



Determinação do Nitrogênio da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-N)

Edmilson Evangelista da Silva¹
Pedro Henrique Sabadin de Azevedo²
Helvécio De-Polli³

Introdução

O nitrogênio, segundo elemento mais abundante no corpo microbiano logo após o carbono, é utilizado na determinação da biomassa microbiana do solo (DE-POLLI & GUERRA, 1999), tendo sua importância nos seres vivos tanto a nível estrutural como funcional, na composição de proteínas e aminoácidos. Considerável número de trabalhos são desenvolvidos com o intuito de determinar como este elemento é transformado no solo. Em sua grande maioria é destacado o papel desempenhado pelos microrganismos na transformação, assimilação e liberação deste elemento aos vegetais.

A mineralização do N orgânico do solo pode ser utilizada como um indicador potencial de disponibilidade do N às culturas (VETTERLEIN & HÜTTL, 1999). O seu entendimento se torna relevante quando se planeja traçar estratégias de manejo para conservação e melhoria das qualidades produtivas do solo.

Entretanto, para que se possa realizar tais estudos em alguns centros de pesquisa, a adequação de técnicas e metodologias deve ocorrer sem o prejuízo na obtenção de resultados. O objetivo deste documento é apresentar adaptações na metodologia originalmente proposta por BROOKES et al. (1985), com algumas modificações obtidas em trabalhos de outros autores, criando desta forma uma metodologia simplificada e de mais fácil uso na determinação do nitrogênio da biomassa microbiana do solo (BMS-N).

Método

O método básico descrito neste comunicado é o da fumigação-extração (BROOKES et al., 1985), com a relação solo extrator 1:2,5 segundo TATE et al. (1988) e $k_N = 0,54$ (BROOKES et al., 1985) realizando fumigação direta com adição de clorofórmio (isento de etanol) diretamente nas amostras (BROOKES et al., 1982; WITT et al., 2000), mantendo-as em local isento de luminosidade por 24 horas, procedendo-se, após extração, a quantificação do nitrogênio microbiano por destilação de arraste de vapor (Kjeldahl), seguida de volumetria de neutralização ácido-base empregando ácido sulfúrico como titulante (ALVES et al., 1994). Vale ressaltar que a fumigação também pode ser feita sob vácuo com uso de dessecador conforme metodologia original de VANCE et al. (1987) e BROOKES et al. (1985).

Materiais e Equipamentos necessários

Para Fumigação

- Frascos de vidro de 100 mL com tampa;
- Pipeta com graduação de 1 mL;
- Clorofórmio P.A. isento de etanol;

Para Extração

- Balança analítica com precisão de 0,1 mg;
- Frascos de vidro de 100 mL com tampa;
- pHmetro;

¹ Doutorando em Fitotecnia, UFRRJ – BR 465, km 07, Caixa Postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: edmilson@cnpab.embrapa.br

² Graduando em Química, UFRRJ. E-mail: pedrosabadin@hotmail.com

³ Pesquisador Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: depolli@cnpab.embrapa.br

- Balão volumétrico de 100 e 1000 mL;
- Becher de 100 e 1000 mL;
- Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M: pesar 28,0528 g de hidróxido de potássio. Transferir para um becher de 1000 mL e adicionar 700 mL de água deionizada cuidadosamente. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume com água deionizada após resfriamento;
- Solução de ácido sulfúrico 0,5 M: transferir 27,18 mL de ácido sulfúrico PA com auxílio de dispensador automático de 0 a 50 mL para um becher de 1000 mL contendo 100 mL de água deionizada, em capela de exaustão (tomar cuidado com o aquecimento provocado pela reação). Adicionar mais 700 mL de água deionizada, homogeneizar a solução no becher e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, aferindo o valor com água deionizada;
- Solução de sulfato de potássio (K_2SO_4) 0,5 M: pesar 87,1001 g do sal, transferir para becher de 1000 mL e adicionar 800 mL de água deionizada. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. Antes da aferição final do volume da solução deve-se corrigir o pH para a faixa entre 6,5-6,8, transferindo uma alíquota da solução solubilizada para um becher e realizando a leitura no pHmetro. Se necessária à correção do pH, adicionar no balão gotas de solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M se o meio estiver ácido e gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M se o meio estiver básico, sempre retornando a alíquota à origem e realizando a leitura após cada adição. Após correção do pH, aferir o volume à 1000 mL com água deionizada;
- Dispensador automático com capacidade de 0 a 50 mL;
- Agitador orbital;
- Funil;
- Papel de filtro (filtração rápida) de 28 μ m;
- Tubos de 50 mL com tampa;

Para determinação do nitrogênio microbiano

- Capela de exaustão para vapores ácidos;
- Moinho para reagente;
- Mistura Catalisadora: pesar separadamente 500,000 g de sulfato de potássio, 1,500 g de selênio e 25,000 g de sulfato cúprico. Juntar todos os reagentes e transferir para o moinho de reagentes para homogeneização dos mesmos;
- Pipeta automática de 10 mL;
- Dispensador automático com capacidade de 0 a 5 mL;
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A.;
- Tubo para digestão;
- Bloco digestor com controle de temperatura de 0 a 400°C;
- Solução de ácido sulfúrico 0,0015 M: pipetar 3 mL de ácido sulfúrico 0,5 M previamente preparado com o auxílio de uma pipeta automática e transferir para becher de 1000 mL contendo 100 mL de água deionizada. Adicionar 700 mL de água deionizada, solubilizar a solução e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, aferindo o volume com água deionizada;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Solução de tris hidroxi amino metano (THAM) ($C_4H_{11}NO_3$) 0,003 M: pesar 0,36340 g de THAM, previamente seco em estufa 105°C e transferir para um becher de 1000 mL, dissolver o sal e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume com água deionizada;
- Solução de hidróxido de sódio 0,5 M: pesar rapidamente 19,9985 g de hidróxido de sódio, pois este reagente é higroscópico. Transferir para um becher de 1000 mL, adicionar 700 mL de água deionizada, cuidadosamente. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume com água deionizada;
- Solução de ácido bórico (H_3BO_3) 1% (m/v): pesar 10,000 g de ácido bórico e dissolver em 900 mL de água deionizada acondicionando

em um balão volumétrico de 1000 mL (Sol. A). Dissolver 0,100 g de vermelho de metila em um balão volumétrico de 100 mL aferindo o volume com metanol P.A. (Sol. B). Dissolver 0,100 g de verde de bromocresol em um balão volumétrico de 100 mL aferindo o volume com metanol P.A. (Sol. C). Tomar 7 mL da "Sol. B" e 10 mL da "Sol. C" e adicionar no balão volumétrico contendo a "Sol. A". Ajustar o pH da solução entre 5,0 – 6,0 transferindo uma alíquota da solução solubilizada e realizando leitura no pHmetro. Adicionar ao balão gotas de NaOH 0,5 M, sempre retornando a alíquota a origem e realizando a leitura após cada adição. Após ajuste do pH na faixa requisitada aferir o volume final com água deionizada;

- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 40% (m/v): pesar 400,000 g de hidróxido de sódio. Transferir para um becher de 1000 mL, adicionar 700 mL de água deionizada, cuidadosamente. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume com água deionizada;
- Destilador para análise de nitrogênio (Kjeldahl);
- Bureta ou titulador automático com precisão de 0,01 mL.

Amostra

As amostras devem ser coletadas em pontos e profundidades previamente determinados, conforme o planejamento da pesquisa. A umidade do solo nas amostras para o processamento poderá ser em torno de 60 % da capacidade de campo ou conforme o objeto da pesquisa. As amostras devem ser imediatamente armazenadas, sendo mantidas o mais próximo das condições em que foram coletadas até sua chegada ao laboratório, onde serão preparadas, procedendo às análises em até três dias ou armazenadas em geladeira a 4°C por até dez dias.

Limitações do método

A determinação da BMS-N possui limitações quanto a replicabilidade, pois sua utilização se dá

em amostras "frescas" de solo, com isso, posteriores coletas podem divergir quanto aos resultados, levando a alta variabilidade até mesmo em réplica de laboratório, sendo necessário o uso de triplicatas. Outro fator importante está na umidade do solo, pois solos com alto teor de umidade são de difícil manuseio no processo de tamisagem, além de influir negativamente na fumigação do solo, interferindo a difusão do clorofórmio. Em contrapartida solos muito secos são desfavoráveis, pois os microorganismos se encontram em forma latente, e portanto sua membrana celular menos susceptível ao rompimento no processo de fumigação, subestimando o valor real da biomassa microbiana. Para evitar tais inconvenientes aconselha-se que a amostragem de campo seja a mais próxima possível de 60 % da capacidade de campo do solo.

Como citado acima, por possuir uma alta variabilidade e a análise realizada em triplicata, seu uso em larga escala é pouco prático, restringindo-se a capacidade analítica do laboratório e a experiência dos envolvidos na análise.

Procedimento

Preparação da amostra

As amostras recém coletadas devem ser peneiradas em malha de 2 mm, retirando-se os fragmentos de animais e vegetais por meio de catação, para que em seguida seja processada.

Determinação da umidade na capacidade de campo do solo

A forma de determinação da umidade na capacidade de campo do solo aqui descrita, apesar de expedita, fornece precisão suficiente.

O método baseia-se na determinação da umidade do solo na capacidade máxima de retenção de água (capacidade de campo) e na determinação da umidade do solo no momento da coleta das amostras, para que se determine se a umidade do solo na coleta é correspondente à desejada.

Realizar o preenchimento de proveta de 100 mL com cerca de 80 mL de solo recém coletado e já peneirado. Adicionar água até que a frente de

molhação atinja cerca de 40 a 50% do volume de solo, recobrir a proveta com papel alumínio, deixando o solo em repouso por 12 horas, ou até que a frente de molhação estacione. A frente de molhação não deve tocar o fundo da proveta, o que invalidaria o procedimento; neste caso deve-se repetir o teste com nova amostra com quantidade menor de água. Retirar uma porção de solo da parte molhada, pesar e levar para estufa à 105°C por 24 horas ou até que o solo atinja peso constante, obtendo o peso do solo seco posteriormente. A determinação da umidade total do solo na capacidade de campo e das amostras oriundas do campo é obtida pela Equação 1, para cálculo para umidade total do solo:

$$U \text{ (g de água g}^{-1} \text{ de solo)} = (P_U - P_S)/P_S$$

onde, P_U = peso do solo úmido; P_S = peso do solo seco, usado tanto para a amostra de solo trazida do campo quanto a retirada da proveta.

Para determinar a umidade percentual relativa (U_R) das amostra frescas de solo frente à umidade do solo na capacidade de campo é utilizada a Equação 2:

$$U_R \text{ (\%)} = (U_A / U_C) \cdot 100$$

onde, U_R = umidade relativa do solo fresco frente a capacidade de campo; U_A = umidade do solo amostrado (g de água g⁻¹ de solo); U_C = umidade do solo na capacidade de campo (g de água g⁻¹ de solo).

Procedimento analítico

As amostras são analisadas em triplicata. Para isto cada amostra será dividida em sete sub-amostras de 20 g (três fumigadas, três não-fumigadas e uma para obtenção da umidade do solo), devidamente pesadas e acondicionadas em frascos de vidro de 100 mL.

Cabe ressaltar que podem ser utilizados os mesmos extratos obtidos na fumigação-extração realizada para quantificação da BMS-C (carbono da biomassa microbiana do solo) descrito por SILVA et al. (2007).

Determinação da umidade do solo

O frasco previamente destinado à determinação de umidade do solo deve ser seco em estufa a 105°C por 24 horas ou até se obter peso

constante. Após seca, a amostra deve ser acondicionada em dessecador até equilíbrio de temperatura com o ambiente e em seguida pesada.

Fumigação

Imediatamente após a pesagem da amostra de solo adicionar aproximadamente 1 mL de clorofórmio isento de etanol com o auxílio de uma pipeta com graduação de 1 mL, em todos os frascos destinados a fumigação (Figura 1). Os frascos são em seguida fechados e armazenados em local isento de luminosidade por 24 horas, com temperatura em torno de 25 a 28°C. No dia seguinte retirar a tampa dos frascos em capela de exaustão, deixando evaporar todo o clorofórmio presente até eliminação completa, como preconizado por BROOKES et al. (1982) e WITT et al. (2000).



Figura 1 – Adição direta de clorofórmio na amostra

Extração

A extração se dá nas amostras fumigadas, após tempo de fumigação de 24h seguida de eliminação dos resíduos de clorofórmio, e nas não-fumigadas, realizado imediatamente após pesagem, procedendo da seguinte forma:

Adicionar 50 mL de solução 0,5 M de sulfato de potássio (K_2SO_4), com o auxílio de um dispensador de 0 a 50 mL.

Agitar por 30 minutos em agitador orbital a 220 RPM, esperar decantar por 30 minutos e transferir o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta para um filtro de papel acoplado a funil e tubo de 50 mL, evitando resuspensão e recuperação de material decantado (Figura 2). Ao final da filtração é obtido o extrato de cada sub-amostra (fumigada ou não-fumigada), que devem ser direcionadas para quantificação do nitrogênio microbiano ou armazenados em geladeira a 4°C por no máximo 10 dias.



Figura 2 – Filtração do material extraído

Determinação do nitrogênio microbiano

Transferir de 10 a 20 mL do extrato para tubo de digestão em suporte com capacidade para 40 tubos, reservando-se dois tubos para amostras controle (branco). Adicionar 2 g da mistura catalisadora e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. com o auxílio de dispensador automático de 0 a 5 mL. Realizar digestão por 2 horas em bloco digestor com temperatura controlada de 350°C. Após equilíbrio da temperatura dos tubos com o ambiente, proceder a destilação por arraste à vapor para análise de nitrogênio (Kjeldahl) seguido de neutralização por volumetria ácido-base empregando ácido sulfúrico 0,0015 M. Ao final da titulação a coloração da solução irá do verde (A) para o rosa (B) (Figura 3).

Cálculo da molaridade exata da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,015 M

Para a realização da padronização (molaridade exata) da solução de ácido sulfúrico utiliza-se o seguinte procedimento:

Adicionar 10 mL da solução THAM e 5 mL da solução de ácido bórico em um Erlenmeyer com o auxílio de uma pipeta automática, e titular sob agitação magnética com ácido a ser determinado. Ao final da titulação a coloração da solução irá de verde para rosa.

Calcular a molaridade exata através da Equação 3,

$$M_{AC} = [(M_{THAM} \cdot V_{THAM}) \cdot 0,5] / V_{AC}$$

Equação 3 – Determinação da Molaridade exata do ácido sulfúrico, onde: M_{AC} = Molaridade do ácido sulfúrico a ser determinada; 0,5 – razão estequiométrica; V_{AC} = volume de ácido sulfúrico gasto na titulação; M_{THAM} = Molaridade da solução THAM; V_{THAM} = volume da alíquota de THAM utilizado na titulação.

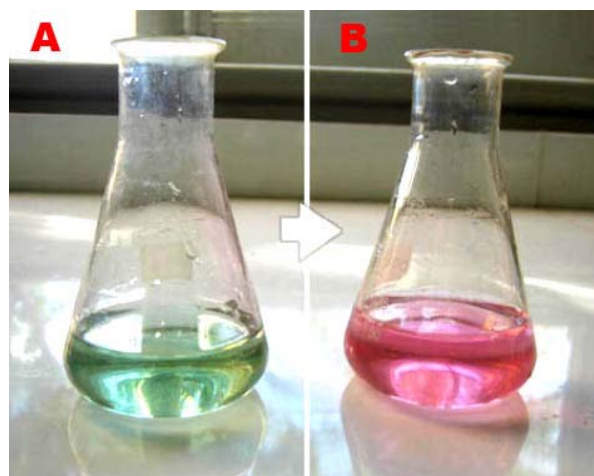


Figura 3 – Ponto estequiométrico da volumetria de neutralização ácido-base.

Cálculo do teor de N nos extratos (Equação 4)

$$N \text{ (mgN kg}^{-1} \text{ solo)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot (M_{ac} \cdot 2) \cdot 0,014 \cdot V_1 \cdot 10^6}{(V_2 \cdot P_s)}$$

Equação 4 – Determinação do nitrogênio nos extratos fumigados e não-fumigados do solo, onde: N - nitrogênio extraído do solo; V_a (mL) - volume gasto na titulação da amostra; V_b (mL) - volume de ácido sulfúrico gasto na titulação da solução controle (branco); M_{ac} - molaridade exata

do ácido sulfúrico; 2 – número de hidrogênios ionizáveis do ácido sulfúrico (H_2SO_4); V_1 - volume da solução extratora no processo de extração; V_2 - volume da alíquota pipetada para quantificação do nitrogênio (utilizar no mínimo 10 mL); 0,014 - miliequivalente do nitrogênio; Ps (g) - massa de solo seco a 105°C.

Cálculo da BMS-N

O cálculo da BMS-N é dado pela Equação 5, utilizando $k_N = 0,54$, preconizado por BROOKES et al. (1985):

$$BMS-N \text{ (mg N kg}^{-1} \text{ solo)} = FN \cdot k_N^{-1}$$

Equação 5 - Cálculo do nitrogênio da biomassa microbiana do solo onde: BMS-N = nitrogênio da biomassa microbiana do solo em mg de N por kg de solo (ou $\mu\text{g g}^{-1}$); FN = fluxo obtido da diferença entre a quantidade de N (mg kg^{-1}), da equação 4, recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada; k_N = fator de correção.

Referências Bibliográficas

ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 449-469. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 46).

BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 837-842, 1985.

BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 14, p. 319-329, 1982.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. C, N e P na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 389-411.

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico) . No prelo.

TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 329-335, 1988.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VETTERLEIN, D.; HÜTTL, R. F. Can applied organic matter fulfil similar functions as soil organic matter? Risk-benefit analysis for organic matter application as a potential strategy for rehabilitation of disturbed ecosystems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 213, p. 1-10, 1999.

WITT, C.; GAUNT, J. L.; GALICIA, C. C.; OTTOW, J. C. G.; NEUE, H. U. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 510-519, 2000.

Comunicado Técnico, 96

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2007): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Claudia Pozzi Jantália e Bruno José Rodrigues Alves
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Edição eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.