



A Herança de
**JOHANNA
DÖBEREINER**

para a Ciência Agrícola
Brasileira e Mundial



MCMXVI

ACADEMIA
BRASILEIRA
DE CIÊNCIAS

Importância da quantificação da fixação biológica de nitrogênio em culturas de leguminosas e gramíneas

Segundo Urquiaga^{1,2}

Bruno J. R. Alves²

Claudia Jantalia²

Robert M. Boddey³

Revisado por: Mariangela Hungria

¹Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências

²Embrapa Agrobiologia, BR. 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ

³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, BR-465, Km 7, CEP: 23.897-000, Seropédica, RJ.

1. Esforços do grupo de pesquisa liderado pela Dra. Johanna Döbereiner para quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) nas principais culturas brasileiras

As primeiras observações sobre a importância das estruturas nodulares nas raízes de leguminosas favorecendo o crescimento das plantas datam da segunda metade do século XVI. Contudo, somente cerca de trezentos anos depois, por volta de 1890, Beijerinck comprovou que a inoculação de bactérias induzia a formação de nódulos em leguminosas (Araujo, 2017). Esse interesse em compreender a formação de nódulos nas raízes das leguminosas que deu início às investigações sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN), um processo essencial para o crescimento dessas plantas, que foi desvendado gradualmente.

No caso das gramíneas, a ausência de estruturas visíveis para abrigar bactérias diazotróficas retardou significativamente as pesquisas sobre FBN nessas plantas. A dificuldade em identificar e compreender a associação entre microrganismos fixadores de nitrogênio e as plantas tornou o estudo desse grupo particularmente desafiador.

A questão que logo surgiu foi se a fixação biológica de nitrogênio (FBN) poderia atender à demanda de nitrogênio das culturas agrícolas, sendo essencial quantificar a FBN tanto em leguminosas quanto em outras espécies. A Dra. Johanna teve papel crucial nesse campo, incentivando e promovendo pesquisas sobre o tema. A técnica de redução de acetileno foi uma ferramenta indispensável para os estudos de FBN até o início dos anos 1980. Essa técnica, ao medir a atividade da enzima nitrogenase, permitiu não apenas identificar e caracterizar bactérias diazotróficas, mas também quantificar preliminarmente a FBN em condições controladas, o que foi fundamental para o desenvolvimento de inoculantes mais eficientes.

Devido a limitações metodológicas, até o final da década de 1970, os métodos de quantificação da FBN em diferentes culturas, tanto em casa de vegetação quanto em campo, eram geralmente baseados na diferença de acúmulo de nitrogênio (N) pelas plantas e/ou no rendimento das plantas inoculadas em comparação às não inoculadas. Para determinar o potencial de uma bactéria ou de uma planta para otimizar a FBN, era necessário preparar substratos inertes (como areia, perlita, vermiculita) e soluções nutritivas diversas, o que dificultava obter valores de FBN próximos aos encontrados no campo.

No início dos anos 1980, as técnicas isotópicas com ^{15}N começaram a se difundir, as quais permitiam distinguir na planta com precisão o nitrogênio derivado do solo e aquele proveniente da FBN. Aplicadas nos estudos de FBN em leguminosas, essas técnicas demonstraram que, no caso da soja, a FBN era a principal fonte de nitrogênio, atendendo a pelo menos 80% das necessidades da planta (Alves *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2021). Como as leguminosas geralmente fixam muito mais N_2 do ar do que as gramíneas, o maior desafio foi adaptar a técnica de ^{15}N para quantificar a FBN em culturas como a cana-de-açúcar, que se tornou fundamental no contexto do recém-criado Programa bioenergético Proálcool. A Dra. Johanna foi essencial na implementação da técnica de ^{15}N para avaliar a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cana, conseguindo recursos e contratando especialistas no tema. Assim, iniciaram-se, no começo dos anos 1980, os estudos com ^{15}N para quantificação da FBN e ciclagem de nitrogênio em sistemas agrícolas na Embrapa Agrobiologia.

2. Quantificação da FBN em cana de açúcar

A expansão da cultura da cana-de-açúcar impulsionada pelo Programa Proálcool nos anos 1980 despertou o interesse da Dra. Johanna e de seu grupo de pesquisa em buscar alternativas mais sustentáveis para a produção agrícola. Diante do alto consumo de energia fóssil na produção de fertilizantes nitrogenados e da crescente demanda desse insumo na agricultura brasileira, Dra. Johanna e sua equipe identificaram na fixação biológica de nitrogênio (FBN) uma solução promissora para reduzir os custos energéticos e o impacto ambiental da produção de cana. Observou-se que esta cultura poderia alcançar produtividades superiores a 100 Mg/ha de colmos frescos mesmo em solos pobres em nitrogênio disponível, chegando a acumular mais de 200 kg de N/ha. Esse nitrogênio era majoritariamente exportado do campo pela queima da palha para facilitar a colheita manual, sem que o conteúdo de N do solo fosse significativamente reduzido (Stanford & Ayres, 1964; Orlando Filho *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 1984). Essa observação incentivou a Dra. Johanna a intensificar as pesquisas microbiológicas, e um dos grandes desafios era quantificar a contribuição da FBN na nutrição da cana em condições próximas às de campo, apesar do conhecimento ainda limitado sobre as espécies de bactérias diazotróficas associadas a essa cultura (Döbereiner, 1961; Ruschel, 1982).

Como suporte a essas pesquisas, alguns cientistas (Ruschel, 1975; Vose, 1980; Freitas *et al.*, 1984) realizaram estudos preliminares em campo e em casa de vegetação, aplicando técnicas com o isótopo ^{15}N . Eles descobriram que o processo de FBN estava presente na cana, com uma contribuição que superava 17% do N acumulado pelas plantas. Para confirmar a importância da FBN na cultura, na atual Embrapa Agrobiologia, foi realizado um experimento em vasos com 64 kg de amostras de solo coletadas de áreas produtoras de cana em Campos dos Goytacazes (RJ). Foram cultivadas quatro variedades comerciais de cana, submetidas a dois cortes, e aplicou-se a técnica de balanço de N no sistema solo-planta, utilizando o ^{15}N como indicador. Esse estudo demonstrou que, na variedade CB47-89, a FBN contribuiu de forma significativa para a nutrição nitrogenada da cultura, chegando, em condições de campo, a uma contribuição de até 200 kg de N/ha (Lima *et al.*, 1987). Vale ressaltar que, nesse estudo, não houve inoculação de bactérias diazotróficas, e as plantas cresceram apenas com o inóculo nativo presente nos colmos-sementes e no solo.

Em abril de 1986, com o objetivo de avaliar a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar, foi iniciado um estudo em condições próximas às de campo. Esse experimento avaliou dez genótipos/variedades comerciais de cana, cada um com diferentes exigências de adubação nitrogenada. Para o estudo, foi construído um tanque de concreto com dimensões de 20 m x 6 m x 0,5 m de profundidade, preenchido com solo pobre em N disponível proveniente da camada entre 0,10 m e 0,35 m de um perfil de Argissolo (Figura 1). O solo foi corrigido com calagem e recebeu uma adubação completa com macro e micronutrientes (exceto nitrogênio), além de irrigação para garantir um adequado suprimento de água.

No que diz respeito à adubação com nitrogênio (N), foram aplicadas apenas pequenas quantidades de N marcado com o isótopo ^{15}N , com o objetivo de marcar o N disponível no solo e, assim, distinguir nas plantas o N proveniente do solo daquele derivado da FBN. Os resultados mostraram que, mesmo em solo pobre em N disponível, mas sob condições ideais de manejo, o rendimento de colmos das



Figura 1. Preenchimento do tanque com solo Argissolo e aplicação de nutrientes, incluído ^{15}N -fertilizante, por camadas de 10 cm.

variedades comerciais no primeiro ano variou de 175 a 239 Mg/ha, com acúmulo de 200 a 280 kg de N/ha. Nos dois cortes subsequentes, apenas duas variedades (CB45-3 e SP70-1143) mantiveram altos rendimentos e acúmulo de N, com destaque também para o genótipo selvagem Krakatau (*S. spontaneum*), que demonstrou excelente desempenho (Figura 2).



Figura 2. No terceiro ano, após dois cortes, somente dois genótipos (Krakatau e SP701143) se destacaram como os mais eficientes para FBN.

Aplicando-se duas metodologias — a técnica isotópica de ^{15}N e o balanço total de N no sistema solo-planta, determinou-se que a FBN contribuiu com 49 a 70% da demanda de N das plantas nas variedades comerciais, incluindo o Krakatau, equivalente a 170 a 270 kg de N/ha (Urquiaga *et al.*, 1992). Esses resultados, obtidos sob condições controladas, mas próximas às de campo, não apenas confirmaram como também evidenciaram o alto potencial de contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana, justificando a importância desse processo biológico para a economia no uso de fertilizantes nitrogenados. Esses resultados também ajudaram a explicar os altos balanços energéticos positivos da produção de etanol derivado da cana brasileira (9,35) (Boddey, 1993; Soares *et al.*, 2009).

Com base nessas informações e após diversas pesquisas intensivas, especialmente em nível de campo e em experimentos de longo prazo com diferentes variedades de cana, estabeleceu-se que a FBN fornece, em média, 40 kg de N/ha no N acumulado pelas plantas. Isso representa aproximadamente 35% da demanda de N da cultura, sendo suficiente para garantir bons rendimentos. Observou-se também uma resposta

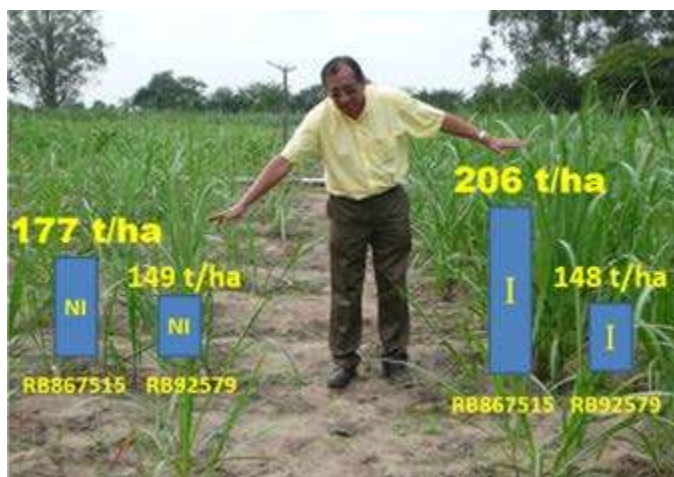


Figura 3. Comparando as variedades de cana RB92579 e RB867515, somente a última mostrou muito boa resposta à inoculação (coquetel de bactérias diazotróficas). Como não houve contribuição da FBN, isto apenas demonstra efeito varietal da cana na ação promotora de crescimento das bactérias inoculadas.

limitada à inoculação com bactérias diazotróficas, o que sugere, na maioria dos casos, uma boa eficiência das populações nativas (Yoneyama *et al.*, 1997; Boddey *et al.*, 2001, 2003; Schultz *et al.*, 2012, 2014; Urquiaga *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que, além da FBN, as bactérias diazotróficas produzem hormônios de crescimento vegetal, e o efeito positivo da inoculação na promoção do crescimento da planta pode ser devido tanto à FBN quanto à ação hormonal (Figura 3). Outro ponto a considerar é a aplicação de molibdênio na adubação da cana-de-açúcar, que tem contribuído significativamente para o aumento da FBN e da produtividade em alguns solos. Esse micronutriente, essencial para a planta e especialmente para a síntese e atividade da enzima nitrogenase, frequentemente apresenta baixa disponibilidade em solos ácidos, tornando sua suplementação ainda mais relevante (Boddey *et al.*, 2003).

Desde os primeiros resultados impressionantes sobre a quantificação da contribuição da FBN na cultura (Urquiaga *et al.*, 1992), obtidos sem a necessidade de inoculação de bactérias diazotróficas, observou-se que todos os genótipos e variedades estudadas apresentavam as mesmas espécies de bactérias diazotróficas já conhecidas. Entre essas bactérias estava *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolada do interior dos colmos de cana, utilizando caldo de cana no meio de cultura (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989).

A Dra. Johanna sempre enfatizava a importância de realizar esforços para compreender de forma mais profunda o processo de interação entre planta e bactéria diazotrófica, ressaltando que esse entendimento poderia abrir caminho para expandir a FBN de forma eficiente para outras culturas, especialmente gramíneas como milho, trigo e arroz, nas quais o rendimento é fortemente dependente da disponibilidade de N do solo ou da adubação nitrogenada. Além disso, destacava-se a necessidade de entender melhor a interação entre as bactérias no “microbioma”, tanto dentro das plantas quanto na rizosfera. Esses desafios relevantes continuam a impulsionar as pesquisas na área.

3. Impacto da FBN na economia de N-fertilizante e mitigação das emissões de gases de efeito estufa da agricultura brasileira

3.1. Importância econômica da FBN na agricultura brasileira

Com base na área cultivada, rendimento e produção nacional das principais culturas de grãos, cereais e cana-de-açúcar no Brasil, e considerando os indicadores de FBN e o acúmulo de N necessário para produzir uma tonelada do produto comercial de cada cultura (Boddey *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2006, 2015; Herridge *et al.*, 2008; Urquiaga *et al.*, 2012; Guareschi *et al.*, 2019; Monteiro *et al.*, 2021), estimou-se a contribuição da FBN como fonte de N da agricultura brasileira. Na safra 2023/2024, essa contribuição alcançou 10 milhões de toneladas de N, com destaque para a soja, que representa 94,5% desse total por ser a cultura mais cultivada e com maior contribuição da FBN (80%) (Tabela 1).

Tabela 1. Área, rendimento, produção, acúmulo de N na planta por tonelada de produto, N derivado da FBN e mitigação da emissão de gases de efeito estufa (GEE), das cinco principais culturas brasileiras. Safra 2023/2024

Cultura ¹	Área ¹ (M ha)	Rend ¹ (kg ha)	Produção (1000 t)	N-planta/ prod. ² (kg N/ Mg prod.)	Total N (1000 t)	FBN (%)	N-FBN (1000 t)	Mitigação de GEE ^{3,9} (1000 t CO _{2eq})
Soja	46,03	3.202	147.382	80	11.791	80 ³	9.432	207.514
Feijão	2,856	1.138	3.249	38,5	125,13	36 ⁴	45	991
Amendoim	0,255	2.873	734	50	37	65 ⁴	24	525
Cana-de-Açúcar	8,334	85.580	713.214	1	713	35 ^{5,6}	250	5492
Milho	21,059	5.495	115.723	20	2.314	10 ^{3,7}	231	5092
TOTAL	78,534	-	-	-	14.980	-	9.982	219.613

Rend¹: Rendimento. Fonte: ¹CONAB (2024), ²IPNI (2017), ³Alves *et al.* (2003, 2006), ⁴Herridge *et al.* (2008), ⁵Urquiaga *et al.* (2012), ⁶Boddey *et al.* (2001), ⁷Alves *et al.* (2015), ⁸Brock *et al.* (2012), ⁹Robertson *et al.* (2004).

Esses dados revelam um potencial significativo de expansão da FBN em outras culturas (Tabela 1). Considerando que a outra importante fonte de N da agricultura nacional são os fertilizantes sintéticos, que somaram cerca de 6 milhões de toneladas de N consumidas na safra 2023/2024, deduz-se que a FBN é atualmente a principal fonte de N para a agricultura brasileira, respondendo por 62,3% do total de N utilizado.

Considerando o preço atual do N na forma de ureia (45% N), de R\$ 2.152,00 por tonelada, e a taxa de câmbio de R\$ 5,60 por dólar (BC, 14/10/2024), a contribuição da FBN para a agricultura brasileira na última safra equivale a US\$ 8,54 bilhões. Para avaliar o impacto econômico considerou-se apenas o valor líquido do N-FBN acumulado pelas plantas. Como a eficiência de uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos nas condições brasileiras em geral é igual ou mesmo inferior a 50%, esse valor seria dobrado caso esses fossem utilizados.

O impressionante valor econômico do N-FBN representa aproximadamente o triplo do orçamento anual destinado pelo governo brasileiro à pesquisa e desenvolvimento

agropecuário nos últimos anos. Para se ter uma ideia da relevância econômica global desse impacto, esse montante é comparável ao orçamento anual dos Estados Unidos para pesquisa e desenvolvimento no setor agropecuário (Gazzoni & Crestana, 2024).

3.2. Importância da FBN da agricultura brasileira na mitigação ou emissões evitadas de gases de efeito estufa.

Como mencionado anteriormente, a FBN é uma fonte direta de N para a nutrição das culturas, com uma eficiência de uso próxima de 100%, ou seja, sem perdas. Em contraste, a eficiência de uso de fertilizantes sintéticos nitrogenados raramente ultrapassa 50% da dose aplicada (Good & Beatty, 2011; Hawkesford, 2011). Isso significa que metade do N-fertilizante aplicado não é aproveitado pela planta durante seu ciclo de crescimento, resultando em uma parte residual no solo e outra que pode representar um risco ambiental.

Para avaliar o impacto da FBN da agricultura brasileira em relação às emissões evitadas de gases de efeito estufa (GEE), considera-se que a quantidade de N-fertilizante necessária para suprir uma planta deve ser o dobro do total que ela pode obter da FBN. Assim, levando em conta que para cada kg de N-fertilizante sintético aplicado no solo usando a ureia como referência, o fertilizante mais utilizado na agricultura global, são emitidos 11 kg de equivalente CO₂ (CO₂ eq.) (Robertson *et al.*, 2004; Brock *et al.*, 2012), foi possível calcular o impacto da FBN na mitigação de GEE na agricultura brasileira (Tabela 1).

A FBN na Agricultura brasileira tem demonstrado uma significativa contribuição para o cumprimento dos compromissos estabelecidos nos Planos ABC (2010-2020) e ABC+ (2021-2030) (MAPA, 2012; 2021). Durante a execução do Plano ABC, a FBN superou em mais de 150% a meta de mitigação das emissões de GEE, principalmente devido à expansão da cultura da soja. As expectativas para o novo plano ABC+ são igualmente promissoras. Na safra 2023-2024, a meta de mitigação de emissões de CO₂ equivalente, prevista para ser alcançada em 10 anos por meio do uso de bioinsumos, de 23,4 MtCO₂eq., já foi ultrapassada nas primeiras quatro safras desta década, totalizando 31,7 MtCO₂eq.

4. Legado e desafios deixados pela Dra. Johanna Döbereiner associada com a quantificação da FBN na agricultura brasileira.

- A.** Foram identificados genótipos e variedades de soja, feijão, leguminosas forrageiras, leguminosas-adubos verdes, cana-de-açúcar e milho com alto potencial de rendimento e eficiência na FBN.
- B.** Entre as leguminosas, a soja se destaca como a cultura com maior eficiência na FBN (80%), enquanto nas gramíneas, a cana-de-açúcar apresenta uma eficiência de 35%. Nas demais culturas, é necessário avançar significativamente tanto no melhoramento das plantas quanto na compreensão e adequado manejo da parte microbiológica.
- C.** A FBN é a principal fonte de N da agricultura brasileira, representando 62,5% do total de N consumido (16 milhões de toneladas) na última safra agrícola.

- D. Na safra 2023/2024, a FBN contribuiu com 10 milhões de toneladas de N para a agricultura brasileira, sendo que a soja foi responsável por 94,3% dessa contribuição, refletindo principalmente sua alta eficiência para FBN (80%) e a ampla ocupação da área agrícola (46 milhões de hectares). O impacto da FBN na economia de N-fertilizante e na economia do país foi significativo, com uma contribuição equivalente a 8,54 bilhões de dólares, valor que representa aproximadamente o triplo do orçamento que o governo destina anualmente à pesquisa e desenvolvimento agropecuário.
- E. Nos 10 anos do Plano ABC (2010-2020), a tecnologia da FBN contribuiu para mitigar aproximadamente 25 milhões de toneladas de CO₂ equivalente, atingindo 2,5 vezes a meta inicial de 10 milhões de toneladas de CO₂ eq. A soja foi responsável por mais de 95% das emissões evitadas nesse período. No Plano ABC+, que estabelece uma meta de mitigação de 23,4 milhões de toneladas de CO₂ eq. entre 2021 e 2030 por meio do uso de bioinsumos, essa meta já foi superada nas quatro primeiras safras da década, com a soja respondendo por mais de 94% dessa contribuição.
- F. A Dra. Johanna sempre enfatizou que o aumento da eficiência da FBN em culturas como milho, trigo e arroz dependerá do adequado melhoramento das plantas visando a FBN e do entendimento da interação planta-bactéria. Além disso, acreditamos, é fundamental compreender o “microbioma” presente dentro e na rizosfera das plantas. Esses temas de pesquisa ainda necessitam de estudos aprofundados.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (processo 465133/2014-4) e à Fundação Araucária (STI 043/2019) pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento do projeto INCT “Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental – MPCPAgro, MicroAgro”. Também expressamos nossa gratidão ao CNPq e à FAPERJ pelo suporte econômico que possibilitou a realização da maioria de nossas pesquisas. Um agradecimento muito especial (*in memoriam*) à nossa querida Professora Johanna Döbereiner, pela grandiosa oportunidade, inestimável ajuda e permanente estímulo que nos deu para desenvolver nossos trabalhos em benefício da sociedade.

Referências

- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. V.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, p. 307–321, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p. 1–9. 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024191913296>.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. FBN e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 449-456, 2006.

- ARAUJO, S. C. **Memórias que entrelaçam uma vida com a pesquisa e implantação da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na agricultura brasileira**. ANPIL, 2017.
- BODDEY, R. M. 'Green' Energy from Sugar Cane. **Chemistry and Industry**, v. 10, p. 355–358, 1993.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 889–895, 2001. <https://doi.org/10.1071/pp01058>
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future application. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024152126541>
- BROCK, P.; MADDEN, P.; SCHWENK, G.; HERRIDGE, D. Greenhouse gas emissions profile for 1tonne of wheat produced in Central Zone (East) New South Wales: a life cycle assessment approach. **Crop and Pasture Science**, v. 63, p. 319–329. <https://doi.org/10.1071/CP11191>
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23–31, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. V. 4 – Safra 2023/2024 N. 4. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso: 15 de outubro 2024.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211–216, 1961. <https://doi.org/10.1007/BF01400455>
- FREITAS, J. R.; VICTORIA, R. L.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. Estimation of N_2 -fixation by sugar cane *Saccharum* sp. and soybean, *Glycine max*, grown in soil with ^{15}N labelled organic matter. **Plant and Soil**, v. 82, p. 257–261, 1984.
- GAZZONI, D. L.; CRESTANA, S. Investimento público em ciências agrárias e retorno dado à erradicação da fome: Ensinaamentos do nosso passado e presente. In: Hungria, M. **Segurança alimentar e nutricional: o papel da ciência brasileira no combate à fome**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 2024.
- GILLIS, M.; KERTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DELEY, J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, p. 361–364, 1989.
- GOOD, A. G.; BEATTLY, P. Biotechnological Approaches to Improving Nitrogen Use Efficiency in Plants: Alanine Aminotransferase as a Case Study. In: Hawkesford, M.J. (Ed). **The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops**, v. 6, p. 165–191. 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470960707.ch9>
- GUARESCHI, R. F.; BODDEY, R.M.; ALVES, B. J. R.; SARKIS, L. F.; MARTINS, M. R.; JANTALIA, C. P.; CABRIALES, J. J. P.; NUNEZ, J. A. V.; URQUIAGA, S. Balanço de nitrogênio, fósforo e potássio na agricultura da América Latina e o Caribe. **Terra Latinoamericana**, v. 37, p. 105–119, 2019.
- HAWKESFORD, M. J. **An Overview of Nutrient Use Efficiency and Strategies for Crop Improvement**. In: Hawkesford, M. J.; Barraclough, P (Eds). *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*. p. 3–19, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470960707.ch1>.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B. R. M.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1–18, 2008. doi:10.1007/s11104-008-9668-3.
- IPNI (International Plant Nutrition Institute). **Calculadora de Remoção de Nutrientes**. 2017. < <http://brasil.ipni.net/article/BRS-3268> > (Consulta junho 30. 2024).
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated

- with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 165–170, 1987. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90077-0)
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura: Plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono)**/Ministério do Desenvolvimento Agrário – Brasília: MAPA/ACS, p. 173, 2012.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Plano Setorial para Adaptação à Mudança do Clima e Baixa Emissão de Carbono na Agropecuária, com vistas ao Desenvolvimento Sustentável – ABC+**. Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação. – Brasília: MAPA, 2021.
- MONTEIRO, E. C.; SILVA, C. G. N.; MARTINS, M. R.; REIS, V. M.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Strategy for the Sampling of Sugarcane Plants for the Reliable Quantification of N_2 Fixation Using ^{15}N Natural Abundance. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 2741–2752, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00561-6>
- ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO, E. J. R. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana de açúcar, variedade CB41-76 em função da idade em solos do Estado de São Paulo**. Boletim Técnico de Planalsucar 2, p. 1-128. Planalsucar, Piracicaba, 13400, São Paulo, Brasil, 1980.
- ROBERTSON, G.; GRACE, P.; PETER, R. Greenhouse gas fluxes in tropical and temperate agriculture: the need for a full-cost accounting of global warming potentials. In: Tropical Agriculture in Transition-Opportunities for Mitigating Greenhouse Gas Emissions? **Environment, Development and Sustainability**, v. 6, p. 51-63. 2004. <https://doi.org/10.1023/B:EN-VI.0000003629.32997.9e>
- RUSCHEL, A. P. Nitrogen- 15 tracing of N-fixation with soil grown sugar cane seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 7, p. 181-182, 1975. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(75\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(75)90017-6)
- RUSCHEL, A. P. Perspectives on biological nitrogen fixation in sugar cane. In: Biological nitrogen fixation for tropical agriculture (P.H. Graham and S.C. Harris, Eds). **Centro Internacional de Agricultura Tropical**, v. 1, p. 497-502, 1982.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência na utilização de ureia (^{15}N) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 943–949, 1984.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MAIA, E.; SÁ, J.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M. Avaliação agrônômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 261-268, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200015>
- SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; REIS, V. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 359-371, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>
- SOARES, L. H.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Brazilian ethanol and the mitigation of greenhouse gases emission. **Revista Bioenergia**, v. 6, p. 48-53, 2009.
- STANFORD, G.; AYRES, A. S. The internal nitrogen requirement of sugarcane. **Soil Science**, v. 98, p. 338-344, 1964.
- 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, p. 105–114, 1992. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x>

- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA, E.; SÁ, J.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5-21, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>
- VOSE, P. B. **Introduction to nuclear techniques in agronomy and plant biology**. Pergamon International Library, v. 1, p. 1-391, 1980. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-03258-6>
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural ^{15}N abundance of sugarcane and neighboring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, v. 189, p. 239-244, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1004288008199>
- ZILLI, J. E.; PACHECO, R. S.; GIANLUPPI, V.; SMIDERLE, O. J.; URQUIAGA, S.; HUNGRIA, M. Biological N_2 fixation and yield performance of soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, p. 323-336, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10705-021-10128-7>