

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

**DETERMINAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO:
MÉTODO DA FUMIGAÇÃO-EXTRAÇÃO**

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

**DETERMINAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO:
MÉTODO DA FUMIGAÇÃO-EXTRAÇÃO**

H. De-Polli e J.G.M. Guerra

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

Embrapa-CNPAB. Documentos, 37

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à
Embrapa-CNPAB
Antiga Rodovia Rio/São Paulo
Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500
Telex: (21) 32723 EBPA
Fax: (021)682-1230
Caixa Postal 74505
23851-970 Seropédica, RJ

Comitê de Publicações

Helvécio De-Polli(Presidente)
Johanna Döbereiner
José Ivo Baldani
Paulo Augusto da Eira
Norma Gouveia Rumjanek
Sebastião Manhães Souto
Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

DE-POLLI, H.; GUERRA, J.G.M. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: Método da fumigação-extração.** Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 10 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 37).

1. Biomassa. 2. Carbono. 3. Microrganismo. 4. Solo. 5. Fumigação. 6. Extração. I. Guerra, J.G.M., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 333.9539

© Embrapa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. PRECONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS.....	5
3. PROCEDIMENTO ANALÍTICO	6
4. ESQUEMA SIMPLIFICADO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	8
5. CÁLCULO DA BMS	9
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9

DETERMINAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO: MÉTODO DA FUMIGAÇÃO-EXTRAÇÃO

Helvécio De-Polli¹ & José Guilherme M. Guerra¹

1. INTRODUÇÃO

A biomassa microbiana do solo (BMS) é definida, conceitualmente, como a parte viva da matéria orgânica do solo excluindo-se as raízes e animais maiores do que aproximadamente $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ e, funcionalmente, atua como agente de transformação da matéria orgânica, no ciclo de nutrientes e no fluxo de energia (Jenkinson & Ladd, 1981; Wardle, 1992).

A BMS não é uma estimativa da atividade dos microrganismos, mas da massa microbiana viva total, com base na concentração de algum elemento ou de alguma substância celular. As atividades de algumas enzimas podem ser relacionadas com a BMS e são auxiliares na interpretação da condição funcional da BMS total ou de algum compartimento. Em termos de atividade da microbiota do solo, vários parâmetros podem ser usados, como a respiração basal, atividade de microrganismos celulolíticos, atividades de enzimas como a desidrogenase, urease, fosfatase, etc.

A BMS parece mais sensível as mudanças iniciais no conteúdo de matéria orgânica do solo do que a determinação de C orgânico total (C_{org}) (Jenkinson & Rayner, 1977; Powlson et al., 1987), e a relação $C_{\text{mic}} \cdot C_{\text{org}}^{-1}$ é um parâmetro útil para descrever alterações em ecossistemas com interferência antrópica (Insam & Domsch, 1988).

Diversos trabalhos sobre a fumigação de solos, especialmente com vapores de clorofórmio (CHCl_3), realizados na década de 70, notadamente pelo grupo de D.S.Jenkinson, Rothamsted Experimental Station (UK), levaram à proposição do método da fumigação-incubação (Jenkinson & Powlson, 1976), desencadeando um grande número de trabalhos que propiciaram consideráveis avanços neste campo, surgindo então o método da fumigação-extração. A diferença para o método da fumigação-incubação é que o

¹ Eng. Agr. .PhD., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia(CNPAB), km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ

material celular liberado pelo rompimento da parede celular após a fumigação é recuperado com um extrator fraco como o K_2SO_4 em uma relação solo extrator de 1:4 (Vance et al. 1987) ou 1:2,5 (Tate et al. 1988) logo após a fumigação, eliminando-se os 10 dias de incubação do método anterior. Os dois trabalhos acima citados detalham com clareza as etapas e cuidados metodológicos necessários. Em nossas condições (Rodrigues et al. 1994) realizaram comparações entre os dois métodos e obtiveram maior precisão com o método da fumigação-extração.

2. PRECONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

Anteriormente ao início do procedimento analítico o condicionamento das amostras não pode ser negligenciado, considerando que as metodologias visam estimar o componente microbiano vivo do solo. Sendo assim, de acordo com a condição de armazenagem e processamento da amostra, modificações mensuráveis na BMS podem ocorrer e interferir no resultado final. Idealmente, a amostra deveria ser indeformada, isenta de raízes, macroanimais e de restos orgânicos, ser processada imediatamente após a coleta e apresentar um teor de umidade adequado. Na prática, torna-se difícil que todos estes quesitos sejam alcançados.

Para minimizar as dificuldades relativas à amostragem, armazenagem e processamento, algumas padronizações podem ser implementadas, como:

- O processamento da amostra deve ser feito o mais breve possível, preferencialmente dentro da primeira semana após a amostragem;
- A eliminação de fragmentos de raízes, animais e restos vegetais pode ser feita através de catação, após tamisagem em peneira com abertura de 2, 4 ou 6mm;
- Embora o teor de umidade da amostra não represente uma limitação drástica na determinação da BMS pelo método da fumigação-extração, pode-se realizar uma padronização (equivalente à 40-60% da capacidade máxima de retenção de água do solo), principalmente quando são processadas, para fins de comparação, amostras oriundas de locais diferentes.
- O condicionamento provoca, indubitavelmente, alteração no valor da BMS, porém, torna possível a operacionalização de maior número de amostras, bem como, possibilita a

comparação entre amostras oriundas de locais diferentes.

3. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A amostra é dividida em subamostras (Fig. 1) que sofrerão, respectivamente, fumigação seguida de extração ou extração imediata após a pesagem, para a subamostra que não vai sofrer a fumigação. Recomenda-se trabalhar com subamostras triplicatas, pois, em geral, a precisão da análise não é alta. Logo, ter-se-á seis frascos por amostra (três fumigados e três não fumigados), acrescidos de um frasco para determinação da umidade do solo (em estufa à 105°C por 24h). Os valores da BMS devem ser corrigidos, tendo como base o solo seco à 105°C.

Acondiciona-se 20g de terra em frasco com capacidade para 100ml, que é transferido para dessecador, juntamente com um frasco com água e um outro contendo 10ml de CHCl_3 isento de etanol, permanecendo sob fumigação em sala de incubação mantida no escuro, com temperatura controlada (28°C, p.ex.), por 24h.. Logo após, o CHCl_3 é removido por aspirações sucessivas.

Acrescenta-se 50ml de K_2SO_4 0,5mol.L⁻¹ com o pH ajustado na faixa de 6,5 a 6,8, procedendo-se a extração em agitador com movimento circular horizontal à 220rpm por 30min.. Permitir a decantação por 30min. e proceder a filtração lenta em filtro de papel.

A determinação do C nos extratos fumigado e não fumigado é feita por dicromatometria, a partir da retirada de uma alíquota de 8ml do extrato, adicionando-se 2ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,066mol.L⁻¹, 10ml de H_2SO_4 conc. e 5ml de H_3PO_4 conc. (para alguns solos 1ml já é suficiente). A mistura deve ser aquecida (ebulição) por 5 minutos usando-se refluxo em dedo de água. Após o resfriamento, adiciona-se 80ml de água destilada e 3 gotas de difenilamina (10g . L⁻¹ em ácido sulfúrico concentrado). Com a adição do indicador a solução passa da cor amarela para violeta. O dicromato em excesso é titulado com $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,033mol.L⁻¹ (ponto de viragem: cor violeta para verde). Frascos sem solo (ensaio em branco) contendo todos os reagentes devem receber o mesmo tratamento dado as amostras, sendo usados como controle.

Na preparação dos reagentes deve-se observar que o dicromato de potássio é seco à 105°C por uma hora e seu equivalente grama é igual a $\text{PM} \cdot 6^{-1}$ (PM=peso molecular); o

sulfato ferroso amoniacal tem o seu equivalente grama igual ao $PM.1^{-1}$, sendo que na preparação da solução $0,033\text{mol.L}^{-1}$ pesa-se 13g de sulfato ferroso amoniacal, dissolvendo-o em aproximadamente 400ml de água destilada contendo 10ml de ácido sulfúrico concentrado completando o volume à 1 litro com água destilada; a padronização do sulfato ferroso amoniacal é feita na presença de 5ml de ácido fosfórico e 10 ml de ácido sulfúrico concentrados, 3 gotas de difenilamina como indicador e dicromato de potássio 0,395N como titulante.

4. ESQUEMA SIMPLIFICADO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

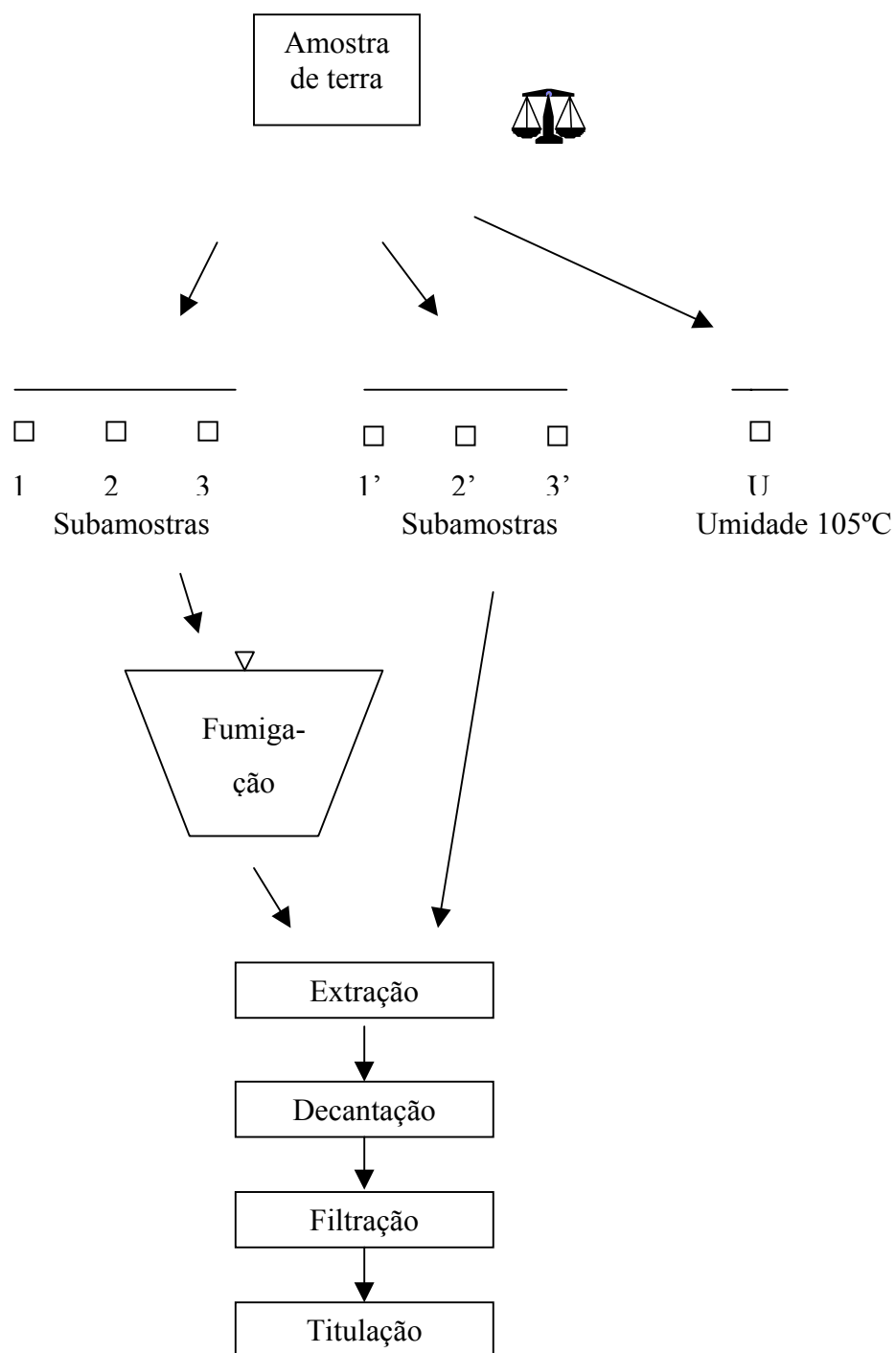


Fig. 1. Esquema simplificado do procedimento analítico para determinação da biomassa microbiana do solo pelo método da fumigação-extração.

5. CÁLCULO DA BMS

O C extraído do solo é calculado pela fórmula:

$$C \text{ (mg} \cdot \text{kg}^{-1}\text{)} = (V_b - V_a) \cdot N \cdot 0,003 \cdot 50 \cdot (8 \cdot P_s)^{-1} \cdot 10^6,$$

onde: C = carbono extraído do solo; V_b (ml) = volume do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); V_a (ml) = volume gasto na titulação da amostra; N = normalidade exata do (NH₄)₂ Fe(SO₄)₂.6H₂O; P_s (g) = massa de solo seco.

O cálculo da BMS é dado pela fórmula:

$$\text{BMS (mg} \cdot \text{kg}^{-1}\text{)} = \text{FC} \cdot \text{kc}^{-1},$$

onde: BMS = biomassa de carbono microbiano do solo em mg de C por kg de terra (ou μg.g⁻¹); FC = fluxo obtido da diferença entre a quantidade de C (mg.kg⁻¹) recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada; kc = fator de correção.

O fator de correção (k_c) em situações que exijam maior exatidão deverá ser calculado para cada tipo de solo. Como para os solos do Brasil o fator ainda não foi determinado, pode-se utilizar o valor 0,33 preconizado por Sparling & West (1988), a fim de expressar a fração do C da BMS recuperada após o processo de fumigação-extração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- INSAM, H.; DOMSCH, K.H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. **Microbial Ecology**, New York, v. 5, p.177-188, 1988.
- JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: Measurement and Turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N., ed. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. v.5. p.415-471.

- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. Method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.8, p.209-213, 1976.
- JENKINSON, D.S.; RAYNER, J.H. The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted Classical Experiments. **Soil Science**, Baltimore, v.123, p.298-305, 1977.
- POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.159-164, 1987.
- RODRIGUES, E.F. da G.; GUERRA; J.G.M.; ALMEIDA, D.L. de; DE-POLLI, H. Biomassa microbiana de carbono de solos de Itaguaí (RJ): Comparação entre os métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p. 427-432, 1994.
- SPARLING, G.P.; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ^{14}C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, p.337-343, 1988.
- 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 and 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 C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.703-707, 1987.
- WARDLE, D.A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews**, Praga, v.67, p.321-358, 1992.