

Nas práticas de plantio direto (PD) e/ou cultivo mínimo a aplicação de ureia sobre os resíduos vegetais mantidos no solo poderá contribuir para as perdas de N por volatilização (Tabela 18). Estas perdas estariam relacionadas à maior concentração e atividade da enzima urease (MOAL et al., 1995). Por outro lado, no PD, o maior estoque de matéria orgânica na superfície do solo pode aumentar a adsorção de  $\text{NH}_4^+$  impedindo a sua transformação para amônia (ROJAS et al., 2012). Entretanto, a magnitude das perdas de amônia decorrente da presença de resíduos vegetais é difícil de prever. Segundo da Ros et al. (2005) a presença de restos culturais de aveia na superfície do solo diminuiu as perdas de N por volatilização, uma vez que proporcionou maior umidade no solo, em comparação ao solo descoberto. Trabalho conduzido por Duarte (2007) demonstrou que a presença de restos de cultura de amendoim forrageiro aumentou a quantidade de amônia volatilizada das terras tratadas ou não com ureia, enquanto restos de cultura de cana-de-açúcar reduziram as

perdas de N por volatilização. Esse autor também relatou que a manutenção de restos de cultura de milho exerceu pouca influência nas perdas de  $\text{NH}_3$ . Rojas et al. (2012) não verificaram efeito de diferentes plantas de cobertura de solo que antecederam o cultivo do milho no processo de perdas de N por volatilização.

**Tabela 18.** Efeitos comparativos do sistema de preparo de solo na volatilização de amônia em áreas fertilizadas com ureia.

Cultura	Plantio direto	Plantio convencional	Referência
Milho	78 %	30,7 %	Lara Cabezas et al. (1997)
Estudo de laboratório	21 %	3,7 %	Rochette et al. (2009)
Milho	14 - 18 %	1 - 3 %	Rojas et al. (2012)

### ***Tipo de solo***

A emissão de amônia poderá ser menor em solo argiloso em decorrência do maior poder tampão da acidez do solo e à maior capacidade do solo em reter o amônio produzido pela hidrólise da ureia nos sítios de troca (CANTARELLA, 2007).

### ***Plantas***

As plantas possuem capacidade de absorver quantidades significativas de  $\text{NH}_3$  pelas folhas. A amônia é absorvida após sua dissolução no filme de água que recobre a epiderme foliar e a cavidade estomática. Isso ocorreria, principalmente, com a formação de orvalho, reduzindo as perdas daquele gás do sistema solo/planta para a atmosfera (DENMEAD et al., 2008). Trabalho desenvolvido por Boaretto et al. (2008) demonstrou que 82,3 % do nitrogênio aplicado na superfície de um solo coberto com palha foram volatilizadas e, desse total, 50,6 % foram reabsorvidos pela planta. Dobermann (2005) ao utilizar dados de cerca de 800 experimentos, estimou que, em média, 51 % do N aplicado foi recuperado pelas partes aéreas de cereais. Por outro lado, Boaretto et al. (2013) relataram que a quantidade de  $\text{NH}_3$  absorvida por

árvores de laranjeiras representou apenas uma pequena proporção das perdas gasosas totais de N.

### **9.1.2. Métodos para reduzir as perdas de amônia por volatilização**

- Aplicar o fertilizante 5 – 10 cm abaixo da superfície do solo.

A maneira mais eficiente de reduzir as perdas de amônia por volatilização é a incorporação da ureia ao solo. Este tipo de manejo aumenta o contato do fertilizante com o solo, favorecendo a adsorção de  $\text{NH}_4^+$  às cargas negativas. Entretanto, a incorporação da ureia acrescenta um custo à adubação, que pode ser elevado em solos cobertos com grandes quantidades de palha, como é o caso, por exemplo, do sistema de plantio direto da cultura de cana-de-açúcar, colhida sem despalha a fogo. A profundidade de incorporação da ureia pode variar com a textura e CTC dos solos (RODRIGUES; KIEHL, 1986), o que impede fazer generalizações.

- Fazer a aplicação da ureia de forma parcelada

Este tipo de manejo ajuda a reduzir as perdas do N aplicado ao solo, uma vez que pode suprir a cultura no momento de maior demanda pelo nutriente. Neste caso, parte do N seria aplicado no momento da semeadura e parte em cobertura.

- Aplicar a ureia atendo-se às possíveis ocorrências de chuvas

Em volumes adequados, a precipitação tem o potencial para transportar a ureia para maiores profundidades do solo, e assim reduz as perdas de amônia.

- Utilizar fertilizantes de eficiência aumentada

Fertilizantes de eficiência aumentada têm sido desenvolvidos para retardar ou mesmo controlar a liberação de nutrientes, de modo que eles possam estar disponíveis para a planta por um período maior de tempo. Essas características geram efeitos benéficos, tanto do ponto de vista ambiental quanto agrônômico (TIMILSENA et al., 2015).

O termo fertilizantes de eficiência aumentada começou a ser utilizado quando um produto nitrogenado de lenta liberação (ureia formaldeído) foi patenteadado, em 1924, na Europa.

Os fertilizantes de eficiência aumentada podem ser classificados em fertilizantes de liberação lenta ou controlada e em fertilizantes estabilizados (HALL, 2005). Os fertilizantes de liberação lenta apresentam propriedades de atrasar ou prolongar, de maneira significativa, o tempo de liberação do nutriente no solo, em relação às fontes solúveis tradicionais (NASCIMENTO et al., 2012). A parte solúvel em água é rapidamente disponível, enquanto a outra é liberada de forma gradual, por um período mais longo. Grande parte dos trabalhos com fertilizantes de liberação lenta tem se concentrado na utilização de ureia submetida a uma reação com formaldeído (38 % N) que estão no mercado desde 1955 (GUERTAL, 2009).

Os fertilizantes de liberação controlada contêm uma camada ou barreira que previne o contato direto dos nutrientes com o meio circundante. A entrada de água nestes grânulos é controlada, o que faz com que ocorra um atraso na disponibilidade inicial dos nutrientes, otimizando, assim, as suas absorções pelas plantas. O recobrimento desses fertilizantes pode ser realizado com polímeros inorgânicos, orgânicos e sintéticos. Essas substâncias são derivadas de poliamidas, enxofre elementar (FERREIRA, 2012), micronutrientes como cobre e boro, ácidos húmicos, carvão oxidado (GUIMARÃES, 2011; PAIVA et al., 2012) ou outros aditivos. Nesse tipo de fertilizante, a liberação do N é controlada pela composição ou espessura do recobrimento. A ureia revestida com enxofre foi o primeiro fertilizante de liberação controlada a ser desenvolvido em escala comercial.

### Fertilizantes nitrogenados de liberação lenta:

- Isobutilidene diureia – 31 % N
- Ureaformaldeído – 38 % N
- Crotonilidene diureia – 32 % N

### Fertilizantes nitrogenados de liberação controlada:

- Ureia recoberta com enxofre
- Ureia recoberta com polímeros

Embora a ureia revestida com polímeros venha sendo citada como nova opção para reduzir a volatilização da  $\text{NH}_3$ , as pesquisas ainda fornecem resultados contraditórios (VILLALBA, 2014). O volume de dados experimentais ainda não é suficiente para determinar quais são as situações em que esse tipo de produto pode trazer vantagens, o que dificulta a recomendação segura desta tecnologia (VALDERRAMA et al., 2011). A maioria dos polímeros utilizados como revestimento da ureia decompõe-se muito devagar, deixando resíduos que podem trazer problemas ambientais. Ademais, esse tipo de tecnologia não apresenta um adequado custo/ benefício.

Fertilizantes estabilizados são aqueles que se modificam durante o processo de fabricação com a introdução de inibidores da nitrificação ou inibidores da urease (Tabela 19). Estes possuem maior importância no mercado em virtude do alto custo dos fertilizantes de liberação lenta ou controlada.

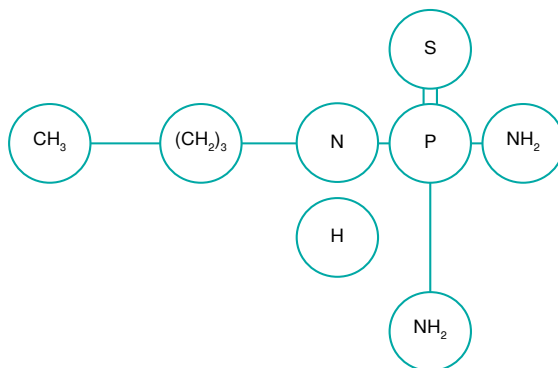
**Tabela 19.** Dados de experimentos a campo que demonstram o efeito de inibidores da urease sobre a volatilização da amônia.

País	kg de N ha <sup>-1</sup>	Volatilização sem inibidor da urease	Volatilização com inibidor da urease	Referência
		(% do N aplicado)		
Brasil	140	13,0	4,0	Marcondes (2007)
Espanha	170	10,1	5,9	Sanz-Cobena et al. (2008)
Brasil (várias localidades)	80-100	11,2 25,4 7,2	7,2 15,2 1,6	Cantarella et al. (2008)
Áustria	80	9,5	1,0	Turner et al. (2010)

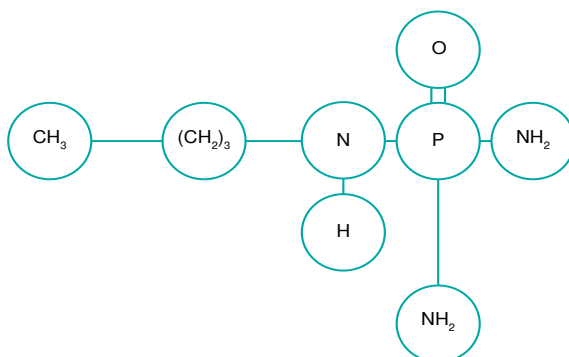
Inibidor da urease: Tiofosfato de N-(n-butil) Triamida

Estudos relacionados à inibição da enzima urease já datam de mais de 60 anos (CONRAD, 1940) e um grande número de compostos, com diferentes características, tem sido testado e patentado como inibidores da urease. No entanto, nem todos os compostos apresentam os requisitos necessários para serem eficazes em baixas concentrações, estáveis e compatíveis com a ureia, degradáveis no solo e de baixo custo.

Atualmente, o NBPT (Tiofosfato de N-(n-butil) Triamida) (Figura 31) é o inibidor da urease mais amplamente utilizado e é comercializado em mais de 70 países (TRENKEL, 2010). Esse produto não é um inibidor direto da urease. Ele tem que ser convertido em seu análogo de oxigênio (Fosfato de N-(n-butil) Triamida - NBPTO) (Figura 32), que é o verdadeiro inibidor (BREMNER; AHMAD, 1995). A inibição enzimática pelo NBPT é específica para a urease (KISS; SIMIHÁIAN, 2002) e não é tóxico para o ambiente, uma vez que a sua degradação gera N, S e P. A sua utilização não tem mostrado efeitos sobre as propriedades biológicas do solo, o que torna o seu uso mais viável. O NBPT bloqueia três sítios ativos da urease (MANUNZA et al., 1999) e os resultados são, geralmente, satisfatórios a baixas concentrações (CANTARELLA et al., 2008). A inibição da hidrólise da ureia ocorre por um período de 3 a 15 dias, o que permite a movimentação do fertilizante, por difusão, para as camadas mais profundas do solo, que resulta em menores perdas de  $\text{NH}_3$  (CANTARELLA; MONTEZANO, 2010). A magnitude de decréscimo das emissões deste gás, em decorrência da aplicação da ureia associada ao NBPT, pode variar de 29 % a 89 % (CANTARELLA et al., 2005). Em cana-de-açúcar a aplicação da ureia associada àquele inibidor proporcionou reduções de 15 % a 78 % nas emissões de  $\text{NH}_3$ , dependendo das condições climáticas nos dias posteriores à aplicação do N (CANTARELLA et al., 2008). Segundo estes autores, embora a adição do NBPT à ureia tenha ajudado a controlar as perdas de amônia, ela foi menos efetiva, quando chuvas suficientes para incorporar a ureia no solo ocorreram 10-15 dias, ou mais, após a aplicação do fertilizante. Efeitos benéficos da utilização de inibidores da urease foram também obtidos por Marchesan et al. (2013).



**Figura 31.** Estrutura química do NBPT, (Tiofosfato de N-(n-butil) Triamida).



**Figura 32.** Estrutura química do NBPTO (Fosfato de N-(n-butil) Triamida).

O uso de zeólitas, minerais aluminossilicatos cristalinos hidratados, é também uma alternativa no sentido de diminuir as perdas de amônia por volatilização, uma vez que protege o íon  $\text{NH}_4^+$  da nitrificação. Esses minerais apresentam três propriedades principais: alta capacidade de troca de cátions, alta capacidade de retenção de água livre nos canais estruturais e alta habilidade de adsorção, o que lhes conferem grande interesse para uso na agricultura (ALVES et al., 2007).

Principais vantagens da utilização de fertilizantes de liberação lenta ou controlada e estabilizados:

- fornecimento regular e contínuo do nutriente na época de maior demanda pelas plantas;
  - menor frequência de aplicação dos fertilizantes;
  - redução de perda do nutriente por diferentes processos;
  - eliminação de danos às raízes decorrentes da alta concentração de sais;
  - maior praticidade no manuseio do fertilizante;
  - redução dos custos de produção;
- Uso de fertilizantes com características ácidas

A aplicação da ureia associada a fertilizantes com características ácidas é outra forma de diminuir as perdas de  $\text{NH}_3$  por volatilização. O sulfato de amônio é a fonte de N com caráter mais acidificante. Quando misturado à ureia, pode acarretar aumento da concentração de íons  $\text{H}^+$  próximos aos grânulos do fertilizante e diminuir as perdas de N por volatilização. Reduções de 29 % nas perdas de  $\text{NH}_3$  podem ser obtidas em decorrência da compactação de sulfato de amônio e ureia (OLIVEIRA et al., 2014).

- Manipular a dieta de animais de modo a reduzir a quantidade de N depositada na urina

Grande parte do N da urina (70 - 90 %) está na forma de ureia que é rapidamente hidrolizada pela enzima urease, provocando a volatilização da amônia (HAYNES; WILLIAMS, 1993). A concentração de N na urina pode apresentar grande variação em decorrência da quantidade de N fornecido pela dieta e pelo consumo de água. Segundo Osada et al. (2011) uma dieta de baixo teor proteico suplementada com aminoácidos sintéticos pode reduzir a excreção de N pela urina.

### 9.2. Lixiviação do nitrato

O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que é a forma de nitrogênio predominante em solos sem restrição de oxigênio, pode contaminar águas subterrâneas por meio da lixiviação. Esse processo consiste na descida do N no perfil do solo até profundidades abaixo daquelas exploradas pelas raízes.



A ocorrência do nitrato no solo é atribuída, principalmente, ao processo de nitrificação, em que o amônio, carregado com cargas positivas, é oxidado para nitrito, que por sua vez é oxidado para nitrato. Em ambientes tropicais as superfícies das argilas apresentam, predominantemente, cargas negativas na camada arável, o que resulta na adsorção do íon amônio aos colóides do solo. Contrariamente, o nitrato com carga negativa não é adsorvido, permanecendo, principalmente, na solução do solo. Se ocorrerem fluxos verticais elevados de água, o nitrato estará susceptível à lixiviação. Em geral, dois fatores fundamentais determinam as quantidades de  $\text{NO}_3^-$  lixiviadas para além da zona das raízes: a quantidade acumulada no solo acima daquela requerida para absorção pelas plantas e o volume da água de drenagem.

O processo de lixiviação pode representar, em média, perdas de 10 % a 30 % do nitrogênio adicionado aos solos (MEISINGER et al., 2008). No entanto, nas condições brasileiras, são poucos os casos de altas perdas por lixiviação relatados na literatura. Cantarella (2007) avaliou dezenas de experimentos e observou que as quantidades de nitrogênio lixiviadas em solos no Brasil são pequenas, embora períodos de chuvas intensas possam provocar perdas em situações na qual a lixiviação de nitrato não seria comum. Segundo esse autor, as perdas de nitrogênio por lixiviação na América do Norte e na Europa são muito maiores do que as do Brasil, em decorrência da maior aplicação de fertilizantes nitrogenados e do cultivo em solos com lençol freático pouco profundo. Segundo Bakhsh et al. (2005), a grande lixiviação daquele ânion, sob determinadas condições, se deve ao crescente uso de fertilizantes nitrogenados na busca de produtividades cada vez maiores, sem se observar o conseqüente impacto ambiental.

Embora o nitrato em si não seja tóxico, a sua presença nas águas subterrâneas é maléfica para a população, uma vez que este ânion pode ser microbiologicamente reduzido no trato gastrointestinal para nitrito. A acidez normal no estômago de humanos adultos tende a prevenir ou minimizar tal redução, mas as crianças com menor acidez estomacal são altamente susceptíveis. O nitrito, ao alcançar a corrente sanguínea, reage com a hemoglobina e forma um composto denominado metahemoglobina, que diminui a capacidade do sangue de transportar oxigênio dos pulmões para o resto do corpo. Nessa situação, a criança está sujeita à doença

denominada metahemoglobinemia, ou síndrome do bebê azul (JENKINSON, 2001). Essa doença foi primeiramente reportada entre os anos de 1940 e 1950 e é letal quando 70 % da hemoglobina do corpo é convertida em metahemoglobina. No sangue de adultos, enzimas convertem de forma contínua aquela substância para hemoglobina, de modo que seu nível não excede 1 %. A Organização Mundial da Saúde relatou cerca de 2000 casos de metahemoglobinemia no mundo, entre os anos de 1945 e 1986, sendo que em torno de 160 crianças morreram. O nitrato pode também reagir quimicamente com compostos aminados, que forma nitrosaminas e são altamente carcinogênicas. No Chile, investigações epidemiológicas sobre a associação entre câncer e fertilizante nitrogenado demonstraram que 49,3% das pessoas expostas ao nitrato de sódio morreram em decorrência daquela doença (ZALDÍVAR; ROBINSON, 1973). Na Espanha, em vários municípios da província de Valença, o aumento da quantidade de nitrato na água de beber elevou a taxa de mortalidade de pessoas de ambos os sexos, em decorrência de câncer no estômago e na próstata (MORALES et al., 1995). Existem também relatos de ocorrência de disfunção da glândula tireoide, de baixo armazenamento da vitamina A e de doenças do coração (GRIZZETTI et al., 2011), resultantes do consumo de água com alto teor daquele ânion.

O nitrato pode também causar problemas na saúde animal. Ruminantes (bovinos e ovinos) e alguns monogástricos (equinos) apresentam certas bactérias no trato digestivo que convertem nitrato em nitrito, levando a uma forma de envenenamento (MEDEIROS et al., 2003). A fonte mais comum de intoxicações de bovinos por nitrato ocorre em consequência da ingestão de plantas com altos níveis desse ânion (JÖNCK et al., 2013).

Os problemas relativos aos conteúdos de  $\text{NO}_3^-$  na água de beber são tão sérios que padrões internacionais estabeleceram um limite de 11 mg de  $\text{N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ . A primeira normatização da qualidade da água para consumo humano no Brasil foi a Portaria n° 56/1977, criada na década de 1970, sob a responsabilidade do Ministério da Saúde (LIMA, 2008). A partir dessa data várias Portarias foram criadas, ficando estabelecido o valor de 10 mg  $\text{L}^{-1}$  de nitrato, como o máximo permitido nas águas utilizadas pela população. Entretanto, alguns dados demonstram que, em áreas exploradas

com agricultura irrigada, a concentração de  $\text{NO}_3^-$  no lençol freático pode exceder a concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (CHOWDARY et al., 2005). Estudos conduzidos nos aquíferos dos pampas argentinos mostraram que 70% das amostras analisadas tinham níveis de nitrato de  $160 \text{ mg L}^{-1}$ , resultante da alta produção de resíduos industriais, domésticos e de áreas agrícolas. Na Tailândia, foram encontrados níveis de nitrato na água tão altos como  $150 \text{ mg L}^{-1}$ , em campos de cultivo intensivo (TIRADO, 2007). Em áreas agrícolas na Europa (cerca de 90 milhões de ha) os níveis de nitrato estão acima de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  e, aproximadamente, 22 % têm excedido  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (VELTHOF et al., 2009).

Nas águas superficiais o excesso de N exerce papel relevante na atividade biológica, uma vez que pode causar o fenômeno da eutroficação (Figura 33). Esse termo refere-se à excessiva produção de algas e plantas aquáticas em decorrência do alto aporte de nutrientes aos cursos d'água. Após a morte das algas inicia-se o processo de decomposição em que os organismos utilizam o  $\text{O}_2$  dissolvido na água para obtenção de energia. A falta de oxigênio pode levar a uma série de alterações químicas e biológicas, como, por exemplo, a mortandade de peixes (SMITH; SCHINDLER, 2009), e tornar estas águas impróprias para uso doméstico e de recreação.

### ***9.2.1. Fatores que afetam as perdas de nitrato por lixiviação***

#### ***Temperatura, quantidade de chuva e de irrigação***

O aumento da temperatura pode provocar maior decomposição da matéria orgânica do solo, resultando em maior risco de lixiviação do nitrato, independentemente da aplicação de fertilizantes nitrogenados (JABLOUN et al., 2015). A aplicação de água por irrigação, se feita em excesso pode provocar grandes perdas de N por lixiviação. Por outro lado, períodos secos ou de escassez de chuvas, em geral, resultam em acúmulo desse íon na superfície do solo em decorrência do baixo crescimento e absorção pelas plantas.

### **Textura do solo**

Perdas de  $\text{NO}_3^-$  por lixiviação são maiores em solos rasos e arenosos (CORSI et al., 2001). Esses solos são, em geral, pobres em matéria orgânica, possuem baixa capacidade para reter o nitrato, que, livre em solução, ficará sujeito à lixiviação para as camadas mais profundas. Nos solos argilosos a menor movimentação da água e o maior potencial de desnitrificação diminuem as perdas do  $\text{NO}_3^-$  por meio do escoamento no perfil do solo. Dynia (2000) verificou acúmulo desse íon entre 220 e 460 cm de profundidade em solo argiloso, e entre 340 e 600 cm de profundidade em solo arenoso.

### **Processo de eutroficação**

Chama-se eutroficação ou eutroficação o fenômeno causado pelo excesso de nutrientes num corpo de água mais ou menos fechado (rios, lagos, baías, estuários, etc), que leva à proliferação excessiva de algas. Estas, ao entrarem em decomposição, provocam aumento do número de microorganismos heterotróficos e da demanda de  $\text{O}_2$ , com conseqüente deterioração da qualidade da água. Em geral, a eutroficação é um processo de origem antrópica (provocado pelo homem), causado por dejetos domésticos (esgoto), fertilizantes agrícolas e efluentes industriais, diretamente despejados ou percolados em direção aos cursos hídricos.



Figura 33. Floração de cianofíceas na Represa Billings em 08/06/06. Fonte: Cetesb (Reproduzida com autorização)

### **Sistemas de uso da terra**

De modo geral, as pesquisas demonstram que menor lixiviação do nitrato ocorre em solos de florestas, seguidos por solos com pastagem e, por fim, por solos agrícolas. As menores perdas em solos de floresta ocorrem em consequência da ausência ou das baixas taxas de aplicação de fertilizantes nitrogenados. Além disso, por serem geralmente mais ácidos, esses solos contêm mais N na forma amoniacal, que pode ser adsorvida aos coloides do solo. A lixiviação do nitrato em solos florestais pode variar de cerca de 1 a 15 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (KIESE et al., 2011). Por outro lado, a derrubada de árvores pode liberar grandes quantidades de N, que poderão ser lixiviadas ou lavadas por meio da erosão do solo. A queima de florestas é outro fator que contribui para o aumento das perdas de N por lixiviação.

É difícil diferenciar o potencial de lixiviação de nitrato em sistemas de cultivo, em decorrência das diferenças existentes nos diversos tipos de solo, clima, uso de fertilizantes, manejo do solo e condições experimentais. Os resultados relativos à lixiviação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em sistema de plantio direto (SPD), comparativamente ao sistema convencional (SPC), ainda são contraditórios. No SPD, a baixa evaporação da água, decorrente da manutenção dos resíduos vegetais e ausência de revolvimento do solo, pode provocar maior lixiviação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ERIKSEN et al., 2008). Por outro lado, no SPC, o revolvimento do solo pode provocar maior decomposição da matéria orgânica e dos resíduos culturais incorporados ao solo intensificando a lixiviação daquele íon (BAYER; MIELNICZUK, 1997). Elmi et al. (2003) relataram que o sistema de cultivo não teve efeito sobre as perdas de nitrato, enquanto Mkhabela et al. (2008) observaram maior lixiviação do nitrato em manejo convencional relativo ao plantio direto (Tabela 20).

**Tabela 20.** Lixiviação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em áreas cultivadas em sistema de plantio direto (SPD) e de plantio convencional (SPC).

Cultura	Sistema de cultivo		Referência
	SPD	SPC	
Milho	+	-	Muzilli (1983)
Fumo	-	+	Kaiser (2006)

+, maior lixiviação; -, menor lixiviação

### ***Fertilizantes nitrogenados***

Os adubos nitrogenados existem em várias formas químicas e podem ter efeitos diferenciados na lixiviação do nitrato. Esses efeitos podem estar ligados à intensidade de nitrificação a que esses fertilizantes estão sujeitos em determinados tipos de solos e condições ambientais. A adição de fertilizantes nitrogenados amoniacais ou amídicos, a solos ácidos, retarda a percolação de N em relação aos adubos nítricos, uma vez que mantém o  $\text{NH}_4^+$  adsorvido, por certo tempo, nas cargas negativas (MANTOVANI et al., 2007).

### ***Matéria orgânica do solo***

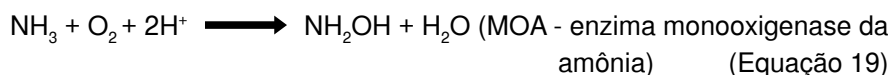
O N está presente em muitos tipos de substâncias orgânicas que podem ser mineralizadas. Condições que favoreçam esse processo, em época de pouca demanda de N pela planta, aumentarão o potencial de lixiviação do nitrato.

### ***Inibidores da nitrificação (IN)***

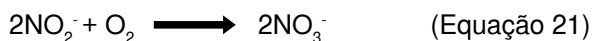
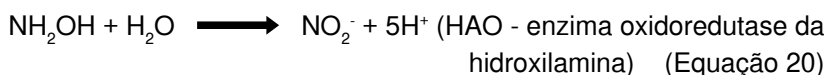
Inibidores da nitrificação (IN) são compostos que podem atrasar ou tornar mais lento o primeiro passo do processo da nitrificação, por meio da interferência na atividade dos microrganismos responsáveis pela redução do amônio a nitrito (TRENKEL, 2010).

A ação dos IN baseia-se na inibição da atividade da enzima monooxigenase da amônia (MOA), que é responsável pela oxidação do amônio para hidroxilamina. Esses IN têm afinidade pelo mesmo sítio ativo daquela enzima e, por princípio de competição, ligam-se a ele, inibindo o processo por mais ou menos tempo, dependendo da estabilidade do composto (MCCARTY, 1999). O menor conteúdo de hidroxilamina diminui o teor de nitrito, cuja oxidação resultaria na formação de nitrato no solo, conforme as equações 19, 20 e 21. A ausência deste tipo de reação faz com que o N na forma amoniacal, que é menos sujeito à lixiviação, fique preservado no solo por mais tempo.

MOA



HAO



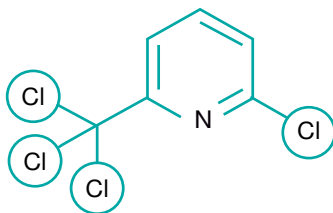
Embora existam vários compostos patenteados como inibidores da nitrificação, poucos demonstraram eficiência agrônômica e econômica simultaneamente (Tabela 21). Até há pouco tempo, a nitrapirina e a dicianodiamida (DCD) (Figuras 34 e 35) eram os que tinham melhor aceitação no mercado. A nitrapirina, porém, apresenta a desvantagem de possuir pressão de vapor relativamente alta, o que não permite sua incorporação em fertilizantes sólidos. Além do mais, ela pertence ao grupo dos organoclorados, é corrosiva e possui características explosivas, o que tem limitado o seu uso (TRENKEL, 1997). Por outro lado, a dicianodiamida (DCD) é um dos inibidores da nitrificação mais usados em vários países. Ele é empregado em várias formulações comerciais e apresenta uma série de vantagens que justificam o seu uso, ou seja: menor custo de produção, menor suscetibilidade à volatilização, adequação para uso em conjunto com fertilizantes sólidos, além de conter 65 % de N, o que o torna um fertilizante de liberação lenta. O DCD se decompõe no solo após algumas semanas em  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{CO}_2$  (FRYE, 2005). Segundo Weiske et al. (2001), o período de efetiva inibição dos IN varia de 3 a 10 semanas, dependendo do produto e do tipo de solo.

## Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

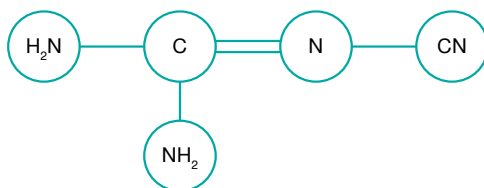
**Tabela 21.** Efeitos da utilização de inibidores da nitrificação associados a adubos nitrogenados no aumento da eficiência de utilização de N pelas plantas.

Inibidor	Efeito do IN	Cultura	Referência
Nitrapirina	Aumento da eficiência de utilização do N em 38-74 %	Aveia	Longeri et al. (1988)
DCD	Aumento da eficiência de utilização do N em 80 %	Pastagem	Mosier et al. (1998)
DCD	Redução da taxa de oxidação do amônio. A maior eficiência do inibidor foi associada a solo de textura média, comparativamente à arenosa e argilosa.	Incubação do solo em laboratório	Barth (2009)
DCD e DMPP	A eficiência de ambos IN foi bem maior em solo de textura arenosa quando comparado ao solo argiloso	Incubação do solo no laboratório	Barth (2009)
DCD	Aumento da eficiência de uso do N da ureia pelo milho, porém sem incremento no rendimento de grãos	Milho	Marcelino (2009)
Nitrapirina	A nitrapirina diminuiu a atividade de microrganismos oxidadores da amônia, sem modificar a abundância do gene <i>amoA</i> .		Fisk et al. (2015)
DMPP	O DMPP foi pouco efetivo em inibir a oxidação de amônia em solos ácidos de pastagem. Isso poderia ser atribuído ao crescimento limitado das bactérias oxidadoras da amônia sob condições de baixo pH e à alta taxa de adsorção do DMPP pela argila e matéria orgânica.		Shi et al. (2016)





**Figura 34.** Estrutura química da nitrapirina.

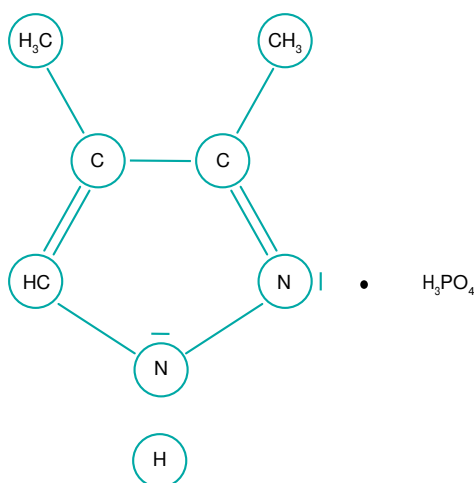


**Figura 35.** Estrutura química da dicianodiamida.

O uso de inibidores da nitrificação, por outro lado, pode causar aumento da concentração de amônio no solo, estimulando a perda de N por volatilização e, portanto, devem ser utilizados com cautela (BANERJEE et al., 2002). A utilização conjunta de inibidores da urease (NBPT) e da nitrificação (DCD) seria uma estratégia que poderia resultar na redução das perdas de N, tanto por volatilização da  $\text{NH}_3$ , como por lixiviação do nitrato (ZAMAN et al., 2008). Entretanto, a eficiência da combinação do NBPT + DCD em reduzir as perdas de N do solo é influenciada por práticas de manejo, tais como irrigação e condições climáticas (SANZ-COBENA et al., 2012), o que poderá levar à obtenção de resultados contraditórios em relação à eficiência de utilização daquela técnica (ZAMAN et al., 2008).

Outro IN que tem sido muito utilizado é o DMPP (3,4-dimetil pirazolfosfato), desenvolvido na Alemanha (Limburgerhof Research Centre) (FRYE, 2005), e que já está disponível no Brasil (Entec 26<sup>®</sup>). O DMPP tem 26 % de N, sendo 18,5 % na forma amoniacal e 7,5 % na forma de nitrato (SILVA et al., 2008) (Figura 36). Este composto pode ser incorporado em fertilizantes

sólidos e líquidos, é inofensivo para organismos aquáticos e terrestres, é degradado biologicamente no solo e apresenta baixa mobilidade (LARRAÍN, 2003). A sua utilização vem apresentando bons resultados, proporcionando incrementos na produção e qualidade de várias culturas agrícolas (WEISKE et al., 2001; ZERULLA et al., 2001). Ele é altamente específico na sua ação e somente uma pequena quantidade (0,8 % do N aplicado) é necessária para inibir a nitrificação por várias semanas (DÍEZ-LÓPEZ et al., 2008), embora a duração dependa das condições de umidade e temperatura.



**Figura 36.** Estrutura química do 3,4-dimetil pirazol fosfato – DMPP.

Fonte: Zerulla et al. (2001).

Estudos sobre as susceptibilidades diferenciais dos microrganismos responsáveis pela nitrificação aos inibidores nitrapirina, DCD e DMPP, podem levar ao uso mais eficiente desses compostos. Os IN afetam de forma diferenciada as bactérias e arqueias oxidadoras do amônio. Uma possível razão para isto pode estar relacionada às diferenças nas composições das membranas celulares entre esses dois microrganismos (RUSER; SCHULZ, 2015), embora existam controvérsias. Menor efeito do DCD tem sido verificado sobre as arqueias oxidadoras da amônia relativo às bactérias, enquanto a nitrapirina parece inibir de forma mais marcante as arqueias (SHEN et al.,

2013b). Segundo Chen et al. (2015), o DMPP exerce maior efeito em inibir a nitrificação e as bactérias oxidadoras da amônia do que o DCD, revelando-se como o IN ideal para as condições em que foram conduzidos os experimentos.

A utilização de IN pode também afetar a atividade microbiana geral do solo e a estrutura da comunidade de microrganismos não alvo. Entretanto, esse tipo de estudo encontra-se ainda em uma fase incipiente, com resultados contraditórios. Segundo Guo et al. (2013), a utilização do DCD, por longos períodos de tempo, não afeta a abundância de bactérias e arqueias nem a atividade de determinadas enzimas do solo. Por outro lado, Patra et al. (2006) observaram uma redução de 61 % no número de bactérias do solo após a aplicação de ureia com 0,5 % de DCD, em solo de textura argilo-arenosa.

Certas plantas, como a *Brachiaria* spp. e o sorgo, têm a habilidade de suprimir a nitrificação por meio de inibidores biológicos (IBN) liberados pelas raízes. Dentre os inibidores da nitrificação exsudados pelas raízes de sorgo, podem ser citados o metil 3- (4-hidroxifenil) propionato, o sacuranetina e o sorgoleone (SUBBARAO et al., 2015). Alguns desses compostos podem inibir em até 40 % o processo de nitrificação (SUBBARAO et al., 2013).

A forma de N no solo ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$ ) tem grande influência sobre a síntese e liberação de inibidores biológicos da nitrificação (SUBBARAO et al., 2015). Na presença de  $\text{NO}_3^-$ , como única fonte de N, não ocorre a liberação de IBN pelas plantas, ao contrário do que ocorre na presença de  $\text{NH}_4^+$ . O papel regulatório do cátion na síntese e liberação de IBN sugere uma função adaptativa em se proteger dos microrganismos nitrificadores (SUBBARAO et al., 2009). A utilização desses IBN seria uma estratégia benéfica não só para a agricultura como também para o meio ambiente. Embora resultados promissores decorrentes da utilização de IBN já tenham sido obtidos (ZHANG et al., 2015b), o número de estudos nessa área ainda é limitado (PFAB et al., 2012).

### Fatores que podem afetar os Inibidores Biológicos da Nitrificação (IBN)

- Propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, por influenciar o ambiente perto da rizosfera de plantas. Exemplos: → pH alcalino pode limitar a expressão e estabilidade da função dos IBN.  
→ solos com altos teores de matéria orgânica podem aumentar a atividade dos microrganismos, que poderão degradar os IBN.
- Existem poucas informações sobre como a temperatura e a umidade do solo modulam as funções de IBN (SUBBARÃO et al., 2013b).

### ***Dejetos líquidos de suínos (DLS)***

A suinocultura no Brasil tem apresentado um significativo crescimento nas últimas décadas, com destaque para o estado de Santa Catarina, que é responsável por 27,4 % do abate nacional (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2016). Diante desta intensificação na criação de suínos no país, houve uma crescente tendência em adotar o sistema de confinamento total dos animais em todas as fases do ciclo produtivo. Entretanto, apesar de ser um processo com várias características positivas, esse sistema incorre no consumo de quantidades elevadas de água para higienização das instalações, gerando grandes quantidades de dejetos, geralmente na forma líquida.

Existem diversas alternativas de destino para esses dejetos (CARDOSO et al., 2015), mas a sua utilização como fertilizante do solo é a mais adotada (GALLO et al., 2015). Estimativas indicam que os DLS gerados no Brasil podem contribuir com até 10 % do total de fertilizantes consumidos anualmente no país (NICOLELLA et al., 2005). Entretanto, apesar de promover incremento na produção agrícola (SCHIRMAN et al., 2013), esses dejetos podem provocar perdas de  $\text{NO}_3^-$  por lixiviação, devido à rápida taxa de oxidação do N amoniacal ou em decorrência de aplicações consecutivas e em grandes quantidades. Desse modo, é necessário que a definição de doses adequadas e o intervalo de suas aplicações sejam adequadamente estabelecidas.

Perdomo et al. (2001) verificaram que os teores de  $\text{NO}_3^-$  detectados em águas subterrâneas de solos tratados com altas quantidades de dejetos

líquidos ( $160 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ) foram dez vezes maiores que os detectados em solos não tratados. Do mesmo modo, Fey et al. (2010) mostraram que a concentração de  $\text{NH}_4^+$  até a profundidade de 60 cm não foi alterada pelas doses de dejetos suíno. Em contrapartida o  $\text{NO}_3^-$  apresentou aumento de concentração na camada mais profunda, indicando possibilidade de contaminação de águas subterrâneas.

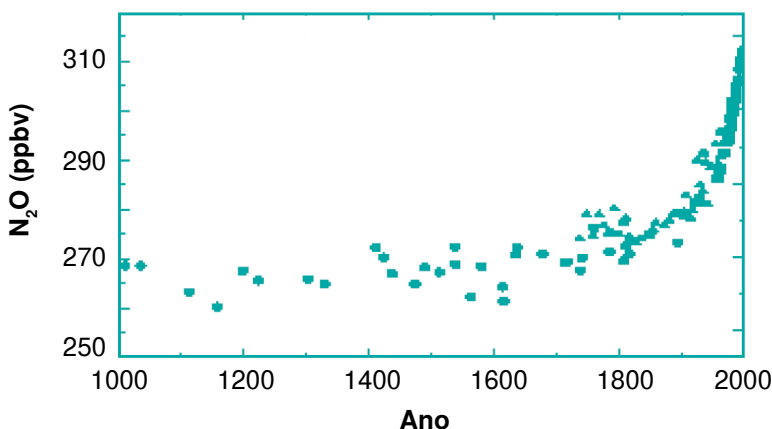
### ***Utilização de lodo de esgoto (LE) na agricultura***

O uso agrícola do lodo gerado nas estações de tratamento de esgoto promove o retorno de matéria orgânica e nutrientes para o solo, promovendo aumento da produtividade de culturas e melhoria das condições físicas, químicas e biológicas do solo (BITTENCOURT et al., 2014). Entretanto, Borba et al. (2015) alertam quanto ao potencial de contaminação do solo pelo aumento da concentração de nitrato em áreas que vem recebendo sucessivas aplicações de LE. Dependendo das doses aplicadas, quantidades consideráveis de nitrato podem ser lixiviadas da camada arável dos solos para além da zona de exploração das raízes (OLIVEIRA et al., 2001). Segundo Kelling et al. (1977), teores de nitrato variando de 78 a 93 mg e de 136 a 225 mg foram encontradas após 10 a 15 meses da aplicação de lodo em Molissolos cultivados com cereais, nas profundidades de 1,2 a 1,5 m, respectivamente. Do mesmo modo, Luczkiewicz (2006) constatou que em solo suplementado com LE compostos nitrogenados como  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  podem ser lixiviados e atingir profundidades superiores a 0,8 m e contaminar águas subterrâneas.

### **9.3. Emissão de óxido nitroso de solos agrícolas**

A emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  de solos aráveis deve-se a múltiplos processos simultâneos que ocorrem no ambiente edáfico. A maior parte do  $\text{N}_2\text{O}$  emitida pelos solos é produzida, principalmente, pelos processos biológicos de nitrificação, desnitrificação e desnitrificação por nitrificadores mediados por fungos, bactérias e arqueias. Pequenas quantidades provêm de processos não biológicos, como a decomposição química do nitrito (quimiodesnitrificação) e da hidroxilamina.

A concentração atmosférica de  $N_2O$  aumentou de 270 ppbv desde o período pré-industrial para 320 ppbv, em 2005, e poderá alcançar, em 2100, valores entre 354 a 460 ppbv (SOLOMON et al., 2007). Este aumento tem sido atribuído principalmente à agricultura em decorrência da maior demanda por alimentos de uma população em constante crescimento. Segundo Park et al. (2012) a produção de alimentos é, provavelmente, responsável por 80 % do acúmulo do  $N_2O$  na atmosfera ().

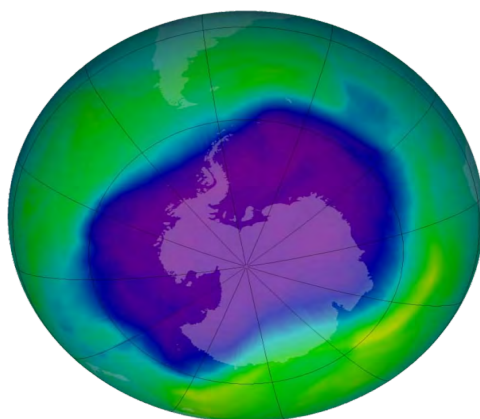


**Figura 37.** Concentrações atmosféricas de  $N_2O$  em 1000 anos.

Fonte: Houghton et al. (2001).

Apesar de o óxido nitroso ser conhecido, há muitos anos, como constituinte regular da atmosfera, a preocupação ambiental com suas emissões surgiu somente no início da década de 1970. Neste período foi demonstrado o seu efeito na redução da camada de ozônio ( $O_3$ ), cuja função é filtrar, parcialmente, os raios ultravioletas que chegam à terra. Reduções na camada de ozônio podem provocar mudanças na temperatura e nos padrões globais de distribuição de chuvas, com sérias consequências para a vida das plantas, animais e seres humanos. Convencionou-se chamar “buraco da camada de ozônio” à queda acentuada na concentração do ozônio existente na camada protetora que reveste a Terra. Atualmente, este fenômeno torna-se mais forte no final do inverno e primavera no hemisfério sul. Nesse período, uma área

de, aproximadamente, 31 milhões de quilômetros – maior que toda a América do Sul, ou o equivalente a 15 % da superfície da Terra – recebe uma maior incidência de radiação UV-B. O buraco de ozônio (Figura 38) na Antártida foi descoberto por Joe C. Farman e sua equipe de pesquisadores, em 1979, mas os dados das pesquisas somente foram publicados em 1985 (FARMAN et al., 1985). Nas demais áreas do planeta, a diminuição da camada de ozônio também é alta e em termos globais ela vem diminuindo cerca de 3 % desde 1980 (PYLE; SHEPHERD, 2005).



**Figura 38.** Buraco de ozônio. Setembro de 2006.  
Fonte: Estados Unidos (2017b).

O óxido nitroso é altamente estável com um tempo de residência atmosférica de 114 anos. Ele está presente na atmosfera em concentrações bem menores que o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e o metano ( $\text{CH}_4$ ) (EGGLESTON et al., 2006), que são também gases de efeito estufa (GEE). As emissões desses gases são, geralmente, expressas em termos de equivalente de  $\text{CO}_2$ , denominado de PAG (*Potencial de Aquecimento Global*), calculado para 100 anos de integração dos efeitos. Os valores do PAG para o  $\text{CO}_2$ , o  $\text{CH}_4$  e o  $\text{N}_2\text{O}$  são 1, 21 e 310, respectivamente (EGGLESTON et al., 2006) (Tabela 22). Em consequência do alto potencial de aquecimento global das moléculas de  $\text{N}_2\text{O}$ , pequenas mudanças na sua concentração têm um efeito

desproporcionalmente grande no sistema climático. Apesar desse poder reativo e de sua alta meia vida, as emissões deste óxido têm sido bem menos estudadas que a do  $\text{CO}_2$ .

**Tabela 22.** Potencial de aquecimento global (PAG) de diferentes gases de efeito estufa.

Gás traço	PAG	Concentração na atmosfera (ppbv)
Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ )	1	379000
Metano ( $\text{CH}_4$ )	21	1760
Óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ )	310	320

### Processos que contribuem para a formação do $\text{N}_2\text{O}$ no solo

- Disnitrificação conduzida por organismos capazes de usar óxidos de nitrogênio como aceptores alternativos de elétrons, sob condições de limitada disponibilidade de oxigênio.
- Decomposição química da hidroxilamina durante o processo de nitrificação autotrófica e heterotrófica.
- Quimiodesnitrificação do nitrito.
- Desnitrificação por nitrificadores.
- Codesnitrificação de compostos orgânicos de N com o óxido nítrico (NO).
- Amonificação do nitrato ou redução dissimilatória do nitrato para amônio.

Fonte: BUTTERBACH-BAHL et al. (2013)

Avaliações das fontes globais de  $\text{N}_2\text{O}$ , feitas a partir de 1850, demonstraram que as atividades agrícolas são responsáveis por cerca de 70 % do seu aumento na atmosfera (SOLOMON et al., 2007). No Brasil, cerca de 50 % das emissões deste gás são atribuídas à criação de animais.

Em uma mesma área com sistemas agrícolas similares, as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  variam no tempo e no espaço. Isso ocorre devido à heterogeneidade dos sistemas de onde o óxido nitroso é emitido e em decorrência das interações entre as variáveis químicas, físicas e biológicas do solo (CLAYTON et al., 1994) (Tabela 23). A temperatura, a umidade e a



disponibilidade de substrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no solo são os maiores determinantes relacionados à emissão do  $\text{N}_2\text{O}$ . Entretanto, sob algumas condições, o poder elucidativo dessas variáveis é ainda pobremente entendido e suas variações, às vezes, podem explicar apenas 50 % das oscilações temporais das emissões de  $\text{N}_2\text{O}$ . Isso indica que outros fatores, como, por exemplo, a dinâmica da comunidade microbiana, podem também estar controlando tal processo (LUO et al., 2013).

**Tabela 23.** Resultados de alguns estudos sobre emissão de óxido nitroso de solos agrícolas.

Local	Resultados	Citação
Ariquemes, RO	A umidade do solo e a disponibilidade de nitrato foram essenciais para que ocorressem perdas de N na forma de $\text{N}_2\text{O}$ .	Carmo et al. (2005)
Passo Fundo, RS Londrina, PR	Avaliações das emissões de $\text{N}_2\text{O}$ demonstraram que os maiores fluxos desse gás ocorreram nos períodos de chuvas mais intensas, desde que coincidentes com a época de aplicação do fertilizante nitrogenado.	Jantalia et al. (2006)
Passo Fundo, RS	Nenhuma relação foi observada entre o fluxo de $\text{N}_2\text{O}$ , o espaço poroso preenchido com água e o N mineral do solo.	Jantalia et al. (2008)
Rio Verde, GO	A umidade foi a variável do solo que mais interferiu no fluxo dos gases de efeito estufa. A área sob pastagem foi a única situação em que os fluxos de $\text{N}_2\text{O}$ apresentaram correlações com as quantidades de N inorgânico.	Siqueira Neto et al. (2011)
Bélgica	Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> spp. podem ser potenciais contribuidores do processo de desnitrificação. Verificou-se uma correlação significativa entre a composição da comunidade de desnitrificadores e o fluxo de $\text{N}_2\text{O}$ . A significância ecológica dessas descobertas demonstra que as comunidades funcionais de microrganismos podem ser utilizadas nas predições das taxas de emissões de $\text{N}_2\text{O}$ .	Verbaendert et al. (2011)

Continua...

## Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

**Tabela 23.** Continuação.

Local	Resultados	Citação
Argentina	O conteúdo de $\text{NO}_3^-$ no solo sem cultivo foi a variável que mais influenciou as emissões de $\text{N}_2\text{O}$ . A fertilização nitrogenada do milho aumentou a emissão de $\text{N}_2\text{O}$ , enquanto que nenhuma diferença significativa foi encontrada em função do sistema de cultivo.	Alvarez et al. (2012)
Rio Grande do Sul	As emissões de $\text{N}_2\text{O}$ em áreas cultivadas com feijoeiro comum irrigado, em sistema de plantio direto, foram maiores para os tratamentos com cobertura de braquiária, independentemente da fertilização com nitrogênio.	Carvalho et al. (2013)

### Aquecimento global

Aquecimento global é o aumento da temperatura média dos oceanos e da camada de ar próximo à superfície da terra. Isso se deve, principalmente, ao aumento das emissões de gases de efeito estufa. Os três principais gases que causam este fenômeno são o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o metano ( $\text{CH}_4$ ) e o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (IPCC, 2007), sendo os dois últimos os mais potentes.

O efeito estufa é um efeito natural fundamental para a manutenção da vida na terra. Sem ele, o planeta poderia se tornar muito frio, inviabilizando a sobrevivência do ser humano. Normalmente, parte da radiação solar que chega ao planeta é refletida e retorna para o espaço. Outra parte é absorvida pelos oceanos e pela superfície terrestre e uma parte é retida pela camada de gases. Entretanto, devido às atividades humanas, essa camada tem se tornado cada vez mais espessa, impedindo que parte dos raios solares retornem para o espaço, ocasionando aumento da temperatura atmosférica.

Consequências do aquecimento global:

- Aumento do nível do mar em decorrência do derretimento das calotas polares
- Maior frequência de eventos climáticos extremos
- Efeitos negativos sobre a produtividade de diferentes culturas
- Extinção de várias espécies de animais e vegetais

As medições de  $\text{N}_2\text{O}$  de solos agrícolas são normalmente feitas com o uso de câmaras estáticas que são distribuídas no campo. As variabilidades dos vários fatores que afetam a emissão do  $\text{N}_2\text{O}$  sugerem que a sua quantificação baseada em pontos limitados de medidas pode apresentar um alto grau de incerteza. Do mesmo modo, picos de emissões podem ocorrer em determinados períodos não estabelecidos para as suas medições. Tais fatos demonstram que um dos maiores desafios no estudo das emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo refere-se à sua quantificação.

Considerável quantidade de amônia pode ser perdida do solo após a aplicação de fertilizantes nitrogenados aos sistemas agrícolas. Embora a amônia ( $\text{NH}_3$ ) não seja, diretamente, um gás de efeito estufa, suas transformações na biosfera podem contribuir, potencialmente, para o aquecimento global. Em decorrência do seu ciclo curto na atmosfera, a amônia também atua como fonte secundária de  $\text{N}_2\text{O}$ , quando for redepositada na superfície do solo, onde, na presença de água, ela é convertida a  $\text{NH}_4^+$ .

Queima de florestas, savanas e cana-de-açúcar são também fontes em potencial de  $\text{N}_2\text{O}$  e ocorrem, principalmente, nos trópicos em decorrência do processo de desbravamento de áreas cobertas com diferentes tipos de vegetação. O  $\text{N}_2\text{O}$  pode também ser emitido de atividades industriais durante a queima de combustíveis fósseis. O volume emitido varia com o tipo de combustível, tecnologia, controle de poluição e com práticas operacionais. O  $\text{N}_2\text{O}$  é também gerado como subproduto durante a produção de ácido adípico, que é utilizado na produção de nylon e como um potenciador de sabor de alguns alimentos.

### **9.3.1. Fertilizantes nitrogenados e a emissão de óxido nitroso**

#### **9.3.1.1. Fertilizantes minerais**

O aumento da aplicação de fertilizantes nitrogenados sintéticos torna-se necessário frente à demanda por alimentos de uma população mundial em constante crescimento. A utilização desses fertilizantes resulta em maior suprimento de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  no solo. O amônio é utilizado pelos microrganismos no processo da nitrificação, e o nitrato na desnitrificação. Como a maior parte do  $\text{N}_2\text{O}$  emitido é produzida por esses dois processos, o N inorgânico adicionado ao solo aumenta, potencialmente, as emissões de óxido nitroso (CARDENAS et al., 2010). Geralmente, ocorre acentuada emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  imediatamente após a aplicação do fertilizante, que perdura por volta de seis semanas, dependendo das condições do solo. Após esse período, a taxa de emissão cai e flutua em torno de um valor baixo, independentemente das quantidades de fertilizantes aplicadas (MOSIER et al., 1983). Alves et al. (2010) relataram que o efeito da fertilização nitrogenada sobre a emissão daquele gás se restringiu ao primeiro mês após a sua aplicação no solo.

Embora alguns autores tenham obtido relações positivas entre as taxas de fertilizantes nitrogenados aplicadas ao solo e a emissão de  $N_2O$ , a tendência nem sempre foi linear (BELL et al., 2015). Essa ausência de relação entre os conteúdos de N mineral no solo e as emissões de  $N_2O$  sugere que a quantidade daquele elemento nem sempre é um bom indicador da intensidade de produção daquele gás (ROCHETTE et al., 2004) e poderia refletir o alto potencial de mineralização do N orgânico do solo (KAISER et al., 1998).

A relação entre os teores de nitrato no solo e a emissão de  $N_2O$  é amplamente estudada e frequentes correlações positivas entre esses dois fatores têm sido obtidas (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007; SÁNCHEZ-MARTÍN et al., 2010). Em alguns casos, porém, esse tipo de correlação só existe durante certos períodos, após o início de irrigações (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007), ou para certas concentrações de nitrato (VILAIN et al., 2010). Esses resultados podem explicar as inexistências de associações, muitas vezes encontradas entre as emissões de  $N_2O$  e os conteúdos daquele ânion no solo (GARLAND et al., 2011; VALLEJO et al., 2006).

O tipo de fertilizante nitrogenado tem grande influência no processo de emissão de  $N_2O$ . Segundo Galbally (1985) e Eichner (1990), as emissões de  $N_2O$  oscilaram entre 0,001 % a 6,8 % do N aplicado (para cada 100 kg de N na forma de fertilizante, 6,8 kg de N eram emitidas na forma de  $N_2O$ ), dependendo do fertilizante utilizado. Valores médios fornecidos por Galbally (1985) foram de 0,5 % para amônia anidra e de 0,1 % para fertilizantes amoniacais. Vários outros estudos, entretanto, demonstram que essa amplitude pode ser bem maior variando de 0,001 % a 10 %, ou mais. Logicamente que essas variações estão relacionadas aos múltiplos fatores que afetam a emissão deste gás. No cerrado, em solo cultivado com feijão e milho, em sistema de plantio direto, a aplicação de ureia resultou em maior emissão de óxido nitroso do que o sulfato de amônio (CARVALHO et al., 2010). Perdas de  $N_2O$  variando de 0,7 % a 1,65 % do N aplicado foram obtidas em áreas cultivadas com feijão, onde o sulfato de amônio ou lodo de esgoto foram utilizados como fonte de N (GONÇALVES, 2002). Em áreas cultivadas com cana-de-açúcar a aplicação de nitrato de amônio promoveu uma emissão mais intensa e mais rápida de  $N_2O$  do que a ureia (SIGNOR et al., 2013). Segundo Inselsbacher et al. (2011), a utilização de

nitrito de amônio resulta em maiores emissões de  $N_2O$ , comparativamente à aplicação de amônio ou nitrato, individualmente. Zanatta et al. (2010) relataram que as fontes nítricas promoveram maiores emissões de  $N_2O$  em um Gleissolo, nas condições em que o espaço poroso do solo estava preenchido com água. O autor concluiu que a redução nas emissões deste gás poderia ser obtida pelo uso de fontes amoniacais e amídicas de N, em detrimento de fontes nítricas. Em lavouras de arroz inundado Linquist et al. (2012) relataram que a substituição da ureia por sulfato de amônio aumentou as emissões de  $N_2O$ .

A utilização de inibidores da nitrificação associados a fertilizantes nitrogenados pode provocar grandes decréscimos nas emissões de  $N_2O$  (Tabela 24). Reduções de 56 a 86 % nas emissões deste gás, em pastagens, podem ser obtidas com a utilização do DCD, que é um inibidor da nitrificação. Nesse caso, a acidez do solo deve ser levada em consideração, uma vez que este fator pode influenciar a eficiência de utilização daquele composto (MOSIER et al., 1998). Sob algumas condições, a utilização do DCD pode não ter efeito em reduzir as emissões de  $N_2O$ , como é o caso de locais contaminados com urina de bovinos, em condições tropicais (MAZZETTO et al., 2015).

**Tabela 24.** Resultados de avaliações de emissões de  $N_2O$  utilizando inibidores da nitrificação.

Resultados obtidos	Referências
Os inibidores da nitrificação foram efetivos em reduzir as emissões de $N_2O$ de solos cultivados com milho, tanto em sistema de plantio direto como no plantio convencional.	Bhatia et al. (2010)
A utilização do inibidor da nitrificação, DCD, diminuiu as emissões de $N_2O$ em 39 %, 69 % e 70 %, respectivamente, em áreas fertilizadas com nitrato de amônio, ureia e urina de gado.	Misselbrook et al. (2014)
Reduções variando de 3 % a 44 % na emissão de $N_2O$ podem ser obtidas em decorrência da adição do inibidor da nitrificação fosfato de 3,4-dimetil pirazole (DPPP) ao fertilizante nitrogenado.	Lam et al. (2015)
O DCD não foi efetivo em mitigar as emissões de $N_2O$ em campos de cultivo de hortaliças na Austrália.	Riches et al. (2016)

Continua...

**Tabela 24.** Continuação.

Resultados obtidos	Referências
O inibidor da nitrificação 3,4,-dimetilpirazol fosfato (DMPP), utilizado em associação com a ureia reduziu, em média, 60 % da emissão de N <sub>2</sub> O, quando comparado à utilização de ureia sem o inibidor. A menor emissão de N <sub>2</sub> O não foi associada a ganhos significativos na produtividade do sorgo.	Massimiliano et al. (2016)
A aplicação de ureia, associada ao DCD, pode alterar a emissão de N <sub>2</sub> O, por regular o crescimento das bactérias oxidadoras da amônia, mas não das arqueias oxidadoras da amônia.	Qing et al. (2016)

### **9.3.1.2. Fontes orgânicas de nitrogênio**

Fontes orgânicas de N podem emitir mais N<sub>2</sub>O do que fontes inorgânicas, embora o número de experimentos nessa área seja insuficiente para comprovar tal hipótese (DAVIDSON, 2009). Um dos compostos orgânicos que tem sido amplamente estudados no Brasil são os dejetos líquidos de suínos (DLS). A aplicação de DLS ao solo como fertilizante pode favorecer a emissão de óxido nitroso por estimular os processos de nitrificação e desnitrificação, uma vez que apresentam altos teores de N. Além de adicionar N ao solo, os dejetos aumentam a quantidade de C no solo, que são essenciais para o metabolismo dos microrganismos heterotróficos desnitrificadores. Apesar desses fatores, Giacomini et al. (2006) relataram que a perda de N pela emissão de N<sub>2</sub>O, com a aplicação de dejetos líquidos de suínos, em plantio direto e preparo reduzido do solo é pequena, representando menos de 0,30% da quantidade total de N aplicada.

A aplicação de palha, excreções de gado e de aves domésticas e resíduos de biogás, como fontes de N, podem reduzir a emissão de N<sub>2</sub>O em solos agrícolas, comparativamente à utilização de fertilizantes nitrogenados (HE et al., 2014). Contrário a esses resultados, existem relatos de que as emissões de N<sub>2</sub>O não foram modificadas ou mesmo aumentaram após a aplicação de esterco orgânico ou do retorno da palha ao solo (JIANG et al., 2012). Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos às diferenças nas razões C/N, à facilidade de decomposição dos compostos orgânicos, às condições do solo ou às espécies de plantas utilizadas nos diferentes estudos (RIZHIYA et al., 2011; RIYA et al., 2012).

A suplementação do solo com biocarvão pode também afetar a emissão de  $N_2O$ . Menores emissões de  $N_2O$  com a utilização desse composto foi primeiramente reportada por Rondon et al. (2005), em experimento de casa-de-vegetação. Entretanto, os diversos estudos que vêm sendo realizados têm revelado efeitos positivos e negativos da adoção dessa prática na emissão do óxido nitroso. Maiores emissões desse gás podem ocorrer durante os períodos iniciais de suplementação do solo, em decorrência dos maiores conteúdos de C lábil presentes no composto (SINGH et al., 2010). Por outro lado, segundo Cayuela et al. (2013), a capacidade tampão do biocarvão parece ser de fundamental importância no decréscimo das emissões de  $N_2O$  durante a desnitrificação, devido aos mecanismos de mitigação conectados ao pH. Maior pH do solo suplementado com biocarvão ajuda a aumentar a atividade do último passo da desnitrificação, com conseqüente decréscimo da razão  $N_2O/N_2$ , ou seja, menos N será perdido como  $N_2O$  e mais como  $N_2$ . Entretanto, segundo alguns autores, não existe um consenso sobre o que faz com que o biocarvão possa mitigar a emissão deste gás. Existem relatos de que o biocarvão pode modificar a atividade microbiana (LEHMANN et al., 2011), a concentração de C orgânico e de nitrato disponíveis (PRENDERGAST-MILLER et al., 2011), e a aeração dos solos (KINNEY et al., 2012), que são fatores que interferem no total de N desnitrificado (CUHEL et al., 2010). O efeito do biocarvão na emissão de  $N_2O$  é também dependente da temperatura de pirólise. Segundo Araujo (2015), a utilização de biocarvão de lodo de esgoto produzido em temperatura baixa elevou as emissões de  $N_2O$  do solo, enquanto que aqueles produzidos em temperaturas elevadas reduziram as emissões desse gás.

### **9.3.2. Fator de emissão de óxido nitroso (FE)**

Mosier et al. (1995) recomendaram o uso de um fator único para calcular a emissão de  $N_2O$  de diferentes tipos de fertilizantes. Eles sugeriram o uso da equação dada por Bouwman (1994), ou seja:

$$N_2O \text{ emitido} = 1,25 \% \text{ do N aplicado (kg N ha}^{-1}\text{)} \quad (\text{Equação 22})$$

Essa relação foi recomendada pelo Painel Internacional de Mudanças do Clima (INPC) (WATSON et al., 1996) com a finalidade de elaborar

inventários nacionais de emissões de gases de efeito estufa. Esse fator de emissão foi obtido por meio de vários experimentos conduzidos em regiões de clima temperado, apresentando um grau de incerteza de 0,25 % a 2,25 %. Valores tão baixos como 0,20 % são sugeridos para determinados tipos de solo (BELL et al., 2015). Em decorrência desta grande variabilidade, Barton et al. (2014) recomendam a utilização de dados específicos regionalmente ao calcular os fatores de emissões de  $N_2O$ , ao invés de utilizar valores padrões do IPCC em todas as regiões geográficas e climáticas.

### Fator de emissão de $N_2O$

Refere-se à quantidade de N perdido na forma de  $N_2O$  para cada 100 kg de N aplicado ao solo, descontadas as perdas de N por volatilização de  $NH_3/NO_x$ .

Os fatores de emissão já obtidos podem não ser apropriados para regiões tropicais, considerando que nessas áreas as condições de temperaturas mais elevadas e de chuvas mais intensas modificam a dinâmica do N no solo. Fator de emissão 60 vezes menor que o sugerido pelo IPCC foram obtidos em regiões semiáridas (BARTON et al., 2008). Estudos conduzidos no Brasil encontraram fortes evidências de que o fator de emissão direta do IPCC é elevado para as condições da agricultura brasileira (ALVES et al., 2010). Esses autores também relatam que o fator proposto pelo IPCC de 2006 de 1 %, embora ainda alto, parece ser mais realístico para ser usado nos inventários de emissões de  $N_2O$ , naquelas condições (Tabela 25).

**Tabela 25.** Fatores de emissão de  $N_2O$  obtidos de diferentes experimentos.

Local	Considerações sobre o trabalho	FE	Referências
Nova Zelândia	Fatores de emissão de solos suplementados com urina de vaca.	0,3 % - 2,5 %	Klein et al. (2003)
São Paulo, Brasil	Fatores de emissão em áreas com cana-de-açúcar, após a aplicação de vinhaça (46 kg N ha <sup>-1</sup> ).	0,68 % - para área com queima 0,44 % - para área sem queima	Oliveira et al. (2013)

Continua...



**Tabela 25.** Continuação.

Local	Considerações sobre o trabalho	FE	Referências
Japão	Fatores de emissão em solo cultivado com chá e diferentes manejos de fertilização.	- 600 kg N ha <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 7,9 % - 300 kg N ha <sup>-1</sup> (esterco de galinha) - 7,0 %	Hou et al. (2015)
Brasil, São Paulo	Fatores de emissão de áreas com diferentes quantidades de palhada de cana mantidas no solo e adubadas com fertilizante nitrogenado, vinhaça e torta de filtro. Quantidade de palha de cana não afetou a emissão de N <sub>2</sub> O	- Fertilizante nitrogenado 0,46 ± 0,33 % - Torta de filtro 0,13 ± 0,04 % - Vinhaça 0,65 ± 0,29 %	Siqueira Neto et al. (2016)
Mato Grosso, Brasil	Fatores de emissão de áreas cultivadas com arroz com diferentes doses de biocarvão.	Na dose de 32 Mg de biocarvão ha <sup>-1</sup> - 0,81 %	Petter et al. (2016)

### 9.3.3. Cultivo de leguminosas e a emissão de óxido nitroso

Em 1997, o IPCC incluiu o processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> pelas leguminosas como fonte de N<sub>2</sub>O, após O'Hara e Daniel (1985) terem relatado que bactérias fixadoras de nitrogênio poderiam conduzir o processo de desnitrificação. Esse processo poderia trazer alguns benefícios para os rizóbios. Eles eliminariam o nitrato que inibe a atividade da nitrogenase nos nódulos e o nitrito que previne o processo de infecção dos rizóbios nas raízes das leguminosas. Eichner (1990) relatou que as taxas de emissões de N<sub>2</sub>O de solos agrícolas cultivados com leguminosas variaram de 0,34 a 4,6 kg N<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. No Canadá, estimou-se que a fixação simbiótica do N<sub>2</sub> seja responsável por 22 % das emissões de N<sub>2</sub>O dos solos agrícolas (DESJARDINS; RIZNEK, 2000 citado por ROCHETTE et al., 2004). Outras pesquisas também demonstraram que maiores emissões de N<sub>2</sub>O foram obtidas de áreas cultivadas com soja noduladas, relativo àquelas cultivadas com soja não nodulantes (KIM et al., 2005).

As emissões de N<sub>2</sub>O em ecossistemas cultivados com leguminosas poderiam ser atribuídas à liberação de N dos exudatos de raízes. Segundo Mayer et al. (2003), *Vicia faba* pode liberar 13 % de seu N fixado como rizodeposição. As leguminosas poderiam também favorecer as emissões de

$N_2O$  após a decomposição/mineralização pelos microrganismos heterotróficos dos seus resíduos culturais que contêm o N fixado biologicamente (CHU; GROGAN, 2010). Entretanto, a forma como esses resíduos são deixados no solo podem, também, influenciar a emissão daquele gás, embora os dados de pesquisa ainda sejam controversos. Segundo Almaraz et al. (2009), a emissão é maior em áreas cultivadas com soja, quando os resíduos são incorporados, do que quando eles são deixados na superfície do solo. Por outro lado, Escobar et al. (2010) relataram que, após a colheita da soja, a emissão cumulativa de  $N_2O$  foi maior no sistema de plantio direto. Segundo estes autores, a maior umidade neste tipo de cultivo pode ter sido responsável pelos resultados alcançados.

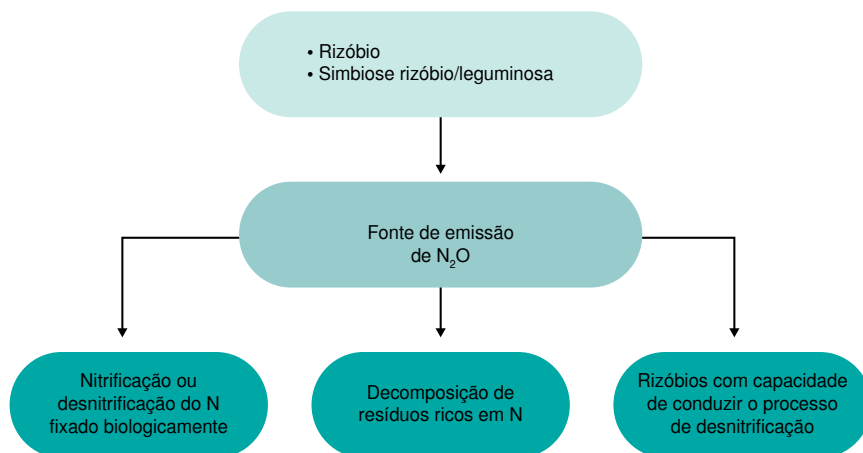
O aumento das emissões de  $N_2O$  em áreas cultivadas com soja pode também estar relacionado às mudanças na composição de espécies de populações microbianas do solo e à alta diversidade comumente detectada na rizosfera de leguminosas (OSBORNE et al., 2010). O aumento de substratos prontamente disponíveis nessa região da raiz estimularia o crescimento microbiano, promovendo o consumo de oxigênio. Isto poderia criar condições temporárias de anaerobiose, favorendo o processo de desnitrificação (LEMKE et al., 2007). Existem também evidências que sugerem que o aumento na população de microrganismos associados ao sistema de raízes em leguminosas inclui bactérias desnitrificadoras (ZHONG et al., 2009).

O processo de FBN pode, também, aumentar as emissões de  $N_2O$  quando o inoculante utilizado contém rizóbios capazes de realizar o processo de desnitrificação (O'HARA; DANIEL, 1985). A existência de atividade desnitrificadora em bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* é conhecida há longo tempo (RAJAGOPALAN, 1938). Os genes *nirK*, *norB* e *nosZ*, que codificam para as enzimas do processo da desnitrificação, foram encontrados no cromossomo dessa bactéria (MESA et al., 2001). Ademais, células desses microrganismos, quando em vida livre, são também capazes de reduzir nitrato a nitrogênio gasoso. Visto por outro ângulo, a presença do gene *nosZ*, que codifica para a enzima responsável pela redução do  $N_2O$  para  $N_2$ , em raízes de soja noduladas com *B. japonicum*, seria uma forma dessa simbiose atuar como dreno de óxido nitroso (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006). Itakura et al. (2013) relataram menor emissão de  $N_2O$  em soja

inoculada com *Bradyrhizobium* contendo alta atividade do gene *nosZ*. Esses autores também demonstraram, em condições de campo, que a emissão de  $N_2O$ , após a colheita da soja, decorrente da degradação dos nódulos, pode também ser mitigada com a utilização de estirpes *nosZ*<sup>+</sup>. Do mesmo modo, Akiyama et al. (2016) demonstraram que a emissão de  $N_2O$ , em campos de soja, pode ser mitigada pela inoculação de uma cultura mista de *Bradyrhizobium diazoefficiens* indígenos.

Entretanto, alguns resultados obtidos de experimentos com soja, sob condições controladas, têm levantado dúvidas sob a real contribuição do processo de fixação simbiótica na emissão de  $N_2O$ . Yang e Cai (2005) demonstraram que as diferenças nos fluxos de  $N_2O$  entre vasos cultivados com soja e aqueles que permaneceram sem cultura não foram significativas até o período de enchimento dos grãos. Do total de  $N_2O$  emitido, cerca de 94% ocorreu entre aquele período e a maturação da soja. Além disso, a colheita prematura da parte aérea das plantas, em vários estágios de crescimento, estimulou substancialmente a emissão de  $N_2O$  do solo. Esses resultados demonstraram que o processo de fixação simbiótica do  $N_2$ , em si, não estimula a produção e emissão de  $N_2O$ , e sim a senescência e decomposição das raízes e nódulos nos últimos estágios de crescimento da planta. Resultados similares foram obtidos em experimento de campo, com a cultura da soja, tanto no Canadá como na Argentina (CIAMPITTI et al., 2008).

A despeito da magnitude de algumas estimativas feitas sobre a emissão de  $N_2O$ , em áreas cultivadas com leguminosas, relatos que confirmem a existência de uma relação entre a FBN e a emissão de  $N_2O$  são raros (ZHONG et al., 2009). De acordo com Jensen et al. (2012), a discrepância entre resultados relativos ao potencial de emissão de  $N_2O$  pelas leguminosas poderia estar associada às perdas desse gás por meio de outros processos no solo, não associados à fixação biológica de  $N_2$  (Figura 39). Esses poderiam incluir a desnitrificação do  $NO_3^-$  oriundo de fertilizantes nitrogenados utilizados na cultura antecessora ao cultivo da soja, conforme também observado por Zhong et al. (2011).



**Figura 39.** Possíveis processos associados às perdas de N<sub>2</sub>O na simbiose rizóbio/leguminosa.

### ***9.3.4. Práticas de manejo de solo e a emissão de óxido nitroso***

Vários trabalhos têm relatado aumentos nas emissões de N<sub>2</sub>O em solo sob plantio direto (PD) quando comparado ao plantio convencional (SPC) (LIU et al., 2007; ROCHETTE, 2008). Escobar et al. (2010) relataram que a emissão de N<sub>2</sub>O foi três vezes maior no PD, em relação ao SPC. A maior umidade do solo no PD, em decorrência da manutenção dos resíduos culturais na superfície do solo pode aumentar a atividade microbiana, consumindo o O<sub>2</sub> e criando microssítios anaeróbios. Do mesmo modo, o aumento da temperatura do solo decorrente da manutenção dos resíduos pode estimular a atividade enzimática dos nitrificadores e desnitrificadores, aumentando as emissões de N<sub>2</sub>O. Entretanto, apesar desses resultados, os efeitos de práticas de manejo na emissão de N<sub>2</sub>O ainda são controversos (Tabela 26), uma vez que, sob determinadas condições, nenhuma diferença mensurável na emissão deste gás foi encontrada em diferentes sistemas de manejo do solo (ELMI et al., 2003; JANTALIA et al., 2008).

**Tabela 26.** Resultados obtidos de emissões de  $N_2O$  em diferentes sistemas de produção.

Resultados obtidos	Referência
Maiores emissões de $N_2O$ foram obtidas em sistema de plantio direto, quando comparado com o convencional, como resultado do aumento no conteúdo de água no solo.	Ball et al. (1999)
Não foram obtidas diferenças nas emissões de $N_2O$ entre os sistemas de cultivo convencional e o plantio direto.	Elmi et al. (2003)
A aplicação de dejetos líquidos de suínos, em plantio direto, não aumentou a emissão acumulada de óxido nitroso, em relação à aplicação em sistema de preparo reduzido do solo. Em ambos os casos, a perda de N pela emissão daquele gás representou menos de 0,3 % da quantidade total de N aplicada. Nesse caso específico o aumento do espaço poroso ocupado por água resultou em maiores emissões de $N_2O$ .	Giacomini et al. (2006)
A maior ou menor emissão de $N_2O$ em sistema de plantio direto foi dependente do tipo de solo.	Rochette et al. (2008)
O plantio direto é uma forma de mitigar as emissões de $N_2O$ , quando comparado ao sistema de plantio convencional. Embora a umidade do solo seja um fator relevante relacionado ao aumento das emissões de $N_2O$ , ele não foi importante em controlar essas emissões em sistema de plantio direto.	Piva et al. (2012)

Estudos conduzidos pela Universidade de Purdue (Indiana/EUA) revelaram que o plantio direto, juntamente com a rotação soja/milho, reduziu as emissões de óxido nitroso em 57 % em relação ao preparo de solo com grade de disco (responsável pela mistura dos resíduos de cultura na superfície) e, em 40 % em relação ao preparo do solo com arado. Segundo Rochette (2008) solos de média a boa aeração, em sistema de plantio direto, não aumentaram as emissões de  $N_2O$  em relação ao cultivo convencional. No plantio convencional a maior mineralização do N dos resíduos vegetais incorporados e a maior exposição da matéria orgânica lábil, proveniente da quebra de agregados do solo, podem aumentar as emissões de  $N_2O$

(PARKIN; KASPAR, 2006; PASSIANOTO et al., 2003). Esses resultados contraditórios demonstraram que o impacto de sistemas de cultivo sobre a emissão de  $N_2O$  pode ser altamente sensível às condições ambientais locais (clima, tipo de solo), fazendo com que os resultados variem de região para região.

A incorporação no solo de resíduos de culturas pode resultar em aumento na emissão de  $N_2O$  (BAGGS et al., 2002), dependendo da quantidade introduzida e de sua composição química (KAISER et al., 1998). Isso sugere que a seleção de plantas de cobertura é um importante aspecto a ser considerado em práticas que visam à mitigação daquele gás (PIMENTEL, 2014). Resíduos com baixa razão C:N, tais como as de leguminosas, emitem mais  $N_2O$  no início do ciclo da cultura (BAGGS et al., 2000). Quando os resíduos apresentam altas concentrações de compostos recalcitrantes, como lignina e polifenóis, o N torna-se menos disponível no solo e a emissão de  $N_2O$  pode ser reduzida (GOMES et al., 2009).

O sistema de plantio direto surgiu frente à necessidade de tornar mais sustentável a produção agrícola. Dentre os diversos benefícios dessa prática, estaria o aumento do estoque de C no solo (sequestro de C). Entretanto, segundo Smith e Conen (2004), seria uma atitude prematura promover a adoção do plantio direto no sentido de mitigar o aquecimento global, até que dados confiáveis do fluxo de  $N_2O$  sejam confrontados com avaliações relativas ao sequestro de C. Trabalho conduzido por Piva et al (2012) demonstrou menor emissão de  $N_2O$  e maior sequestro de C em área com plantio direto comparativamente à área com cultivo convencional.

### Sequestro de carbono

A redução na emissão líquida de  $CO_2$  para a atmosfera, de solos agrícolas, é sinônimo de aumento no armazenamento de carbono, um processo usualmente referido como sequestro de carbono. A magnitude desse processo depende do balanço entre a quantidade de C que entra no solo ('input' de C) e a quantidade que sai ('output' de C). Os 'input' de C no solo ocorrem, principalmente, na forma de resíduos de culturas, oriundos do processo de fotossíntese, tanto abaixo como acima da superfície do solo. Os 'output' de C são, principalmente, consequências da remoção e queima da biomassa vegetal após a colheita das culturas, da decomposição dos resíduos orgânicos e das perdas de carbono pela erosão.

### **9.3.5. Práticas de manejo de solo que visam reduzir as emissões de óxido nitroso**

Qualquer estratégia que aumente a eficácia da utilização de fertilizantes nitrogenados poderá reduzir as emissões de óxido nitroso. Segundo Follett et al. (2005), algumas práticas que serão relacionadas a seguir, podem ser recomendadas para reduzir as emissões de  $N_2O$ . Logicamente que seriam necessárias adaptações específicas para cada local no sentido de selecionar as opções mais adequadas. Dentre essas práticas, podem ser citadas:

- melhorar a eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados por meio da sua aplicação em períodos de maior demanda da planta. Aplicações mais frequentes e em doses menores podem evitar o suprimento de N não utilizável pela cultura;
- minimizar o movimento de água na superfície do solo e abaixo da zona de enraizamento da cultura;
- observar as previsões do tempo antes da aplicação do fertilizante nitrogenado;
- programar a irrigação de modo a tornar mais eficiente a utilização do nitrogênio;
- utilizar fertilizantes nitrogenados orgânicos e inorgânicos de lenta liberação;
- utilizar aditivos químicos para inibir o processo de nitrificação, como os inibidores da nitrificação. Os inibidores da nitrificação (IN) foram originalmente desenvolvidos para reduzir a lixiviação de nitrato, mas são hoje considerados uma opção para mitigar as emissões de  $N_2O$ , tanto pelo processo de nitrificação como de desnitrificação. A eficiência dos inibidores da nitrificação na diminuição da emissão desse gás depende de muitos fatores, incluindo temperatura, ocorrência de chuvas e textura do solo (GILSANZ et al., 2016), o que faz com que a eficácia dessas substâncias, em uma localização específica, não possa ser extrapolada para outra.
- utilizar culturas de cobertura com sistema de enraizamento profundo, que possam utilizar o N residual;

- selecionar características genéticas da planta que aumentem a eficiência do uso de N;
- manejar áreas com animais confinados para minimizar o processo de nitrificação;
- aplicar substratos orgânicos ao solo em quantidades e tempo determinados, conforme princípios agrônômicos.

Em adição às práticas acima recomendadas, Follett et al. (2005) propõem uma lista de prioridades de pesquisas, necessárias para promover avanços no entendimento da emissão de gases traços do ciclo do N:

- investigar os ciclos do C, N, P e S, juntamente com o manejo do ecossistema total;
- avaliar as emissões sazonais e totais de  $N_2O$  em diferentes sistemas agrícolas;
- avaliar a contribuição potencial direta ou indireta de sistemas que incluem o uso de resíduos orgânicos (esterco animal, biossólidos, sub-produtos agrícolas, entre outros) na emissão de  $N_2O$  e agregar esse potencial a uma escala nacional;
- desenvolver modelos de simulação que sejam de fácil utilização para descrever emissões de  $N_2O$  dos sistemas agrícolas e que sejam aceitos por agências reguladoras, em nível local e regional;
- desenvolver tecnologias de sensoriamento remoto para determinar as taxas, tempo e localização das emissões de  $N_2O$ , em vários sistemas agrícolas;
- desenvolver sistemas agrícolas produtivos e sustentáveis que também minimizem a emissão de  $N_2O$  e o potencial líquido de aquecimento global;
- desenvolver e melhorar as técnicas de amostragens para determinações básicas e validação das medidas de emissão de  $N_2O$  de sistemas agrícolas;
- estudar o manejo de outros nutrientes que possam afetar a adequada utilização do N pelas plantas. O número de pesquisas neste sentido é muito limitado.



Associada a essas prioridades, podem também ser considerados estudos que intensifiquem o papel dos exsudatos de raízes na inibição da atividade dos desnitrificadores. Conforme descrito anteriormente, certas plantas podem afetar o metabolismo de bactérias envolvidas no processo de emissão de  $N_2O$  por meio da liberação de determinados exsudatos radiculares (DASSONVILLE et al., 2011). Esses autores demonstraram que determinada área invadida pela planta *Fallopia* spp., por vários anos, apresentava baixas taxas de desnitrificação, associado a um decréscimo na abundância de bactérias desnitrificadoras. Mais tarde, Bardon et al. (2014), estudando este mesmo gênero de planta, demonstraram uma inibição de 92 % na desnitrificação biológica de 15 estirpes de bactérias desnitrificadoras. A redução na atividade metabólica anaeróbia desses microrganismos foi correlacionada com as concentrações de catequina e foi dependente da dose. Outras substâncias associadas à *Fallopia* spp., as procianidinas, estão também envolvidas na inibição da desnitrificação biológica (BARDON et al., 2016).

### 10. Considerações finais

O grande desafio do setor agrícola nas próximas décadas será aumentar a produção de alimentos para atender à demanda de uma população em constante crescimento. Para que isto ocorra, a utilização de fertilizantes nitrogenados terá um papel fundamental, uma vez que o N é um nutriente importante para todos os seres vivos e, em geral, o que mais limita a produtividade das culturas. Entretanto, um dos problemas com a utilização de fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, raramente ultrapassando 30 - 40 %. Isto ocorre porque esse elemento apresenta um acentuado dinamismo no sistema solo, em consequência das transformações a que está sujeito e que podem levar a perdas deste elemento para o ambiente por meio da volatilização de amônia, lixiviação do nitrato e emissão de  $N_2$ ,  $N_2O$  e de outros óxidos de nitrogênio. Os aspectos ambientais negativos envolvem a eutrofização, acidificação e aquecimento global com fortes implicações na sustentabilidade dos agroecossistemas e na saúde humana. Diversas doenças como o câncer e problemas respiratórios têm sido associadas ao consumo de água contaminada com nitrato. Deve-se também considerar o processo industrial que transforma o  $N_2$  em amônia, base para a produção dos fertilizantes nitrogenados que envolve a queima de combustíveis fósseis.

A predominância do N na forma mais reduzida ou oxidada, que regem as perdas de N para o ambiente, depende dos tipos de processos que predominam em determinado solo após a aplicação do fertilizante. A relevância de muitos deles no ciclo do N ainda não é completamente entendida, uma vez que novos processos foram descobertos somente em meados do século XXI. Sabe-se, entretanto, que tais processos são influenciados por fatores ambientais, o que conduz à necessidade de considerar diferenças climáticas regionais e características de cada solo, para a viabilização de soluções técnicas para o aumento da eficiência de uso do N pelas culturas.

O processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o maior provedor deste nutriente para a manutenção da vida na terra e permite que o agricultor não aumente o seu custo de produção com a compra de fertilizantes. Hoje, no Brasil, um dos exemplos mais bem sucedidos de FBN é o caso da soja, em que a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio substitui totalmente a utilização de fertilizantes nitrogenados. Várias bactérias fixadoras de  $N_2$  já foram encontradas em associação com culturas não leguminosas, como o milho e o arroz, vislumbrando um cenário de maior economia no uso de fertilizantes nitrogenados, não só para as leguminosas.

A pecuária é outro setor que se destaca por desempenhar importante papel no ciclo global do nitrogênio. O Brasil possui hoje o maior rebanho comercial do mundo que contribui com 65 % das emissões de  $N_2O$ . Os processos ambientais negativos da pecuária envolvem, além do desmatamento da Amazônia e do Cerrado, uma grande produção de dejetos que influenciam diretamente no processo de emissão de  $N_2O$ . Assim, é necessário avaliar todas as etapas do processo produtivo de bovinos no sentido de obter uma produção sustentável, com menos emissões de  $N_2O$  e de outros gases de efeito estufa.

Em síntese, torna-se fundamental o conhecimento das relações entre as várias formas de nitrogênio no solo, na atmosfera e aquelas adicionadas com os fertilizantes, para que possam encontrar medidas mitigatórias dos impactos ambientais negativos resultantes dos processos envolvidos no ciclo do N. O grande propósito hoje é otimizar o uso de fertilizantes nitrogenados para sustentar a vida humana, minimizando os impactos negativos oriundos de sua utilização. Isto vem sendo o objetivo de um grande número de pesquisas e um enorme desafio do século XXI.

### Referências

- AARNINK, A. J. A.; VERSTEGEN, M. W. A. Nutrition, key factor to reduce environmental load from pig production. **Livestock Science**, v. 109, n. 1-3, p. 194-203, 2007.
- AGUILERA, E.; LASSALETTA, L.; SANZ-COBENA, A.; GARNIER, J.; VALLEJO, A. The potential of organic fertilizers and water management to reduce N<sub>2</sub>O emissions in mediterranean climate cropping systems: a review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 164, p. 32-52, 2013.
- AKIYAMA, H.; YAN, X.; YAGI, K. Nitrification, ammonia oxidizing communities, and N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes in an imperfectly drained agricultural field fertilized with coated urea with and without dicyandiamide. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 2, p. 213-223, 2013.
- AKIYAMA, H.; HOSHINO, Y. T.; ITAKURA, M.; SHIMOMURA, Y. WANG, Y.; YAMAMOTO, A.; TAGO, K.; NAKAJIMA, Y.; MINAMISAWA, K.; HAYATSU, M. Mitigation of soil N<sub>2</sub>O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-8, 2016. Article 32869.
- ALEXANDER, D. B. Bacteria and archaea. In: SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. p. 44-71.
- ALMARAZ, J. J.; ZHOU, X.; MABOOD, F.; MADRAMOOTOO, C.; ROCHETTE, P.; MA, B. L.; SMITH, D. L. Greenhouse gas fluxes associated with soybean production under two tillage systems in southwestern Quebec. **Soil and Tillage Research**, v. 104, n. 1, p. 134-139, 2009.
- ALMEIDA, F. F. D.; ARAÚJO, A. P.; ALVES, B. J. R. Sementes com alta concentração de molibdênio aumentaram o crescimento e a aquisição de nitrogênio de plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio ou sob fertilização nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 2, p. 367-378, 2013.
- ALVAREZ, C.; CONSTANTINI, A.; ALVAREZ, C. R.; ALVES, B. J. R.; JANTALIA, C. P.; MARTELLOTTO, E. E.; URQUIAGA, S. Soil nitrous oxide emissions under different management practices in the semiarid region of the Argentinian Pampas. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 94, n. 2-3, p. 209-220, 2012.
- ALVES, B. J. R.; JANTALIA, C. P.; MADARI, B. E.; MACHADO, P. L. O. A.; FRANCHINI, J. C.; SANTOS, H. P. dos; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Emissões de óxido nítrico de solos pelo uso de fertilizantes nitrogenados em áreas agrícolas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 6 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 126).
- ALVES, A. C.; ALVES, T. C.; MACEDO, F. B.; BERNARDI, A. C. de C.; OLIVEIRA, P. P. A. de, ROCHETTI, R. C. **Adição de zeólita para redução da volatilização de amônia em solo fertilizado com ureia**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 4 p. ((Embrapa Pecuária Sudeste. Circular técnica, 55).
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO SETOR DE FERTILIZANTES. São Paulo: ANDA, 2016.
- ARAÚJO, A. S. **Efeito do biochar de lodo de esgoto na redução das emissões de óxido nítrico do solo sob condições de incubação**. 2015. 38 f. Monografia (Graduação) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2016**. São Paulo, 2016.

- BAGGS, E. M.; REES, R. M.; SMITH, K. A.; VINTEN, A. J. A. Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. **Soil Use Management**, v. 16, n. 2, p. 82-87, 2000.
- BAGGS, E. M.; REES, R. M.; CASTLE, K.; SCOTT, A.; SMITH, K.A.; VINTEN, A.J.A. Nitrous oxide release from soils receiving N-rich crop residues and paper mill sludge in eastern Scotland. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, v. 90, n. 2, p. 109-113, 2002.
- BAI, R.; CHEN, X.; HE, J., SHEN, J.; ZHANG, L. *Candidatus* Brocadia and *Candidatus* Kuenenia predominated in anammox bacterial community in selected chinese paddy soils. **Journal of Soils Sediments**, v. 15, n. 9, p. 1977-1986, 2015.
- BAKHSH, A.; KANWAR, R. S.; KARLEN, D. L. Effects of liquid swine manure applications on NO<sub>3</sub>-N leaching losses to subsurface drainage water from loamy soils in Iowa. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 109, n. 1-2, p. 118-128, 2005.
- BALANDREAU, J. The spermosphere model to select for plant growth promoting rhizobacteria. In: KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A. (Ed.). **Biofertilisers in action**. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. p. 55-63.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOE, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARFMANN, A.; GILLIS, M.; DSBEREINER J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.
- BALL, B. C.; SCOTT, A.; PARKER, J. P. Field N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes in relation to tillage, compaction and soil quality in Scotland. **Soil Tillage Research**, v. 53, n. 1, p. 29-39, 1999.
- BANERJEE, B.; PATHAK, H.; AGGARWAL, P. K. Effects of dicyandiamide, farmyard manure and irrigation on crop yields and ammonia volatilization from an alluvial soil under a rice (*Oryza sativa* L.)-wheat (*Triticum aestivum* L.) cropping system. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 3, p. 207-214, 2002.
- BARBOSA FILHO, M. P.; COBUCCI, T.; MENDES, P. N. **Cultivo do feijão irrigado na região noroeste de Minas Gerais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. (Embrapa Arroz e Feijão. Sistema de Produção, 5).
- BARDON, C.; PIOLA, F.; BELLVERT, F.; HAICHAR, F. Z.; COMTE, G.; MEIFFREN, G.; POMMIER, T.; PUJALON, S.; TSAFACK, N.; POLY, F. Evidence for biological denitrification inhibitor (BDI) by plant secondary metabolites. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 620-630, 2014.
- BARDON, C.; PIOLA, F.; HAICHAR FEL, Z.; MEIFFREN, G.; COMTE, G.; MISSERY, B.; BALBY, M.; POLY, F. Identification of B-type procyanidins in *Fallopia* spp. involved in biological denitrification inhibition. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 644-655, 2016.
- BARTH, G. **Inibidores de urease e de nitrificação na eficiência de uso de adubos nitrogenados**. 2009. 78 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

- BARTON, L.; KIESE, R.; GATTER, D. D.; BUTTERBACH-BAHL, K.; BUCK, R.; HINZ, C.H.R. I.; MURPHY, D. V. Nitrous oxide emissions from a cropped soil in a semi-arid climate. **Global Change Biology**, v. 14, n. 1, p. 177-192, 2008.
- BARTON, L.; THAMO, T.; ENGELBRECHT, D.; BISWAS, W. K. Does growing grain legumes or applying lime cost effectively lower greenhouse gas emissions from wheat production in a semi-arid climate? **Journal of Cleaning Production**, v. 83, p. 194-203, 2014.
- BAYER, C; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 21, n. 1, p. 105-112, 1997.
- BEGUM, A. A.; LEIBOVITCH, S.; MIGNER, P.; ZHANG, F. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p. 71-80, 2001.
- BEHRENDT, U.; SCHUMANN, P.; STIEGLMEIER, M.; PUKALL, R.; AUGUSTIN, J.; SPRÖER, C.; SCHWENDNER, P.; MOISSL-EICHINGER, C.; ANDREAS, U. Characterization of heterotrophic nitrifying bacteria with respiratory ammonification and denitrification activity – Description of *Paenibacillus uliginis* sp. nov., an inhabitant of fen peat soil and *Paenibacillus purispattii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly clean room. **Systematic Applied microbiology**, v. 33, n. 6, p. 328-336, 2010.
- BEIJERINCK, M. W. Rhizobial systematic. **Botany Zeitung**, v. 46, p. 796-804, 1888.
- BELL, M. J.; HINTON, N.; CLOY, J. M.; TOPP, C. F. E.; REES, R. M.; CARDENAS, L.; SCOTT, T.; WEBSTER, C.; ASHTON, R. W.; WHITMORE, A. P.; WILLIAMS, J. R.; BALSHAW, H.; PAINE, F.; GOULDING, K. W. T.; CHADWICK, D. R. Nitrous oxide emissions from fertilized UK arable soils: Fluxes, emission factors and mitigation. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 212, p. 134-147, 2015.
- BELLENGER, J. P.; WICHARD, T.; XU, Y.; KRAEPIEL, A. M. L. Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N<sub>2</sub> bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1395-1411, 2011.
- BENSON, D. R.; BROOKS, J. M.; HUANG, Y.; BICKHART, D. M.; MASTRONUNZIO, J. E. The biology of *Frankia* sp. strains in the post-genome era. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1310-1316, 2011.
- BERGGREN, I.; ALSTRÖM, S.; VUURDE, J. W. L. van; MARTENSSON, A. M. Rhizoplane colonization of peas by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* and a deleterious *Pseudomonas putida*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 1, p. 71-78, 2005.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y. B.; KUPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, v. 294, n. 5546, p. 1534-1547, 2001.
- BHATIA, A.; SASMAL, N. J.; PATHAK, H.; KUMAR, R.; SINGH, A. Mitigating nitrous oxide emission from soil under conventional and no-tillage in wheat using nitrification inhibitors. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 136, n. 3-4, p. 247-253, 2010.
- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2007.

- BITTENCOURT, S.; SERRAT, B. M.; AISSE, M. M.; GOMES, D. Sewage sludge usage in agriculture: a case study of its destination in the Curitiba metropolitan region, Paraná, Brazil. **Water Air and Soil Pollution**, v. 225, n. 9, p. 1-8, 2014. Article 2074.
- BOARETTO, R. M.; QUAGGIO, J. A.; MATTOS, D.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O. Absorção por plantas de laranjeira de amônia volatilizada da uréia fertilizantes. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 28.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 12.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 10.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 7., 2008, Londrina. **Desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental**: anais. Londrina: Embrapa Soja: SBRS: IAPAR, UEL, 2008. 1 CD-ROM.
- BOARETTO, R. M.; MATTOS, J. R. D.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O. Absorption of  $^{15}\text{NH}_3$  volatilized from urea by Citrus trees. **Plant and Soil**, v. 365, n. 1-2, p. 283-290, 2013.
- BOLANOS-VASQUEZ, M. C.; WERNER, D. Effect of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 3, p. 339-346, 1997.
- BORBA, R. P.; DE CAMARGO, O. A.; KIRA, C. S.; COSCIONE, A. R.  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  leaching and solubilization of Al in variable charge soils treated with sewage sludge. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, n. 6, p. 4625-4638, 2015.
- BOUWMAN, A. F. **Method to estimate direct nitrous oxide emissions from agricultural soils**. Bilthoven: National Institute of Public Health and Environment Protection, 1994. (Report n. 773004004 - 28).
- BREMNER, J. M.; AHMAD, N. Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 321-329, 1995.
- BRIERLEY, E. D. R.; WOOD, M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 1403-1409, 2001.
- BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 245-252, 2008.
- BROMFIELD, E. S. P.; BUTLER, G.; BARRAN, L. R. Temporal effects on the composition of a population of *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus alba*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 567-573, 2001.
- BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 923-929, 1997.
- BUSSE, M. D. Suitability and use of the  $^{15}\text{N}$ -isotope dilution method to estimate nitrogen fixation by actinorhizal shrubs. **Forest Ecology and Management**, v. 136, n. 1-3, p. 85-95, 2000.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an  $\text{N}_2$ -fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1165-1172, 2004.
- CAMPO, R. J.; LANTMANN, A. F. Efeitos de micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio e produtividade da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1245-1253, 1998.

## Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2007. 1017 p.

CANTARELLA, H.; MONTEZANO, Z. F. Nitrogênio e enxofre. In: PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. (Ed.). **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: nutrientes**. Piracicaba: IPNI, 2010. v. 2, p. 1-65.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; GALLO, P.B.; BOLONHEZI, D.; ROSSETTO, R.; MARTINS, A.L.M.; PAULINO, V.T.; ALCÂNTARA, P.B. Ammonia losses of NBPT-treated urea under Brazilian soil conditions. In: INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS, Frankfurt, 2005. **Proceedings...** Paris: International Fertilizer Industry Association, 2005. 1 CD-ROM.

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

CARDENAS, L. M.; THORMAN, R.; ASHLEE, N.; BUTLER, M.; CHADWICK, D.; CHAMBERS, B.; CUTTLE, S.; DONOVAN, N.; KINGSTON, H.; LANE, S.; DHANOA, M. S.; SCHOLEFIELD, D. Quantifying annual N<sub>2</sub>O emission fluxes from grazed grassland under a range of inorganic fertilizer nitrogen inputs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 136, n. 3-4, p. 218-226, 2010.

CARDOSO, B F.; OYAMADA, G. C.; DA SILVA, C. M. Produção, tratamento e uso de dejetos suínos no Brasil. **Desenvolvimento em Questão**, v. 13, n. 32, p. 127-145, 2015.

CARMEN VILLEGAS, V. M. del; SOPHIE, R.; LUCETTE, M.; DOMERGUE, O.; GARDAN, L.; BALLY, X.; CLEYET-MAREL, J.; BRUNEL, B. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (*bv. medicaeagnis*) of *S. meliloti*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 526-538, 2006.

CARMO, J. B.; ANDRADE, C. A.; CERRI, C. C.; PICOLLO, M. C. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N<sub>2</sub>O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 5, p. 735-746, 2005.

CARVALHO, A. M. de; ALVES, B. J. B.; PEREIRA, L. L. **Emissão de óxido nitroso do solo com aplicação de fontes de fertilizantes nitrogenados em sistema plantio direto no cerrado**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 7 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 281).

CARVALHO, M. T. M.; MADARI, B. E.; LEAL, W. G. O.; COSTA, A. R.; MACHADO, P. L. O. A.; SILVEIRA, P. M. A.; MOREIRA, J. A. A.; HEINEMANN, A. B. Fluxos de nitrogênio em feijoeiro irrigado influenciados pela cobertura morta e a fertilização mineral. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 478-486, 2013.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988.

CAYUELA, M. L.; SANCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; HANLEY, K.; ENDERS, A.; LEHMANN, J. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N<sub>2</sub>O emissions? **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-7, 2013.

CERETTA, C. A.; PAVINOTO, P. S.; MOREIRA, I. C. L.; GIROTTO, E.; TRENTIN, E. E. Micronutrientes na soja. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 576-581, 2005.



- CEREZINI, P.; KUWANOA, B. H.; SANTOS, M. B.; TERASSI, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. N. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160-167, 2016.
- CHALK, P. M.; SMITH, C. J. Chemodenitrification. In: FRENEY, J. R.; SIMPSON, J. R. (Ed.). **Gaseous loss of nitrogen from plant-soil systems**. The Hague: Martinus Nijhoff, 1983. p. 65-89. (Developments in Plant and Soils Sciences, v. 9).
- CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SELVAKUMAR, G.; SUNDARAM, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria: prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38-53, 2015.
- CHEN, Q.; QI, L.; BI, Q.; DAI, P.; SUN, D.; SUN, C.; LIU, W.; LU, L.; NI, W.; LIN, X. Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. **Applied and Microbiol Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 477-487, 2015.
- CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. L.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2174-2179, 2008.
- CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.
- CHEN, W. M.; LAEVEENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.
- CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.
- CHENG, Y.; ZHANG, J.; WANG, J.; CAI, Z.; WANG, S. Soil pH is a good predictor of the dominating N<sub>2</sub>O production processes under aerobic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, n. 3, p. 370-373, 2015
- CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1641-1649, 2015.
- CHOWDARY, N. H.; RAO, N. H.; SARMA, P. B. S. Decision support framework for assessment of non-point-source pollution of groundwater in large irrigation projects. **Agricultural Water Management**, v. 75, n. 3, p. 94-225, 2005.
- CHRISTENSEN, S.; SIMKINS, S.; TIEDJE, J. M. Spatial variability in soil denitrification: occurrence of activity centers (hot spots) as influenced by the soil environment. **Soil Science Society of American Journal**, v. 54, n. 6, p. 1608-1613, 1990.
- CHRONÁKOVÁ, A.; RADL, V.; CUHEL, J.; SIMEK, M.; ELHOTTOVÁ, D.; ENGEL, M.; SCHLOTTER, M. Overwintering management on upland pasture causes shifts in an abundance of denitrifying microbial communities, their activity and N<sub>2</sub>O-reducing ability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1132-1138, 2009.



- CHU, H.; GROGAN, P. Soil microbial biomass, nutrient availability and nitrogen mineralization potential among vegetation-types in a low arctic tundra landscape. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1-2, p. 411-420, 2010.
- CIAMPITTI, I. A.; CIARLO, E.A.; CONTI, M. E. Nitrous oxide emissions from soil during soybean [(*Glycine max* (L.) Merrill)] crop phenological stages and stubbles decomposition period. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 4, p. 581-588, 2008.
- CLAYTON, H.; ARAH, J. R. M.; SMITH, K. A. Measurement of nitrous oxide emissions from fertilized grassland using closed chambers. **Journal Geophysical Research**, v. 99, n. 8, p. 16599-16607, 1994.
- CONRAD, J. P. The nature of the catalyst causing the hydrolysis of urea in soils. **Soil Science**, v. 50, n. 2, p. 119-134, 1940.
- CORSI, M.; MARTHA JR, G. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; PENATI, M. A.; PAGOTTO, D. S.; SANTOS, P. M.; BARIONI, L. G. Tendências e perspectivas da produção de bovinos sob pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2011. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p. 3-69.
- COSTA, E.; PÉREZ, J.; KREFT, J. U. Why is metabolic labour divided in nitrification? **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 213-219, 2006.
- COSTA, E. M. da. **New *Bradyrhizobium* species from soils of different Brazilian regions: taxonomy and symbiotic efficiency.** 2016. 224 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CUHEL, J.; SIMEK, M.; LAUGHLIN, R. J.; BRU, D.; CHENEBY, D.; WATSON, C. J.; PHILIPPOT, L. Insights into the effect of soil pH on N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions and denitrifier community size and activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p.1870-1878, 2010.
- DA ROS, C. O.; AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Volatilização de amônia com aplicação de ureia na superfície do solo, no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 799-805, 2005.
- DAIMS, H.; LEBEDEVA, E. V.; PJEVAC, P.; HAN, P.; HERBOLD, C.; ALBERTSEN, M.; JEHLICH, N.; PALATINSZKY, M.; VIERHEILIG, J.; BULAEV, A.; KIKEGAARD, R. H.; BERGEN, M. von; RATTEI, T.; BENDINGER, B.; NIELSEN, P. H.; WAGNER, M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, n. 7583, v. 528, p. 504-509, 2015.
- DASSONVILLE, N.; GUILLAUMAUD, N.; PIOLA, F.; MEERTS, P.; POLY, F. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. **Biological Invasions**, v. 13, n. 5, p. 1115-1133, 2011.
- DAVIDSON, E. A. The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. **Nature Geosciences**, v. 2, n. 9, p. 659-662, 2009.
- DAWSON, C. J.; HILTON, J. Fertilizer availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. **Food Policy**, v. 36, p. S14-S22, 2011
- DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E.; LIU, B.; CLEENWERCK, I.; WILLEMS, A.; FROSTEGARD, A. *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinicae* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1746-1753, 2013.
- DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*,

*Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 1997.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MELO I. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group la strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3342–3351, 2013.

DENMEAD, O. T.; FRENEY, J. R.; DUNIN, F. X. Gas exchange between plant canopies and the atmosphere: Case-studies for ammonia. **Atmosphere and Environment**, v. 42, n. 14, p. 3394-3406, 2008.

DI, H. J.; CAMERON, K. C. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 64, n. 3, p. 237-256, 2002.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M. V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.155-166.

DIDONET, A. D.; LIMA, O. S.; CANDATEN, A. A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 401-411, 2000.

DÍEZ-LÓPEZ, J. A.; HERNAIZ-ALGARRA, P.; ARAUZO-SÁNCHEZ, M.; CARRASCO-MARTÍN, I. Effect of a nitrification inhibitor (DMPP) on nitrate leaching and maize yield during two growing seasons. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 2, p. 294-303, 2008.

DING, H.; YIP, C. B.; HYNES, M. F. Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 328-339, 2013.

DÖBEREINER J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v. 1, p. 261-272, 1958.

DOBERMANN, A. Nitrogen use efficiency-State of the art. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS, 2005, Frankfurt. **Proceedings...** Paris: International Fertilizer Industry Association, 2005. 1 CD-ROM.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G. J. A.; MARTIN, T. N.; da SILVA, M. R.; PAVINATO, P. S.; HABITZREITER, T. L. Adubação mineral com cobalto e molibdênio na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2741-2752, 2012. Suplemento 1.

DURÁN, D.; REY, L.; NAVARRO, A.; BUSQUETS, A.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESP, T. *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 336-341, 2014.

DRAGOSITS, U.; THEOBALD, M. R.; PLACE, C. J.; LORD, E.; WEBB, J.; HILL, J.; APSIMON, H. M.; SUTTON, M. A. Ammonia emission, deposition and impact assessment at the field scale: a case study of sub-grid spatial variability. **Environmental Pollution**, v. 117, n. 1, p. 147-158, 2002.

DRAGOSITS, U.; THEOBALD M. R.; PLACE C. J.; APSIMON H. M.; SUTTON M. A. The potential for spatial planning at the landscape level to mitigate the effects of atmospheric ammonia deposition. **Environmental Science and Policy**, v. 9, n. 7-8, p. 626-638, 2006.

DUARTE, D. S. A. **Perdas de amônia por volatilização em solo tratado com ureia, na presença de resíduos culturais**. 2007. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 353-357, 2007.

DYNIA, J. F. Nitrate retention and leaching in variable charge soils of a watershed in São Paulo state, Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 31, n. 5-6, p. 777-791, 2000.

EGGLESTON, H. S.; BUENDIA, L.; MIKA, K.; NGARA, T.; TANAKE, K. (Ed.). **2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories**. Hayama: IGES, 2006.

EICHNER, M. J. Nitrous oxide emission from fertilized soils: summary of available data. **Journal of Environmental Quality**, v. 19, n. 2, p. 272-280, 1990.

ELMI, A. A.; MADRAMOOTOO, C.; HAMEL, C.; LIU, A. Denitrification and nitrous oxide to nitrous oxide plus dinitrogen ratios in the soil profile under three tillage systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 340-348, 2003.

ERGUDER, T. H.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. **FEMS Microbiological Review**, v. 33, n. 5, p. 855-869, 2009.

ERIKSEN, J.; ASKEGAARD, M.; SØEGAARD, K. Residual effect and nitrate leaching in grass-arable rotations: Effect of grassland proportion, sward type and fertilizer history. **Soil Use Management**, v. 24, n. 4, p. 373-382, 2008.

ESCHBACH, M.; MÖBITZ, H.; ROMPF, A.; JAHN, D. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 2, p. 227-230, 2003.

ESCOBAR, L. F.; AMADO, T. J. C.; BAYER, C.; CHAVEZ, L. F.; ZANATTA, J. A.; FIORIN, J. E. Postharvest nitrous oxide emissions from a subtropical oxisol as influenced by summer crop residues and their management. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 507-516, 2010.

ESTADOS UNIDOS. Geological Service. **Nitrogen (fixed): ammonia**. Disponível em: <<https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/nitrogen/mcs-2014-nitro.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2017a.

ESTADOS UNIDOS. National Aeronautics and Space Administration. **NASA and NOAA announce ozone hole is a double record breaker**. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:NASA\\_and\\_NOAA\\_Announce\\_Ozone\\_Hole\\_is\\_a\\_Double\\_Record\\_Breaker.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:NASA_and_NOAA_Announce_Ozone_Hole_is_a_Double_Record_Breaker.png)>. Acesso em: 9 set. 2017b.

FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G.; SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. **Nature**, v. 315, n. 6016, p. 207-210, 1985.

FELIX, E. P.; CARDOSO, A. A. Amônia (NH<sub>3</sub>) atmosférica: fontes, transformação, sorvedouros e métodos de análise. **Química Nova** v. 27, n. 1, p. 123-130, 2004.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, 2001.

FERREIRA, D. A. **Eficiência agrônômica da uréia revestida com polímero na adubação do milho**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FERREIRA, P. A. A.; BOMFETI, C. A.; SOARES, B. L.; MOREIRA, F. M. S. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1947-1959, 2012.

FEY, R.; M. C. L.; ZOZ, T.; RICHART, A.; LUCHESE, E. B. Relações entre lixiviação de nitrato e produção de biomassa do milho com dejetos suínos provenientes de diferentes tratamentos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 212-218, 2010.

FILOSO, S.; MARTINELLI, L. A.; HOWARTH, R. W.; BOYER, E. W.; DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. In: MARTINELLI, L. A.; HOWARTH, R. W. (Ed.). **Nitrogen cycling in the Americas: natural and anthropogenic influences and controls**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 61-89.

FISK, L. M.; MACCARONE, L. D.; BARTON, L.; MURPHY, D. V. Nitrapyrin decreased nitrification of nitrogen released from soil organic matter but not *amoA* gene abundance at high soil temperature. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 88, p. 214-223, 2015.

FIXAÇÃO biológica de nitrogênio. Brasília, DF: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>>. Acesso em: 8 set. 2017.

FOLLETT, R. F.; SHAFER, S. R.; FRANZLUEBBERS, A. J. Research and implementation needs to mitigate greenhouse gas emissions from agriculture in the USA. **Soil Tillage Research**, v. 83, n. 1, p. 159-166, 2005.

FRANCO, G. C. de. **Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da fixação biológica e atividade da urease**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRATTINI, D.; CINTI, G.; BIDINI, G.; DESIDERI, U.; CIOFFI, R.; JANNELLI, E. A system approach in energy evaluation of different renewable energies sources integration in ammonia production plants. **Renewable Energy**, v. 99, p. 472-482, 2016.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.

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

FRYE, W. Nitrification inhibition for nitrogen efficiency and environment protection. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS, 2005, Frankfurt. **Proceedings...** Paris: International Fertilizer Industry Association, 2005. 1 CD-ROM.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALLES, R.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov. associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p.1305-1314, 2001

FUJII, T.; HUANG, YI-DE.; HIGASHITANI, A.; NISHIMURA, Y.; IYAMA, S.; HIROTA, Y.; YONEYAMA, T.; DIXON, R. A. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. **Plant and Soil**, v. 103, n. 2, p. 221-226, 1987.

- GAGNON, H.; IBRAHIM, R. K. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 10, p. 988-998, 1998.
- GALBALLY, I. E. The emission of nitrogen to the remote atmosphere: background paper. In: GALLOWAY, J. N.; CHARLSON, E. J.; ANDREA, M. O.; RODHE, H. (Ed.). **The biogeochemical cycling of sulphur and nitrogen in the remote atmosphere**. Dordrecht: Springer, 1985. p. 27-53.
- GALLO, A. S. GUIMARÃES, N. de F.; SOUZA, M. D. B. de; AGOSTINHO, P. R.; GOMES, S. de S.; SILVA, R. F. da. Produtividade da cultura do feijoeiro em sucessão a adubos verdes, com adição de dejetos líquidos de suínos. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 114, n. 1, p. 45-51, 2015.
- GAN, Y.; STULEN I.; KEULEN H. van; KUIPER P. J. C. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and  $N_2$  fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW  $g^{-1}$  root dry weight) and specific  $N_2$  fixation ( $N_2$  fixed  $g^{-1}$  root dry weight) in soybean. **Plant and Soil**, v. 258, n. 1, p. 281-292, 2004.
- GANGULY, T. K.; JANA, A. K.; MOITRA, D. N. An evaluation of agronomic potential of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus megaterium* in fibre-legume-cereal system in an Aerobic haplaquept. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 1, p. 35-39, 1999.
- GANNES, V. de; EUDOXIE, G.; HICKEY, W. J. Impacts of edaphic factors on communities of ammonia-oxidizing archaea, ammonia-oxidizing bacteria and nitrification in tropical soils. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89568, 2014.
- GARCIA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain maize genotype associations as evaluated by the  $^{15}N$  isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 249-256, 1996.
- GARLAND, G. M.; SUDDICH, E.; BURGER, M.; HORWATH, W. R.; SIX, J. Direct  $N_2O$  emissions following transition from conventional till to no-till in a cover cropped Mediterranean vineyard (*Vitis cinifera*). **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 141, n. 1-2, p. 234-239, 2011.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R. G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2058-2067, 2010.
- GELAIN, E.; ROSA JUNIOR, E. J.; MERCADANTE, F. M.; FORTES, D. G.; SOUZA, F. R.; ROSA, Y. B. C. J. Fixação biológica de nitrogênio e teores foliares de nutrientes na soja em função de doses de molibdênio e gesso agrícola. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 259-269, 2011.
- GELFAND, I.; CUI, M.; TANG, J.; ROBERTSON, G. P. Short-term drought response of  $N_2O$  and  $CO_2$  emissions from mesic agricultural soils in the US Midwest. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 212, p. 127-133, 2015.
- GIACOMINI, S. J.; JANTALIA, C. P.; AITA, C.; URQUIAGA, S. S.; ALVES, B. J. R. Emissão de óxido nítrico com a aplicação de dejetos líquidos de suínos em solo sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1653-1661, 2006.
- GILES, M.; MORLEY, N.; BAGGS, E. M.; DANIELL, T. J. Soil nitrate reducing processes – drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2012.
- GILSANZ, C.; BÁEZ, D.; MISSELBROOK, T. H.; DHANOA, M. S. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 216, p. 1-8, 2016.

- GLEESON, D. B.; MÜLLER, C.; BANERJEE, S.; MA, W.; SICILIANO, S. D.; MURPHY, D. V. Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to changing water filled pore space. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1888-1891, 2010.
- GOMES, M. A. F.; SOUZA, M. D. de; BOEIRA, R. C.; TOLEDO, L. G. de. **Nutrientes vegetais no meio ambiente**: ciclos biogeoquímicos, fertilizantes e corretivos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 50 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 18).
- GOMES, J.; BAYER, C.; COSTA, F. S.; PICCOLO, M. C.; ZANATTA, J. A.; VIEIRA, F.C.B.; SIX, J. Soil nitrous oxide emissions in long-term cover crops-based rotations under subtropical climate. **Soil and Tillage Research**, v. 106, n. 1, p. 36-44, 2009.
- GONÇALVES, C. E. A. **Estudo da produção de óxido nitroso em cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos.
- GOOD, A. G.; BEATTY, P. H. Fertilizing Nature: A Tragedy of Excess in the Commons. **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001124, 2011.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.
- GREEN, S. J.; PRAKASH, O.; GIHRING T. M.; AKOB, D. M.; JASROTIA, P.; JARDINE, P. M.; Watson, D. B.; BROWN, S. D.; Palumbo, A. V.; KOSTKA, J. E. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 10, p. 3244-3254, 2010.
- GRIZZETTI, B.; BOURAOUI, F.; BILLEN, G.; GRINSVEN, H. van; CARDOSO, A. C.; THIEU, V.; GARNIER, J.; CURTIS, C.; HOWARTH, R.; JOHNES, P. Nitrogen as a threat to European water quality. In: SUTTON, M.; HOWARD, C. M.; ERISMAN, J. W.; BILLEN, G.; BLEEKER, A.; GRENNFELT, P.; GRINSVEN, H. V.; GRIZZETTI, B. (Ed.). **The European Nitrogen Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 379-404, 2011.
- GUERTAL, E. A. Slow-release nitrogen fertilizers in vegetable production: a review. **HortTechnology**, v. 19, n. 1, p. 16-19, 2009.
- GUIMARÃES, G. G. F. **Substâncias húmicas como aditivos para o controle da volatilização de amônia proveniente da ureia**. 2011. 26 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GUO, Y. J.; DI, H. J.; CAMERON, K. C.; LI, B.; PODOLYAN, A.; MOIR, J. L.; MONAGHAN, R. M.; SMITH, L. C.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; WAUGH, D.; HE, J. Effect of 7-year application of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on soil microbial biomass, protease and deaminase activities, and the abundance of bacteria and archaea in pasture soils. **Journal of Soils and Sediments**, v. 13, n. 4, p. 753-759, 2013.
- HALL, W. Benefits of enhanced-efficiency fertilizers for the environment. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS, 1, 2005, Frankfurt. **Anais...** Paris: International Fertilizer Industry Association, 2005. 1 CD ROM.
- HALLIN, S.; JONES, C. M.; SCHLOTTER, M.; PHILIPPOT, L. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. **The ISME Journal**, v. 3, n. 5, p. 597-605, 2009.

HARGROVE, W. I. Soil environmental and management factors influencing ammonia volatilization under field conditions. In: BOCK, B. R.; KISSEL, D. E. (Ed.). **Ammonia volatilization from urea fertilizers**. Alabama: NFDC: TVA, 1988. p. 17-36.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 33-45, 2008.

HAYNES, R. J.; WILLIAMS, P. H. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. **Advances in Agronomy**, v. 49, p. 119-199, 1993

HE, J.; SHEN, J.; ZHANG, L.; ZHU, Y.; ZHENG, Y.; XU, M.; DI, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2364-2374, 2007.

HE, F. F.; LIANG, Y. S.; YI, Z. Y.; RONG, X. M.; WU, A. P.; LIU, Q. Effects of combined application of manure and chemical fertilizer on the nitrification in acid vegetable soil. **Plant Nutrition and Fertilizer Science**, v. 20, n. 3, p. 534-540, 2014.

HEFFER, P.; PRUD'HOMME, M. **Fertilizer outlook 2013-2017**: 81st IFA Annual Conference. Paris: IFA, 2013. 8 p.

HEIL, J.; VEREecken, H.; BRÜGGEMANN, N. A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. **European Journal of Soil Science**, v. 67, n. 1, p. 23-39, 2016.

HENRY, S.; TEXIER, S.; HALLET, S.; BRU, D.; DAMBREVILLE, C.; CHENEY, D.; BIZOUARD, F.; GERMON, J. C.; PHILIPPOT, L. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 3082-3092, 2008.

HEROLD, M. B.; BAGGS, E. M.; DANIELL, T. J. Fungal and bacterial denitrification are differently affected by long-term pH amendment and cultivation of arable soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 54, p. 25-35, 2012.

HOFFMANN, L. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2007. p. 153-164.

HOLTAN-HARTWIG, L.; BECHMANN, M.; HØYÅS, T. R.; LINJORDET, R.; BAKKEN, L. R. Heavy metals tolerance of soil denitrifying communities: N<sub>2</sub>O dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 1181-1190, 2002.

HOU, M.; OHKAMA-OHTSU, N.; SUZUKI, S.; TANAKA, H.; SCHMIDHALTER, U.; BELL-INGRATH-KIMURA, S. D. Nitrous oxide emission from tea soil under different fertilizer managements in Japan. **Catena**, v. 135, p. 304-312, 2015.

HOUGHTON, J. T.; DING, Y.; GRIGGS, D. J.; NOGUER, M.; LINDEN, P. J. van der; DAI, X.; MASKELL, K.; JOHNSON, C. A. (Ed.). **Climate change 2001**: the scientific basis: contribution of working group 1 to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 881 p.

HUANG, R.; WU, Y.; ZHANG, J.; ZHONG, W.; JIA, Z.; CAI, Z. Nitrification activity and putative ammonia-oxidizing archaea in acidic red soils. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, n. 3, p. 420-428, 2012.



- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011b. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na perspectiva do Mercosul: novos conhecimentos e tecnologias disponíveis. In: CONGRESO DE LA SOJA DEL MERCOSUR, 5.; FORO DE LA SOJA ASIA, 1., 2011, Rosário. **Un grano**: um universo. [Rosário: Asociación de la Cadena de la Soja Argentina], 2011a. 2 p. 1 CD-ROM.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.; ARAUJO, R. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 811-817, 2015.
- INSELSBACHER, E.; WANEK, W.; RIPKA, K.; HACKL, E.; SESSITSCH, A.; STRAUSS, J.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Greenhouse gas fluxes respond to different N fertilizer types due to altered plant-soil-microbe interactions. **Plant and Soil**, v. 343, n. 1-2, p. 17-35, 2011.
- INSELSBACHER, E.; HINKO-NAJERA UMANA, N.; STANGE, F. C.; GORFER, M.; SCHULLER, E.; RIPKA, K.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; HOOD-NOVOTNY, R.; STRAUSS, J.; WANEK, W. Short-term competition between crop plants and soil microbes for inorganic N fertilizer. **Soil Biology Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 360-372, 2010.
- INTERNATIONAL PLANT NUTRITION INSTITUTE. **Consumo de fertilizantes por região, nutrientes e natureza física**. Piracicaba, 2016.
- ISLAM, A.; CHEN, D.; WHITE, R. E. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 972-975, 2007.
- ITAKURA, M.; UCHIDA, Y.; AKIYAMA, H.; HOSHINO, Y. T.; SHIMOMURA, Y.; MORIMOTO, S.; TAGO, K.; WANG, Y.; HAYAKAWA, C.; UETAKE, Y.; SÁNCHEZ, C.; EDA, S.; HAYSTSU, M.; MINAMISAWA, K. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 3, p. 208-212, 2013.
- JABLOUN, M.; SCHELDE, K.; TAO, F.; OLESEN, J. E. Effect of temperature and precipitation on nitrate leaching from organic cereal cropping systems in Denmark. **European Journal of Agronomy**, v. 62, p. 55-64, 2015.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**, v. 17, p. 77-119, 1998.
- JANTALIA, C. P.; ZOTARELLI, L.; SANTOS, H. P.; TORRES, E.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Em busca da mitigação da produção de óxido nitroso em sistemas agrícolas: avaliação de práticas usadas na produção de grãos do sul do País. In: ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; AITA, C.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Manejo de sistemas agrícolas**: impacto no sequestro de C e nas emissões de gases de efeito estufa. Porto Alegre: Genesis, 2006. p. 81-108.



- JANTALIA, C. P.; SANTOS, H. P.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 82, n. 2, p. 161-173, 2008.
- JARVIS, B. D. W.; BERKUM, P. van; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to a new genus: *Mesorhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997.
- JENKINSON, D. S. The impact of humans on the nitrogen cycle with focus on temperate arable agriculture. **Plant and Soil**, v. 228, n. 1, p. 3-15, 2001.
- JENSEN, E. S.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M.; GRESSHOFF, P. M.; HANGGAARD-NIELSEN, H.; ALVES, B. J. R.; MORRISON, M. J. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 2, p. 329-364, 2012.
- JI, B.; YANG, K.; ZHU, L.; JIANG, Y.; WANG, H.; ZHOU, J.; ZHANG, H. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 4, p. 643-651, 2015.
- JIA, Z. J.; CONRAD, R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1658-1671, 2009.
- JIANG, N. N.; LI, Y. E.; HUA, L.; WAN, Y. F.; SHI, S. W. Effect of different nitrogen sources and straw adding on N<sub>2</sub>O emission from vegetable soil. **Chinese Journal of Soil Science**, v. 43, n. 1, p. 219-223, 2012.
- JÖNCK, F.; GAVA, A.; TRAVERSO, S. D.; LUCIOLI, J.; FURLAN, F. H.; GUELLER, E. Intoxicação espontânea e experimental por nitrato/nitrito em bovinos alimentados com Avena sativa (aveia) e/ou Lolium spp. (azevém). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1062-1070, 2013.
- JONES, C. M.; STRES, B.; ROSENQUIST, M.; HALLIN, S. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. **Molecular and Biological Evolution**, v. 25, n. 9, p. 1955-1966, 2008.
- KAISER, D. R. **Nitrato na solução do solo e na água de fontes para consumo humano numa microbacia hidrográfica produtora de fumo**. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- KAISER, E. A.; KOHRS, K.; KÜCKE, M.; SCHNUG, E.; HEINEMEYER, O.; MUNCH, J. C. Nitrous oxide release from arable soil: importance of N-fertilization, crops and temporal variation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 12, p. 1553-1563, 1998.
- KELLING, K. A.; WALSH, L. M.; KEENEY, D. R.; RYAN, J. A.; PETERSON, A. E. A field study of the agricultural use of sewage sludge: II. Effect on soil N and P. **Journal of Environmental Quality**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 1977.
- KESSEL, M. A. H. J.; SPETH, D. R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P. H.; Op den CAMP, H. J. M.; KARTAL, B.; JETTEN, M. S. M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555-559, 2015.
- KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soils. **Research in Microbiology**, v. 140, n. 9, p. 679-693, 1989.

- KIESE, R.; HEINZELLER, C.; WERNER, C.; WOCHLE, S.; GROTE, R.; BUTTERBACH-BAHL, K. Quantification of nitrate leaching from German forest ecosystems by use of a process oriented biogeochemical model. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 11, p. 3204-3214, 2011.
- KIM, Y.; NAKAYAMA, N.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, M.; SHIMADA, S.; ARIHARA, J. NO and N<sub>2</sub>O emissions from fields in the different nodulated genotypes of soybean. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 74, n. 4, p. 427-430, 2005.
- KINNEY, T. J.; MASIELLO, C. A.; DUGAN, B.; HOCKADAY, W. C. DEAN, M. R.; ZYGOURAKIS, K.; BARNES, R. T. Hydrologic properties of biochars produced at different temperatures. **Biomass and Bioenergy**, v. 41, p. 34-43, 2012.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C<sub>4</sub>-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 157-168, 2001.
- KISS, S.; SIMIHÁIAN, M. Comparative studies on the efficiency of different inhibitors of soil urease activity. In: KISS, S.; SIMIHÁIAN, M. (Ed.). **Improving efficiency of urea fertilizers by inhibition of soil urease activity**. Dordrecht: Springer Science, 2002. p.187-220.
- KLEIN, C. A.M.; BARTON, L.; SHERLOCK, R. R.; LI, Z.; LITTLEJOHN, R. P. Estimating a nitrous oxide emission factor for animal urine from some new Zealand pastoral soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 41, n. 3, p. 381-399, 2003.
- KNOLL, A. H. Cyanobacteria and earth history. In: HERRERO, A.; FLORES, E. (Ed). **The Cyanobacteria. Molecular biology, genomics and evolution**. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. p. 1-19.
- KÖNNEKE, M.; BERNHARD, A. E.; DE LA TORRE, J. R.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J. B.; STAHL, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 543-546, 2005.
- KOOL, D. M.; DOLFING, J.; WRAGE, N.; VAN GROENIGEN, J. W. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 174-178, 2011.
- KOOPS, H.; POMMERENING-RÖSER, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 21, p. 7428-7432, 1987.
- KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H. E. Microbial nitrate respiration: genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p. 104-117, 2011.
- KRAFT, B.; TEGETMEYER, H. E.; SHARMA, R.; KLOTZ, M. G.; FELDELMAN, T. G.; HETTICH, R. L.; GEELHOED, J. S.; STROUS, M. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration. **Science**, v. 345, n. 6197, p. 676-679, 2014.
- KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *B. japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *B. elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 501-505, 1992.
- LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS,

- M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.
- LAM, S. K.; SUTER, H.; DAVIES, R.; BAI, M.; SUN, JIANLEI, CHEN, D. Measurement and mitigation of nitrous oxide emissions from a high nitrogen input vegetable system. **Scientific Reports**, v. 5, p.1-5, 2015.
- LANG, E.; SCHUMANN, P.; ADLER, S.; SPRÖER, C.; SAHIN, N. *Azorhizobium oxalatophilum* sp. nov., and emended description of the genus *Azorhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1505-1511, 2013. PAREI AQUI PAREI AQUI
- LARA CABEZAS, W. A. R.; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH<sub>3</sub> na cultura do milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluidas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 21, n. 3, p. 489-496, 1997.
- LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 2-17, 2014.
- LARIMER, F. W.; CHAIN, P.; HAUSER, L.; LAMERDIN, J.; MALFATTI, S.; DO, L.; LAND, M. L.; PELLETIER, A. D.; BEATTY, J. T.; LANG, A. S.; TABITA, F. R.; GIBSON, J. L.; HANSON, T. E.; BOBST, C.; TORRES, J. L.; PERES, C.; HARRISON, F. H.; GIBSON, J.; HARWOOD, C. S. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 55-61, 2004.
- LARRAÍN, P. **Nueva generación de fertilizantes nitrogenados con inhibidor de la nitrificación**. Santiago do Chile: COMPOAGRO, 2003. 1 Folder.
- LAUGHLIN, R. J.; STEVENS, R. J.; MÜLLER, C.; WATSON, C. J. Evidence that fungi can oxidize NH<sub>4</sub><sup>+</sup> to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in a grassland soil. **European Journal of Soil Science**, v. 59, n. 2, p. 285-291, 2008.
- LAUGHLIN, R. J.; STEVENS, R. J. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1540-1548, 2002.
- LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1812-1836, 2011.
- LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G. W.; PROSSER, J. I.; SCHUSTER, S. C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, v. 422, n. 7104, p. 806-809, 2006.
- LEITE, J.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017. In press.
- LEMOES, M. J. **Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com *Azospirillum brasilense* e à adubação nitrogenada em cobertura**. 2011. 62 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.
- LEMKE, R. L.; ZHONG, Z.; CAMPBELL, C. A.; ZENTNER, R. Can Pulse Crops Play a Role in Mitigating Greenhouse Gases from North American Agriculture? **Agronomy Journal**, v. 99, n. 6, p. 1719-1725, 2007.

- LI, Q. Q.; WANG, E. T.; CHANG, Y. L.; ZHANG, Y. Z.; ZHANG, Y. M.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. *Ensifer sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1981-1988, 2011.
- LI, X.; ZHU, Y.G.; CAVAGNARO, T. R.; CHEN, M.; SUN, J.; CHEN, X.; QIAO, M.. Do ammonia-oxidizing archaea respond to soil Cu contamination similarly as ammonia-oxidizing bacteria? **Plant and Soil**, v. 324, n. 1-2, p. 209-217, 2009.
- LIMA, M. L. A. de. **Águas subterrâneas potencialmente impactadas por nitrato NO<sub>3</sub> na área urbana da cidade de Porto Velho**: um estudo da geografia da saúde. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.
- LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A.; HSU, Y. H.; HUANG, H. I.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1353-1458.
- LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research Journal of Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 453-463, 2010.
- LINQUIST, B. A.; ADVIENTO-BORBE, M. A.; PITTELKOW, C. M.; KESSEL, C. van; GROENIGEN, J. K. van. Fertilizer management practices and greenhouse gas emissions from rice systems: a quantitative review and analysis. **Field Crops Research**, v. 135, p. 10-21, 2012.
- LIPÓRIO, P. H. S.; TORNELI, I. M. B.; NÓBILE, F. O. de; GUERREIRO, R.D.; MIGUEL, F.B.; SILVA, J. A. A.da. Avaliação de híbridos de milho quanto a inoculação e adubação nitrogenada. **Ciência e Tecnologia**, Jaboticabal, v. 7, p. 5, 2015. Número especial.
- LIU, X. J.; MOSIER, A. R.; HALVORSON, A. D.; REULE, C. A.; ZHANG, F. S. Dinitrogen and N<sub>2</sub>O emissions in arable soils: Effect of tillage, N source and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 2362-2370, 2007.
- LÖHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal of Agronomy Research**, v. 20, n. 7, p. 543-556, 1921.
- LONGERI, L., VIDAL, I.; LÓPEZ, I. Influencia de la nitrapirina sobre la transformación del nitrógeno de la urea y rendimiento de maíz. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 14, n. 1, p. 15-22, 1988.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, S.; DÍEZ, J. A.; HERNAIZ, P.; ARCE, A.; GARCÍA-TORRES, L.; VALLEJO, A. Effects of fertiliser type and the presence or absence of plants on nitrous oxide emissions from irrigated soils. **Nutrient Cycling of Agroecosystems**, v. 78, n. 3, p. 279-289, 2007.
- LUCZKIEWICZ, A. Soil and groundwater contamination as a result of sewage sludge land application. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 6, p. 869, 2006.
- LUO, G. J.; KIESE, R.; WOLF, B.; BUTTERBACH-BAHL, K. Effects of soil temperature and moisture on methane uptake and nitrous oxide emissions across three different ecosystem types. **Biogeosciences**, v. 10, n. 5, p. 3205-3219, 2013.
- MACLAIN, J. E. T.; MARTENS, D. A. Moisture controls on trace gas fluxes in semiarid riparian soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 2, p. 367-377, 2006.
- MAEDA, K.; SPOR, A.; EDEL-HERMANN, V.; HERAUD, C.; BREUIL, M.; BIZOUARD, F.; TOYODA, S.; YOSHIDA, N.; STEINBERG, C.; PHILIPPOT, L. N<sub>2</sub>O production, a widespread trait in fungi. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9697, 2015.
- MAGALHÃES, F. M. M.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A. new acid-tolerant

- Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. n. 4, 417-430, 1983.
- MANTOVANI, A.; ERNANI, P. R.; SANGOI, L. A adição de superfosfato triplo e a percolação de nitrogênio no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 5, p. 887-895, 2007.
- MANUNZA, B.; DEIANA, S.; PINTORE, M.; GESSA, C. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(Nbutyl)phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 789-796, 1999.
- MARCELINO, R. **Inibidor de nitrificação em fertilizantes nitrogenados e rendimento de milho**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.
- MARCHESAN, E.; GROHS, M.; WALKER, M.; SILVA, L. S.; FORMENTINI, T. C. Desempenho agrônômico do arroz irrigado ao uso de inibidor de urease em dois sistemas de cultivo. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 3, p. 594-603, 2013.
- MARCONDES, A. L. M. **Volatilização de amônia de adubos nitrogenados aplicados em superfície na cultura do milho em ambientes distintos**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, marechal Cândido Rondon.
- MARCONDES, J. A. P.; CAIRES, E. F. Aplicação de molibdênio e cobalto na semente para cultivo da soja. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 687-694, 2005.
- MARTENS-HABBENA, W.; STAHL, D. A. Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. **Methods in Enzymology**, v. 496, p. 465-487, 2011.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: Overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 11-23, 2003.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSENBERG, E.; DeLONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Ed.). **Prokaryotes**. Berlin: Springer, 2006. v. 2, p. 798-817.
- MASSIMILIANO, A. M.; BELL, M.; LESTER, D.; ROWLINGS, W.; SCHEER, C.; DE ROSA, D.; GRACE, P. R. Comparison of grain yields and N<sub>2</sub>O emissions on Oxisol and Vertisol soils in response to fertiliser N applied as urea or urea coated with the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate. **Soil Research**, v. 54, n. 5, p. 552-564, 2016.
- MATHESON, F. E.; NGUYEN, M. L.; COOPER, A. B.; BURT, T. P.; BULL, D. C. Fate of <sup>15</sup>N-nitrate in unplanted, planted and harvested riparian wetland soil microcosms. **Ecological Engineering**, v. 19, p. 249-264, 2002.
- MATSUZAKA, E.; NOMURA, N.; MASEDA, H.; OTAGAKI, H.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; NAKAHARA, T.; UCHIYAMA, H. Participation of nitrite reductase in conversion of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in a heterotrophic nitrifier, *Burkholderia cepacia* NH-17, with denitrification activity. **Microbes Environmental**, v. 18, n. 4, p. 203-209, 2003.
- MAYER, J.; BUEGGER, F.; JENSEN, E. S.; SCHLOTTER, M.; HEB, J. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a <sup>15</sup>N in situ stem labelling method. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 21-28, 2003.
- MAZZETTO, A. M.; BARNEZE, A. S.; FEIGL, B. J.; VAN GROENIGEN, J. W.; OENEMA, O.; DE KLEIN, C. A. M.; CERRI, C. C. Use of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) does not mitigate N<sub>2</sub>O emission from bovine urine patches under oxisol in Northwest Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 101, n. 1, p. 83-92, 2015.

- MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAÚJO, F. F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrarie**, v. 10, n. 2, p. 40-47, jul. 2014.
- MCCARTY, G. W. Models of action of nitrification inhibitors. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 1999.
- MEDEIROS, R.; SANTOS, B. J. M.; FREITAS, M.; SILVA, O. A.; ALVES, F. F.; FERREIRA, E. A adição de diferentes produtos químicos e o efeito da umidade na volatilização de amônia em cama de frango. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2321-2326, 2008.
- MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; SILVA, Z. A.; BARBOSA, R. C.; MARQUES, A. V. M. S.; NOGUEIRA, F. R. B. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2003.
- MEEKS, J. C. Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. **BioScience**, v. 48, n. 4, p. 266-276, 1998.
- MEEKS, J.; ELHAI, J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 94-121, 2002.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 620-624, 2007.
- MEISINGER, J. J.; CALDERÓN, F. J.; JENKINSON, D. S. Soil nitrogen budgets. In: SCHEPERS, J. S.; RAUN, W. R. (Ed.). **Nitrogen in agricultural systems**. Madison: American Society of Agronomy, 2008. p. 505-562. (Agronomy Monograph, 49).
- MERTENS, J.; BROOS, K.; WAKELIN, S. A.; KOWALCHUK, G. A.; SPRINGAEL, D.; SMOLDERS, E. Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil. **The ISME Journal**, v. 3, p. 916-923, 2009.
- MESA, S.; GOTTFERT, M.; BEDMAR, E. J. The *nir*, *nor*, and *nos* denitrification genes are dispersed over the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 1-2, p. 136-142, 2001.
- MILLER, M. N.; ZEBARTH, B. J.; DANDIE, C. E.; BURTON, D. L.; GOYER, C.; TREVORS, J. T. Crop residue influence on denitrification, N<sub>2</sub>O emissions and denitrifier community abundance in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 2553-2562, 2008.
- MISSELBROOK, T. H.; CARDENAS, L. M.; CAMP, V.; THORMAN, R. E.; WILLIAMS, J. R.; ROLLETT, A. J.; CHAMBERS, B. J. An assessment of nitrification inhibitors to reduce nitrous oxide emissions from UK agriculture. **Environmental Research Letters**, v. 9, n. 11, p. 115006, 2014.
- MKHABELA, M. S.; MADANI, A.; GORDON, R.; BURTON, D.; CUDMORE, D.; ELM, A. HART, W. Gaseous and leaching nitrogen losses from no-tillage and conventional tillage systems following surface application of cattle manure. **Soil and Tillage Research**, v. 98, n. 2, p. 187-199, 2008.
- MOAL, J. F.; MARTINEZ, J.; GUIZIOU, F.; COSTE, C. M. Ammonia volatilization following surface-applied pig and cattle slurry in France. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 25, n. 2, p. 245-252, 1995.
- MOHAN, S. B.; COLEN, J. A. The dissimilatory reduction of nitrate to ammonia by anaerobic bacteria. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S. J.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Biology of the nitrogen cycle**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 93-106.

- MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.
- MORALES, S. V.; LLOPIS, G. A.; TEJERIZO, P. M. Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain. **European Journal of Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 15-21, 1995.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729 p.
- MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.de; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, M.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.
- MORLEY, N.; BAGGS, E. M.; DÖRSCH, P.; BAKKEN, L. Production of NO, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> by extracted soil bacteria, regulation by NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and O<sub>2</sub> concentrations. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 65, n. 1, p. 102-112, 2008.
- MOSIER, A. R. Exchange of gaseous nitrogen compounds between terrestrial systems and the atmosphere. In: FOLLETT, R. F.; HATFIELD, J. L. (Ed.). **Nitrogen in the Environment: sources, problem, and management**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 920-926.
- MOSIER, A. R.; DUXBURY, J. M.; FRENEY, J. R.; HEINEMEYER, O.; MINAMI, K. Nitrous oxide emission from agricultural fields: assessment, measurements and mitigation. **Plant and Soil**, v. 181, n. 1, p. 95-108, 1995.
- MOSIER, A. R.; KROEZE, C.; NAVISON, C.; OENEMA, O.; SEITZINGER, S.; CLEEMPUT, O. van. Closing the global atmospheric N<sub>2</sub>O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 52, n. 2-3, p. 225-248, 1998.
- MOSIER, A. R.; PARTON, W. J.; HUTCHINSON, G. L. Modelling nitrous oxide evolution from cropped and native soils. **Ecology Bulletin**, v. 35, p. 229-241, 1983.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2-3, p. 121-132, 2002.
- MOTHAPO, N.; CHEN, H.; CUBETA, M. A.; GROSSMAN, J. M.; FULLER, F. Phylogenetic, taxonomic and functional diversity of fungal denitrifiers and associated N<sub>2</sub>O production efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 160-175, 2015.
- MOUSAVI, S. A.; ÖSTERMAN, J.; WAHLBERG, N.; NESME, X.; LAVIRE, C.; VIAL, L.; PAULIN, L.; LAJUDIE, P. de; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 208-215, 2014.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophic* against *Colletotrichum falcatum* Went.: a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, v. 78, n. 9, p. 1063-1065, 2000.
- MUZILLI, O. A influência do sistema de plantio direto, comparado ao convencional, sobre a fertilidade da camada arável do solo. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 7, n. 1, p. 95-102, 1983.



- NÁPOLES, M. C.; GUEVARA, E.; MONTERO, F.; ROSSI, A.; FERREIRA, A. Role of *Bradyrhizobium japonicum* induced by genistein on soybean stressed by water deficit. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 3, p. 665-671, 2009.
- NASCIMENTO, C. A. C.; FARIA, L. A.; VITTI, G. C.; ONO, E. L. K.; ZAVASCHI, E. Fly ash as zeolites for reducing nitrogen losses by volatilization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 3023-3032, 2012.
- NIERZWICKI-BAUER, S. A. *Azolla-Anabaena* symbiosis: use in agriculture. In: Rai A. N. (Ed). **Handbook of symbiotic cyano-bacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 119-136, 1990.
- NICOLELLA, A. C.; DRAGONE, D. S.; BACHA, C. J. C. Determinantes da demanda de fertilizantes no Brasil no período de 1970 a 2002. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 43, n. 1, 2005.
- OENEMA, O. Nitrogen budgets and losses in livestock systems. **International Congress Series**, v. 1293, p. 262-271, 2006.
- OGASAWARA, M.; SUZUKI, T.; MUTHOH, I.; ANNAPURNA, K.; ARORA, N. K.; NISHIMURA, Y.; MAHESWARI, D. K. *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. **Symbiosis**, v. 34, n. 1, p. 53-68, 2003.
- O'HARA, G. W.; DANIEL, R. M. Rhizobial denitrification: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 1985.
- OKADA, N.; NOMURA, N.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; UCHIYAMA, H. Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. Strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia. **Microbes Environment**, v. 20, n. 4, p. 208-215, 2005.
- OKANO, Y.; HRISTOVA, K. R.; LEUTENEGGER, C. M.; JACKSON, L. E.; DENISON, R. F.; GEBREYESUS, B.; LEBAUER, D.; SCOW, K. M. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1008-1016, 2004.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.
- OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200-201, p. 77-84, 2013.
- OLIVEIRA, F.; C.MATTAZZO, M. E. M.; MARCIANO, C. R.; MORAES, S. O. Lixiviação de nitrato em um latossolo amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 171-180, 2001.
- OLIVEIRA, J. A. de; STAFANATO, J. B.; GOULART, E. Z.; LIMA, E.; MAZUR, N.; PEREIRA, C. G.; SOUZA, H. N. de; COSTA, F. G. M. Volatilização de amônia proveniente de ureia compactada com enxofre e bentonita, em ambiente controlado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1558-1564, 2014.
- OSADA, T.; TAKADA, R.; SHINZATO, I. Potential reduction of greenhouse gas emission from swine manure by using a low-protein diet supplemented with synthetic amino acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 562-574, 2011.
- OSBORNE, B.; SAUNDERS, M.; WALMSLEY, D.; JONES, M.; SMITH, P. Key questions and uncertainties associated with the assessment of the cropland greenhouse gas balance. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 139, n. 3, p. 293-301, 2010.



PADHI, S. K.; TRIPATHY, S.; SEN, R.; MAHAPATRA, A. S.; MOHANTY, S.; MAITI, N. K. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 67-73, 2013.

PAIVA, D. M.; CANTARUTTI, R. B.; GUIMARÃES, G. G. F.; SILVA, I. R. Urea coated with oxidized charcoal reduces ammonia volatilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 4, p. 1221-1229, 2012.

PARK, S.; CROTEAU, P.; BOERING, K. A.; ETHERIDGE, D.M.; FERRETTI, D.; FRASER, P. J.; KIM, K-R, KRUMMEL, P. B.; LANGENFELDS, R. L.; VAN OMMEN, T. D.; STEELE, L. P.; TRUDINGER, C. M. Trends and seasonal cycles in the isotopic composition of nitrous oxide since 1940. **Nature Geoscience**, v. 5, n. 4, p. 261-265, 2012.

PARKIN, T. B.; KASPAR, T. C. Nitrous oxide emissions from corn-soybean system in the Midwest. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 4, p. 1496-1506, 2006.

PASCHKE, M. W.; DAWSON, J. O.; DAVID, M. B. Soil nitrogen mineralization in plantations of *Juglans nigra* interplanted with actinorhizal *Elaeagnus umbellata* or *Alnus glutinosa*. **Plant and Soil**, v. 118, n. 1/2, p. 33-42, 1989.

PASSIANOTO, C. C.; AHRENS, T.; FEIGL, B. J.; STEUDLER, P. A.; do CARMO, J. B.; MELILLO, J. M. Emissions of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and NO in conventional and no-till management practices in Rondônia, Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 4, p. 200-208, 2003.

PATRA, D. D.; KIRAN, U.; PANDE, P. Urease and nitrification retardation properties in natural essential oils and their by-products. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, n. 11-12, p. 1663-1673, 2006.

PECK, M. C.; FISHER, R. F.; LONG, S. R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5417-5427, 2006.

PELEGRIN, R. de; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 219-226, 2009.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1263-1271, 2006.

PERDOMO, C.C.; LIMA, G.J.M.M.; NONES, K. Produção de suínos e meio ambiente. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA SUINOCULTURA, 9., Gramado, RS, 2001. **Anais...** Concórdia : Embrapa Suínos e Aves, 2001. p. 8-24.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 269-274, 1988.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, 2006.

- PETTER, F. A.; DE LIMA, L. B.; MARIMON JÚNIOR, B. H.; DE MORAIS, L. A.; MARIMON, B. S. Impact of biochar on nitrous oxide emissions from upland rice. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 27-33, 2016.
- PFAB, H.; PALMER, I.; BUEGGER, F.; FIEDLER, S.; MÜLLER, T.; RUSER, R. Influence of a nitrification inhibitor and of placed N-fertilization on N<sub>2</sub>O fluxes from a vegetable cropped loamy soil. **Agricultural Ecosystem and Environment**, v. 150, p. 91-101, 2012.
- PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1577, n. 3, p. 355-376, 2002.
- PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; BÖRJESSON, G.; BAGGS, E. M. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 61-81, 2009.
- PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; MAXWELL, C. A. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1526-1531, 1992.
- PIHLATIE, M.; SYVÄSALO, E.; SIMOJOKI, A.; ESALA, M.; REGINA, K. Contribution of nitrification and denitrification to N<sub>2</sub>O production in peat, clay and loamy sand soils under different soil moisture conditions. **Nutrient Cycling Agroecosystem**, v. 70, n. 2, p. 135-141, 2004.
- PIMENTEL, L. G. **Emissão de óxido nitroso do solo em sistemas de sucessão de culturas e sua relação com a qualidade do resíduo vegetal**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- PITCAIRN, C. E. R., FOWLER, D., LEITH, I. D., SHEPPARD, L. J., SUTTON, M. A., KENNEDY, V., OKELLO, E. Bioindicators of enhanced nitrogen deposition. **Environmental Pollution**, v. 126, n. 3, p. 353-361, 2003.
- PIVA, J. T.; DIECKOW, J.; BAYER, C.; ZANATTA, J. A.; MORAES, A.; PAULETTI, V.; TOMAZI, M.; PERGHER, M. No-till reduces global warming potential in a subtropical Ferralsol. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1-2, p. 359-373, 2012.
- POLCYN, W.; PODESZWA, J. Coordinate induction of dissimilatory ammonification and fermentative pathways in rhizobia. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 1, p. 79-87, 2009.
- POLY, F.; WERTZ, S.; BROTHIER, E.; DEGRANGE, V. First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 1, p. 132-140, 2008.
- PORCHIA, A. C.; SALERNO, G. L. Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: presence of two sucrose-phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant enzymes. **Proceedings National of Academic Science**, v. 93, n. 24, p. 13600-13604, 1996.
- PORT, O.; AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Perda de nitrogênio por volatilização de amônia com o uso de dejetos de suínos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 857-865, 2003.
- PRENDERGAST-MILLER, M. T.; BAGGS, E. M.; JOHNSON, D. Nitrous oxide production by the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* and *Tylospora fibrillose*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 316, n. 1, p. 31-35, 2011.
- PYLE, J.; SHEPHERD, T. (Coord.). Ozone and climate: a review of interconnections. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Safeguarding the ozone layer and the global climate system**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. p. 83-132.

- QING, W.; LI-MEI, Z.; JU-PEI, S.; SHUAI, D.; LI-LI, H.; JI-ZHENG, H. Effects of dicyandiamide and acetylene on N<sub>2</sub>O emissions and ammonia oxidizers in a fluvo-aquic soil applied with urea. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 22, p. 23023-23033, 2016.
- RACETTE, S.; TORREY, J. G. Root nodule initiation in *Gymnostoma* (Casuarinaceae) and *Shepherdia* (Elaeagnaceae) induced by *Frankia* strain HFPgp1. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 10, p. 2873-2879, 1989.
- RAI, A. N.; SÖDERBÄCK, E.; BERGMAN, B. Cyanobacterium-plant symbioses. **New Phytologist**, v. 147, n. 3, p. 449-481, 2000.
- RAJAGOPALAN, T. Studies on groundnut nodule organism. IV Physiology of the organism: intermediary metabolism. **Indian Journal Agricultural Science**, v. 8, p. 379-402, 1938.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 43-51, 1987.
- REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFEÇS, M.; GUYON, S.; MAVINQUI, P.; BALDDANI, V. L.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, 2004.
- REMANS, R.; CROONENBORGH, A.; TORRES GUTIERREZ, R.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 341-351, 2007.
- REMANS, R.; RAMAEKERS, L.; SCHELKENS, S.; HERNANDEZ, G.; GARCIA, A.; REYES, J. L.; MENDEZ, N.; TOSCANO, V.; GALVEZ, M. M. L.; VANDERLEYDEN, J. Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1-2, p. 25-37, 2008.
- RENIERA, A.; JOPURANDA, P.; RAPIOR, S.; POINSOT, V.; SY, A.; DREYFUS, B.; MOULIN, L. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060T: A classic process for an atypical symbiont. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1404-1412, 2008.
- RHIJNET, P.; DESAIR, J.; VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J. Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT 899. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n. 5, p. 666-677, 1994.
- RICH, J. J.; DALE, O. R.; SONG, B.; WARD, B. B. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 2, p. 311-320, 2008.
- RICHES, A. D.; MATTNER, S. W.; DAVIES, R.; PORTER, I. J. Mitigation of nitrous oxide emissions with nitrification inhibitors in temperate vegetable cropping in southern Australia. **Soil Research**, v. 54, n. 5, p. 533-543, 2016.
- RINCÓN-ROSALES, R.; LLORET, L.; PONCE, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 1, p. 103-117, 2008.

- RIYA, S.; ZHOU, S.; WATANABE, Y.; SAGEHASHI, M.; TERADA, A.; HOSOMI, M. CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from different varieties of forage rice (*Oryza sativa* L.) treating liquid cattle waste. **Science of the Total Environment**, v. 419, n. 1, p. 178-186, 2012.
- RIZHIYA, E. Y.; BOITSOV, L. V.; BUCHKINA, N. P.; PANOVA, G. G. The Influence of crop residues with different C: N ratios on the N<sub>2</sub>O emission from a loamy sand soddy podzolic soil. **Eurasian Soil Science**, v. 44, n. 10, p. 1144-1151, 2011.
- ROCHETTE, P.; ANGERS, D. A.; BÉLANGER, G.; CHANTIGNY, M. H.; PRÉVOST, D.; LÉVESQUE, G. Emissions of N<sub>2</sub>O from alfalfa and soybean crops in eastern Canada. **Soil Science Society of American Journal**, v. 68, n. 2, p. 493-506, 2004.
- ROCHETTE, P. No-till only increases N<sub>2</sub>O emissions in poorly-aerated soils. **Soil and Tillage Research**, v. 101, n. 1-2, p. 97-100, 2008.
- ROCHETTE, P.; ANGERS, D. A.; CHANTIGNY, M. H.; BERTRAND, N. Nitrous oxide emissions respond differently to no-till in a loam and a heavy clay soil. **Soil Science Society of American Journal**, v. 72, n. 5, p. 1363-1369, 2008.
- ROCHETTE, P.; ANGERS, D. A.; CHANTIGNY, M. H.; MACDONALD, J. D. Ammonia volatilization following surface application of urea to tilled and no-till soils: a laboratory comparison. **Soil and Tillage Research**, v. 103, n. 2, p. 310-315, 2009.
- RODRIGUES, M. B.; KIEHL, J. C. Volatilização de amônia após emprego de uréia em diferentes doses e modos de aplicação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 10, n. 1, p. 37-43, 1986.
- ROJAS, C. A. L.; BAYER, C.; FONTOURA, S. M. V.; WEBER, M. A.; VIEIRO, F. Volatilização de amônia da uréia alterada por sistemas de preparo de solo e plantas de cobertura invernais no centro-sul do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 261-270, 2012.
- RONDON, M.; RAMIREZ, J. A.; LEHMANN, J. Charcoal additions reduce net emissions of greenhouse gases to the atmosphere. In: USDA SYMPOSIUM ON GREENHOUSE GASES AND CARBON SEQUESTRATION, 3., 2005, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: USDA, 2005. p. 208.
- RUDISILL, M. A.; TURCO, R. F.; HOAGLAND, L. A. Fertility practices and rhizosphere effects alter ammonia oxidizer community structure and potential nitrification activity in pepper production soils. **Applied Soil Ecology**, v. 99, p. 70-77, 2016.
- RUSER, R.; SCHULZ, R. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide release from agricultural soils: a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, n. 2, p. 171-188, 2015.
- RUSSENES, A. L.; KORSAETH, A.; BAKKEN, L. R.; DÖRSCH, P. Spatial variation in soil pH controls off-season N<sub>2</sub>O emission in an agricultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 99, p. 36-46, 2016.
- RÜTTING, T.; BOECKX, P.; MÜLLER, C.; KLEMEDTSSON, L. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. **Biogeosciences**, v. 8, n. 7, p. 1779-1791, 2011.
- RÜTTING, T.; HUYGENS, D.; MULLER, C.; CLEEMPUT, O.; GODOY, R.; BOECKX, P. Functional role of DNRA and nitrite reduction in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest. **Biogeochemistry**, v. 90, n. 3, p. 243-258, 2008.
- RYSGAARD, S.; GLUD, R. N.; SEJR, M. K.; BLICHER, M. E.; STAHL, H. J. Denitrification activity and oxygen dynamics in Arctic sea ice. **Polar Biology**, v. 31, n. 5, p. 527-537, 2008.
- SAGGAR, S.; JHA, N.; DESLIPPE, J.; BOLAN, N. S.; LUO, J.; GILTRAP, D. L.; KIM, D. G.; ZAMAN, M.; TILLMAN, R. W. Denitrification and N<sub>2</sub>O: N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: processes,

measurements, modelling and mitigating negative impacts. **Science and Total Environment**, v. 465, n. 1, p. 173-195, 2013.

SAMESHIMA-SAITO, R.; CHIBA, K.; HIRAYAMA, J.; ITAKURA, M.; MITSUI, H.; EDA, S.; MINAMISAWA, K. Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N<sub>2</sub>O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2526-2532, 2006.

SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; DICK, J.; BOCARY, K.; VALLEJO, A.; SKIBA, U. M. Residual effect of organic carbon as a tool for mitigating nitrogen oxides emissions in semi-arid climate. **Plant and Soil**, v. 44, n. 1-2, p. 999-1002, 2010.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SANZ-COBENA, A.; SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; GARCÍA-TORRES, L.; VALLEJO, A. Gaseous emissions of N<sub>2</sub>O and NO and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching from urea applied with urease and nitrification inhibitors to a maize (*Zea mays*) crop. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 149, n. 1, p. 64-73, 2012.

SANZ-COBENA, A.; MISSELBROOK, T. H.; ARCE, A.; MINGOT, J. I.; DIEZ, J. A.; VALLEJO, A. An inhibitor of urease activity effectively reduces ammonia emissions from soil treated with urea under mediterranean conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 126, n. 3-4, p. 243-249, 2008.

SAUSSURE, T. de. **Recherches chimiques sur la végétation**. Paris: chez la Veuve Nyon, 1804.

SCHAUS, K.; FOCKS, A.; LEININGER, S.; KOTZERKE, A.; HEUER, H.; THIELE-BRUHN, S.; SHARMA, S.; WILKE, B. M.; MATTHIES, M.; SMALLA, K.; MUNCH, J. C.; AMELUNG, W.; KAUPENJOHANN, M.; SCHLOTTER, M.; SCHLEPER, C. Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 446-456, 2009.

SCHIRMANN, J.; AITA, C.; GIACOMINI, S. J.; BARBOSA, S.; GIACOMINI, D. A.; GONZATTO, R.; OLIVO, J. Inibidor de nitrificação e aplicação parcelada de dejetos de suínos nas culturas do milho e trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 1, p. 271-280, 2013.

SELBIE, D. R.; LANIGAN, G. J.; LAUGHLIN, R. J.; DI, H. J.; MOIR, J. L.; CAMERON, K. C.; CLOUGH, T. J.; WATSON, C. J.; GRANT, J.; SOMERS, C.; RICHARDS, K. G. Confirmation of co-denitrification in grazed grassland. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17361, 2015.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 71, n. 2, p. 91-109, 2017.

SHANKARIAH, C.; HUNSIGI, G. Field responses of sugarcane to associative N<sub>2</sub> fixers and P solubilisers. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 24., 2001, Brisbane. Proceedings... Brisbane: The Australian Society of Sugarcane Technologists, 2001. p. 40-45.

SHEN L. D.; LIU, S.; LOU, L. P.; LIU, W. P.; XU, X. Y.; ZHENG P.; HU, B.-I. Broad distribution of diverse anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in chinese agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6167-6172, 2013a.

SHEN, T.; STIEGLMEIER, M.; DAI, J.; URICH, T.; SCHLEPER, C. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis* to nitrification inhibitors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 344, n. 2, p. 121-129, 2015b.

SHEU, S.; CHOU, J.; BONTEMPS, C.; ELLIOT, G. N.; GROSS, E.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; CHEN, W. *Burkholderia symbiotic* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2272-2278, 2012.

- SHI, X.; HU, H.; MÜLLER, C.; HE, J.; CHEN, D.; SUTER, H. C. Effect of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate on nitrification and nitrifiers in two contrasting agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5236-5248, 2016.
- SHOUN, H.; TANIMOTO, T. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 17, p.11078-11082, 1991.
- SHOUN, H.; KIM, D. H.; UCHIYAMA, H.; SUGIYAMA, J. Denitrification by fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 94, p. 277-282, 1992.
- SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P.; CONANT, R. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.
- SILVA, L. M. M. **Desempenho agrônomico de milho em função do tratamento de sementes com Azospirillum brasiliense sob diferentes doses de nitrogênio mineral**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal, Ciências AgroVeterinárias) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.
- SILVA, K. da; DE MEYER, S. E. ROUWS, L. F. M.; FARIAS, E. N. C.; SANTOS, M. A. O. dos; O'HARA, G.; ARDLEY, J. K.; WILLEMS, A.; PITARD, R. M.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium ingae* sp nov., isolated from effective nodules of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3395-3401, 2014.
- SILVA, S. A.; ARF, O.; BUZZETTI, S.; SILVA, M. G. Fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo em sistema plantio direto no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2717-2722, 2008. Número especial.
- SIQUEIRA NETO, M.; PICCOLO, M. C.; COSTA JUNIOR, C.; CERRI, C. C.; BERNOUX, M. Emissão de gases do efeito estufa em diferentes usos da terra no bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 1, p. 63-76, 2011.
- SIQUEIRA NETO, M.; GALDOS, M. V.; FEIGL, B. J.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C. Direct N<sub>2</sub>O emission factors for synthetic N-fertilizer and organic residues applied on sugarcane for bioethanol production in Central-Southern Brazil. **GCB Bioenergy**, v. 8, n. 2, p. 269-280, 2016.
- SINGH, B. P.; HATTON, B. J.; BALWANT, S.; COWIE, A. L.; KATHURIA, A. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, n. 4, p. 1224-1235, 2010.
- SMITH, K. A.; CONEN, F. Impacts of land management on fluxes of trace greenhouse gases. **Soil Use and Management**, v. 20, n. 2, p. 255-263, 2004.
- SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 4, p. 201-207, 2009.
- SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônomico de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 803-811, 2006a.
- SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; DO VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; DE ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. DE S. Eficiência agrônomico de rizóbios selecionados e

- diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006b.
- SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L. (Ed.). **Climate change 2007: the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. United Kingdom, New York: Cambridge University Press, Cambridge, 2007. 996 p.
- SOMMER, S. G.; SCHJORRING, J. K.; DENMEAD, O. T. Ammonia volatilization from mineral fertilizers and plants in fields amended with ammoniacal fertilizers. **Advances in Agronomy**, v. 82, p. 557-622, 2004.
- SPOTT, O.; RUSSOW, R.; STANGE, C. F. Formation of hybrid N<sub>2</sub>O and hybrid N<sub>2</sub> due to codenitrification: First review of a barely considered process of microbially mediated N-nitrosation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1995-2011, 2011.
- STANLEY, J.; CERVANTES, E. Biology and genetics of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n. 1, p. 9-19, 1991.
- STAR, L.; MATAN, O.; DARDANELLI, M. S.; KAPULNIK, Y.; BURDMAN, S.; OKON, Y. The *Vicia sativa* spp. *nigra* - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 165-174, 2012.
- STEVENS, H.; ULLOA, O. Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1244-1259, 2008.
- STROUS, M.; VANGERVEN, E.; ZHENG, P.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 1955-1962, 1997.
- STUTZER, H.; HARTLEB, R. Über nitratbildung. *Bakteriol. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Originale Beiheft. Abteilung 1*, v. 22, p. 701, 1894.
- SU, F.; TAKAYA, N.; SHOUN, H. Nitrous oxide-forming codenitrification catalyzed by cytochrome P450nor. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 473-475, 2004.
- SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIHASHI, A. T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C. E.; BERRY, W. L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 41, p. 17302-17307, 2009.
- SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; ONO, H.; YOSHIDA, M.; YOSHIHASHI, T.; ZHU, Y.; ZAKIR, H. A. K. M.; DESHPANDE, S. P.; HASH, C. T.; SAHRAWAT, K. L. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 243-259, 2013.
- SUBBARAO, G. V.; YOSHIHASHI, T.; WORTHINGTON, M.; NAKAHARA, K.; ANDO, Y.; SAHRAWAT, K. L.; RAO, I. M.; LATA, J.; KISHII, M.; BRAUN, H. Suppression of soil nitrification by plants. **Plant Science**, v. 233, p. 155-164, 2015.
- SULIEMAN, S.; TRAN, L. Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. **Plant Science**, v. 239, p. 36-43, 2015.
- TAKAYA, N. Response to hypoxia, reduction of electron acceptors, and subsequent survival by filamentous fungi. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 1-8, 2009.



TASCA, F. A.; ERNANI, P. R.; ROGERI, D. A.; GATIBONI, L. C.; CASSOL, P. C. Volatilização de amônia do solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 493-502, 2011.

TAYLOR, A. E.; BOTTOMLEY, P. J. Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. in soils at different solution concentrations of ammonium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 828-836, 2006.

TEMPLER, P. H.; SILVER, W. L.; PETT-RIDGE, J.; DEANGELIS, K. M.; FIRESTONE, M. K. Plant and microbial controls on nitrogen retention and loss in a humid tropical forest. **Ecology**, v. 89, n. 11, p. 3030-3040, 2008.

THIEL, T.; LYONS, E. M.; ERKER, J. C.; ERNST, A. A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 92, n. 20, p. 9358-9362, 1995.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R.; CASEY, P.; MUSTER, T.; GILLA, H.; ADHIKARI, B. Enhanced efficiency fertilisers: a review of formulation and nutrient release patterns. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1131-1142, 2015.

TIRADO, R. **Nitrates in drinking water in the Philippines and Thailand**. Devon, UK: Greenpeace Research Laboratories, 2007. 20 p. (Technical Note 10/2007, GRL-TN-10-2007).

TOLEDO, M. Z.; GARCIA, R. A.; PEREIRA, M. R. R.; BOARO, C. S. F.; LIMA, G. P. P. Nodulação e atividade do nitrato redutase em função da aplicação de molibdênio em soja. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 6, p. 858-864, 2010.

TOMA, Y.; KIMURA, S. D.; YAMADA, H.; HIROSE, Y.; FUJIWARA, K.; KUSA, K.; HATANO, R. E. Effects of environmental factors on temporal variation in annual carbon dioxide and nitrous oxide emissions from an unfertilized bare field on Gray Lowland soil in Mikasa, Hokkaido, Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 663-675, 2010.

TRAN VAN, V.; BERGE, O.; KE, S. N.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnã. **Plant and Soil**, v. 218, n. 1-2, p. 273-284, 2000.

TRENKEL, M. E. **Improving fertilizer use efficiency**: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. Paris: International Fertilizer Industry Association, 1997. 151 p.

TRENKEL, M. E. **Slow- and controlled-release and stabilized fertilizer**: an option for enhancing nutrient efficiency in agriculture. Paris: International Fertilizer Industry Association, 2010. 160 p.

TRIPATHI, A. K. Rhizobia of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria: a tale of losing the race. **Current Science**, v. 82, n.1, p. 8-9, 2002.

TURNER, D. A.; EDIS, R. B.; CHEN, D.; FRENEY, J. R.; DENMEAD, O. T.; CHRISTIE R. Determination and mitigation of ammonia loss from urea applied to winter wheat with n- (n-butyl) thiophosphorictriamide. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 137, n. 3-4, p. 261- 266, 2010.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. The role of biological nitrogen fixation in biofuel production from sugar cane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE



AGRICULTURE FOR THE TROPICS, 1995, Rio de Janeiro. **The role of biological nitrogen fixation**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1995. p. 62-63.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and  $^{15}\text{N}$  natural abundance data for the contribution of biological  $\text{N}_2$  fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 5-21, 2012.

VALDERRAMA, M.; BUZZETTI, S.; BENETT, C. G. S.; ANDREOTTI, M.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Fontes e doses de NPK em milho irrigado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 2, p. 254-263, 2011.

VALLEJO, A.; SKIBA, U. M.; GARCÍA-TORRES, L.; ARCE, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, S.; SÁNCHEZ-MARTÍN, L. Nitrogen oxides emission from soils bearing a potato crop as influenced by fertilization with treated pig slurries and composts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 2782-2793, 2006.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1985-1989, 2005.

VELTHOF, G. L.; OENEMA, O. Nitrous oxide fluxes from grassland in the Netherlands: II. Effects of soil type, nitrogen fertilizer application and grazing. **European Journal of Soil Science**, v. 46, n. 4, p. 541-549, 1995.

VELTHOF, G. L.; OUDENDAG, D.; WITZKE, H. P.; ASMAN, W. A. H.; KLIMONT, Z.; OENEMA, O. Integrated assessment of nitrogen losses from agriculture in EU-27 using MITERRA-EUROPE. **Journal of Environmental Quality**, v. 38, n. 2, p. 402-417, 2009.

VERBAENDERT, I.; BOON, N.; DE VOS, P.; HEYLEN, K. Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 385-391, 2011.

VIEIRA, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N.; VIEIRA, C.; CASSINI, S. T. A. Foliar application of molibdênio in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 169-180, 1998.

VIERO, F.; BAYER, C.; FONTOURA, S. M. V.; MORAES, R. P. de. Ammonia volatilization from nitrogen fertilizers in no-till wheat and maize in southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1515-1525, 2014.

VILAIN, G.; GARNIER, J.; TALLEC, G.; CELLIER, P. Effect of slope position and land use on nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) emissions (Seine Basin, France). **Agricultural Forest Meteorology**, v. 150, n. 9, p. 1192-1202, 2010.

VILLALBA, G. **Misturas de uréia revestidas com polímeros e uréia convencional na adubação da cultura do milho**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 889-893, 2006.

XU, Y.; XU, Z.; CAI, Z.; REVERCHON, F. Review of denitrification in tropical and subtropical soils of terrestrial ecosystems. **Journal of Soil and Sediment**, v. 13, n. 4, p. 699-710, 2013.

- WALKER, C. B.; TORRE, J. R. de la; KLOTZ, M. G.; URAKAWA, H.; PINEL, N.; ARP, D. J.; BROCHIER-ARMANET, C.; CHAIN, P. S.; CHAN, P. P.; GOLLABGIR, A.; HEMP, J.; HÜGLER, M.; KARR, E. A.; KÖNNEKE, M.; SHIN, M.; LAWTON, T. J.; LOWE, T.; MARTENS-HABBENA, W.; SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; LANG, D.; SIEVERT, S. M.; ROSENZWEIG, A. C.; MANNING, G.; STAHL, D. A. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. **Proceedings of the National Academic of Science of the United State**, v. 107, n. 19, p. 8818-8823, 2010.
- WALLENSTEIN, M. D.; MYROLD, D. D.; FIRESTONE, M.; VOYTEK, M. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates. Insights from molecular methods. **Ecological Applications**, v. 16, n. 6, p. 2143-2152, 2006.
- WAN, Y. J.; JU, X. T.; INGWERSEN, J.; SCHWARZ, U.; STANGE, C. F.; ZHANG, F. S.; STRECK, T. Gross nitrogen transformations and related nitrous oxide emissions in an intensively used calcareous soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 1, p. 102-112, 2009.
- WANG, E. T.; BERKUM, P. van; SUI, X. H.; BEYENE, D.; CHEN, W. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1, p. 51-65, 1999.
- WATSON, R. T.; ZINYOWERA, M. C.; MOSS, R. H. (Ed.). **Climate change 1995: impacts, adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analyses: contribution of Working Group II to the second report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 878 p.
- WEBB J., ELLIS S., HARRISON R., THORMAN R. Measurement of N fluxes and soil N in two arable soils in the UK. **Plant and Soil**, v. 260, n. 1-2, p. 253-270, 2004.
- WEI, W.; ISOBE, K.; SHIRATORI, Y.; NISHIZAWA, T.; OHTE, N.; OTSUKA, S.; SENOO, K. N<sub>2</sub>O emission from cropland field soil through fungal denitrification after surface applications or organic fertilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 69, p. 157-167, 2014.
- WEISKE, A.; BENCKISER, G.; OTTOW, J. C. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3-years of repeated applications in field experiments. **Biology and Fertility of Soil**, v. 34, n. 2, p. 109-117, 2001.
- WESSÉN, E.; NYBERG, K.; JANSSON, J. K.; HALLIN, S. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. **Applied Soil Ecology**, v. 45, n. 3, p. 193-200, 2010.
- WESSÉN, E.; HALLIN, S. Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers – Possible bioindicator for soil monitoring. **Indicators Ecological**, v. 11, n. 6, p. 1696-1698, 2011.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1-2, p. 3-14, 2006.
- WINOGRADSKY, S. Recherches sur les organismes de la nitrification. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 4, p. 213-331, 1890.
- WONG, M. S.; WU, S.; CAUSEY, T. B.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. **Metabolic Engineering**, v. 10, p. 10-17, 2008.
- WRAGE, N.; VELTHOF, G. L.; VAN BEUSICHEM, M. L.; OENEMA, O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 12-13, p. 1723-1732, 2001.

- YAN, H.; YAN, J.; SUI, X. H.; WRANG, E. T.; CHEN, W. X.; ZHANG, X. X.; CHEN, W. F. *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2910-2916, 2016.
- YANG, L.; CAI, Z. The effect of growing soybean (*Glycine max* L.) on N<sub>2</sub>O emission from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 6, v. 37, p. 1205-1209, 2005.
- YIN, S. X.; CHEN, D.; CHEN, L. M.; EDIS, R. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 1131-1137, 2002.
- YING, J.; HE, J.; ZHANG, L. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acid red soil with different land utilization patterns. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 304-312, 2010.
- YOKOYAMA, K.; JINNAI, K.; SAKIYAMA, Y.; TOUMA, M. Contribution of fungi to acetylene-tolerant and high ammonia availability-dependent nitrification potential in tea field soils with relatively neutral pH. **Applied Soil Ecology**, v. 62, p. 37-41, 2012.
- ZALDÍVAR, R.; ROBINSON, H. Epidemiological investigation on stomach cancer mortality in Chileans: Association with nitrate fertilizer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 80, n. 4, p. 289-295, 1973.
- ZAMAN, M.; NGUYEN, M. L.; BLENNERHASSETT, J. D.; QUIN, B. F. Reducing NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> losses from a pasture soil with urease or nitrification inhibitors and elemental s-amended nitrogenous fertilizers. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 5, p. 693-705, 2008.
- ZANATTA, J. A. BAYER, C.; VIEIRA, F. C. B.; GOMES, J.; TOMAZI, M. Nitrous oxide and methane fluxes in south Brazilian gleysol as affected by nitrogen fertilizers. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1653-1665, 2010.
- ZERULLA, W.; BARTH, T.; DRESSEL, J.; ERHARDT, K.; von LOCQUENGHIE, K. H.; PASDA, G.; RADLE, M.; WISSEMEIER, A. H. 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture: an introduction. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 2, p. 79-84, 2001.
- ZHANG, J.; SUN, W.; ZHONG, W.; CAI, Z. The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 76, p. 143-148, 2014.
- ZHANG N. N.; SUN Y. M.; WANG E. T.; YANG J. S.; YUAN H. L.; SCOW K. M. Effects of intercropping and rhizobial inoculation on the ammonia-oxidizing microorganisms in rhizospheres of maize and faba bean plants. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 76-85, 2015a.
- ZHANG, M.; FAN, C. H.; LI, Q. L.; LI, B.; ZHU, Y. Y.; XIONG, Z. Q. A 2-year assessment of the effects of chemical and biological nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrogen use efficiency in an intensively managed vegetable cropping system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 201, p. 43-50, 2015b.
- ZHENG, W.; RANG, L.; BERGMAN, B. Structural characteristics of the cyanobacterium-*Azolla* symbioses. In: PAWLOWSKI, K. (Ed.). **Prokaryotic symbionts in plants**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 235-263.
- ZHONG, Z.; LEMKE, R. L.; NELSON, L. M. Nitrous oxide emissions associated with nitrogen fixation by grain legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2283-2291, 2009.
- ZHONG, Z.; NELSON, L. M.; LEMKE, R. L. Nitrous oxide emissions from grain legumes as affected by

wetting/drying cycles and crop residues. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 6, p. 687-699, 2011.

ZHU, S. L. Efficient management of nitrogen fertilizers for flooded rice in relation to nitrogen transformations in flooded soils. **Pedosphere**, v. 2, n. 2, p. 97-114, 1992.

ZHOU, Z. M.; TAKAYA, N.; SAKAIRI, M. A. C.; SHOUN, H. Oxygen requirement for denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum*. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 1, p. 19-25, 2001.

ZILLI, J. É.; da SILVA NETO, M. L.; FRANCA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; RIBEIRO de MELO, A. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 35, n. 3, p. 739-742, 2011.

ZULETA, L. F. G.; CUNHA, C. de O.; de CARVALHO, F. M.; CIAPINA, L. P.; SOUZA, R. C.; MERCANTE, F. M.; de FARIA, S. M.; BALDANI, J. I.; STRALIOTTO, R. *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 535, 2014.

ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; RIVAS, R.; TRUJILLO, M. E.; VIZCAÍNO, N.; CARRASCO, J. A.; CHAMBER, M.; PALOMARES, A.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 784-788, 2007.

**Embrapa**

---

**Meio Ambiente**



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

