



## Métodos comparativos de quantificação dos teores de carbono da biomassa microbiana e carbono orgânico do solo

**Alessandra Oliveira da Silva<sup>(1)</sup>; Matheus Marques Dias<sup>(2)</sup>; Nayara Moreno Martins<sup>(1)</sup>; William Marra Silva<sup>(3)</sup>; Fábio Martins Mercante<sup>(4)</sup>**

<sup>(1)</sup>Pós-Graduada (Mestrado) em Bioprospecção; Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS; <sup>(2)</sup> Graduando em Química pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, MS; <sup>(3)</sup>Analista, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS; <sup>(4)</sup> Pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

**RESUMO:** A busca por alternativas mais adequadas para a redução de resíduos no processo analítico constitui-se numa estratégia para reduzir o impacto ambiental. O presente trabalho teve por objetivo quantificar o carbono da biomassa microbiana do solo, entre os métodos de espectrofotometria e titulometria, e comparar os métodos Walkley-Black e TOC, para quantificar o carbono orgânico do solo. As amostras foram coletadas na região Sul de Mato Grosso do Sul. Os valores de C-BMS, obtidos por espectrofotometria, foram superiores aos obtidos por titulometria. Contudo pode-se verificar uma correlação linear  $r^2 = 0,9476$ , positiva entre os métodos. Os teores mais elevados da matéria orgânica do solo foram obtidos pelo método Walkley-Black, verificando-se uma correlação linear significativa entre os métodos ( $r^2 = 0,994911$ ). Assim, os métodos de espectrofotometria e do TOC apresentaram-se como alternativas positivas, possibilitando eliminar a utilização de dicromato de potássio.

**Termos de indexação:** Walkley-Black, carbono orgânico total, análise de solo.

### INTRODUÇÃO

O processo essencial de ciclagem de nutrientes, acumulação e decomposição da matéria orgânica do solo nos ecossistemas naturais apresentam uma integração harmoniosa entre a cobertura vegetal e os atributos físicos, químicos e biológicos do solo. Os indicadores biológicos de qualidade do solo, como a biomassa microbiana, são utilizados como parâmetros sensíveis para aferição do manejo adequado do solo, em estudos de sustentabilidade (Mendes et al., 2011). Variações sazonais e ações antropogênicas podem promover variação no número de indivíduos ou até mesmo na dinâmica bioquímica natural da comunidade de microrganismos do solo. Essas variações podem ser medidas por meio da biomassa microbiana e por variações de diferentes processos enzimáticos, que atuam

como bioindicadores de qualidade do solo (Nielsen & Winding, 2002).

Assim, para que se avalie os efeitos de interferência nos agroecossistemas é necessária a utilização de métodos analíticos para quantificação e determinação dos teores de carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS) e do carbono orgânico do solo, que sejam eficientes e capazes de evitar a contaminação ambiental com compostos tóxicos.

Dentre os métodos amplamente utilizados no Brasil, para a determinação do carbono proveniente da BMS, destacam-se os descritos por Vance et al., (1989), que determina a BMS a partir da extração do C-orgânico de amostras fumigadas e não fumigadas. De modo geral, o carbono orgânico do solo tem sido determinado na rotina do laboratório de solos de Embrapa Agropecuária Oeste por oxidação via seca (Auto analisador . TOC) em substituição ao método Walkley-Black, modificado (WB), conforme Pereira et al. (2010).

Diante da disponibilidade de várias metodologias em uso no Brasil, torna-se necessária a busca por métodos mais adequadas para a redução de resíduos tóxicos no processo analítico. Além disso, deve-se considerar a dificuldade de comparação de resultados experimentais, quando diferentes métodos são empregados. Assim, este estudo teve como objetivo quantificar os teores de C-BMS, estabelecendo uma comparação entre o método de espectrofotometria e titulometria, e comparar os métodos Walkley-Black e TOC para a quantificação do carbono orgânico do solo, em duas fitofisionomias naturais de Mato Grosso do Sul.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de solo de duas fitofisionomias naturais distintas, da região Sul de Mato Grosso do Sul. Os sistemas de vegetação nativa foram selecionados com base em levantamentos preliminares, levando em consideração áreas de Florestas Semidecíduas e

Cerrado com vegetação primária, sendo designadas como: (i) mata Embrapa - vegetação nativa (Floresta Semidecídua), em solo com classe textural muito argilosa; (ii) mata Itahum - vegetação nativa (Floresta Semidecídua, em solo com classe textural argilosa; (iii) cerrado Embrapa - vegetação típica de Cerrado, em solo com classe textural muito argilosa; e (iiii) cerrado Itahum - vegetação típica de Cerrado, com classe textural franco-arenosa. A amostragem do solo foi realizada em abril de 2013, na profundidade de 0-10 cm, sendo coletadas quatro amostras compostas em cada sistema. De cada amostra, foram realizadas três repetições analíticas em cada método.

#### **Carbono da biomassa microbiana do solo: métodos da titulometria e espectrofotometria**

Para a determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS), foram utilizadas duas metodologias: titulometria e espectrofotometria. O processo de extração foi idêntico em ambos métodos. Inicialmente, as amostras de solo foram peneiradas (<2mm) e subdivididas em triplicatas, sendo três fumigadas e não fumigadas. O carbono foi extraído com 50 mL de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , após agitação por 30 minutos.

No método da titulometria, a partir do substrato extraído, procedeu-se à digestão, coletando-se 8,0 mL da alíquota, que foram adicionados em um erlenmeyer. Em seguida, adicionaram-se 2,0 mL de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ )  $0,066 \text{ mol L}^{-1}$ , 5 mL de ácido fosfórico concentrado e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo aquecidos em chapa aquecedora ( $300^\circ\text{C}$ ), por 5 minutos, e resfriada, acrescentando 80 mL de água destilada. A titulação foi realizada com sulfato ferroso amoniacal [ $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ]  $0,033\text{M}$  e difenilamina ( $(C_6H_5)_2NH$ ) 1%, como indicador.

No método por espectrofotometria, coletou-se de cada uma das subamostras, uma alíquota de 2 mL, do mesmo extrato usado para o método de titulometria. Cada alíquota foi transferida para um tubo de ensaio e, em seguida, adicionaram-se, em cada subamostra, 3,0 mL de água, 2,5 mL de solução de trabalho (300 mL de pirofosfato de sódio ( $Na_2P_2O_7$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 46 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 20 mL de permanganato de potássio ( $KMnO_4$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 80 mL de sulfato de manganês mono-hidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 2,5 mL de ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  concentrado; essas subamostras foram agitadas e mantidas em repouso por 2 horas. Em seguida, as subamostras foram submetidas à leitura, num espectrofotômetro, em comprimento de onda de 495 nm.

#### **Carbono orgânico: métodos Walkley-Black e Auto analisador ETOC**

Após a determinação do carbono da biomassa microbiana (C-BMS), as amostras de solo foram secas em estufa com circulação de ar forçado à  $40^\circ\text{C}$ , moídas em moinho de martelo, peneirado em malha de 2 mm, coletada uma alíquota de 05 mL e masserado em almofariz de ágata, para realização da análise de carbono orgânico total.

Para determinação do carbono orgânico do solo pelo método Walkley-Black, foram pesadas 0,50 g da amostra do solo, sendo transferida para um erlenmeyer de 125 mL, adicionado-se 05 mL de solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) à  $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, adicionaram-se 10 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado (PA). Após resfriamento, foram adicionados cerca de 50 mL de água destilada. Posteriormente, foi adicionado indicador Orto-Phenotrolina (ferroína), sendo titulado com sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )  $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ , até o ponto de viragem.

A determinação de carbono orgânico total (TOC) no solo foi realizada em triplicata, com 250 mg de amostra de solo por oxidação a  $900^\circ\text{C}$ . Para os cálculos, fez-se uso de uma curva de calibração, obtida com padrão de glicose. As medidas foram realizadas no aparelho Total Organic Carbon Analyser, TOC-V, da marca Shimadzu, acoplado ao Solid Sample Module, modelo SSM-5000 A, da marca Shimadzu, no Laboratório de Solos da Embrapa Agropecuária Oeste.

#### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as comparações de médias foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Além disso, procedeu-se a análise de regressão na comparação entre os métodos.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os valores de carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS) por espectrofotometria foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos obtidos por titulometria (Figura 1), verificando-se uma correlação linear positiva entre os métodos ( $r^2 = 0,949782$ ). Silva et al. (2012), comparando os métodos de espectrofotometria e titulometria em amostras de solo sob diferentes manejos, porém, com a mesma textura, também verificaram uma correlação linear ( $r^2 = 0,9476$ ) entre os dois métodos.

Os valores de C-BMS determinados por

titulometria, mostraram-se similares ( $p < 0,05$ ) entre todos os sistemas avaliados (Figura 1).

Quando os sistemas sob vegetação natural foram comparados, pelo método da espectrofotometria, verificou-se que o sistema sob Floresta Semidecídua amostrado na Embrapa (MEMB) foi superior ( $p < 0,05$ ) aos demais sistemas avaliados. Por outro lado, os menores valores foram verificados no sistema sob Cerrado amostrado em Itahum - CEIT (Figura 1).

Os valores encontrados entre os métodos Walkley-Black e TOC para a determinação da matéria orgânica do solo variaram entre os sistemas avaliados (Figura 2). Contudo, na comparação entre os métodos de análise, dentro de cada sistema, não foram detectadas diferenças significativas (Figura 2). Nestas avaliações, verificou-se uma correlação linear significativa e positiva entre os dois métodos utilizados ( $r^2 = 0,994911$ ).

## CONCLUSÕES

1. O método da espectrofotometria apresentou-se como uma alternativa ao método da titulometria, possibilitando eliminar a utilização de dicromato de potássio nos procedimentos analíticos para quantificação do carbono da biomassa microbiana do solo e, conseqüentemente, a geração de resíduos tóxicos.

2. Dentre os métodos avaliados para a quantificação da matéria orgânica do solo, o TOC mostrou-se como uma alternativa ao método Walkley-Black, possibilitando a eliminação de resíduos tóxicos, sendo apresentada uma boa reprodutibilidade, o que facilita a sua operação.

## AGRADECIMENTOS

Ao PROBIO II - Projeto Nacional de Ações Integradas Público-Privadas para a Biodiversidade pelo apoio financeiro à pesquisa. Fábio M. Mercante agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

## REFERÊNCIAS

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B.; CUNHA, M. H. et al. Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: FALEIRO, A.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Ed.). Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 219-244.

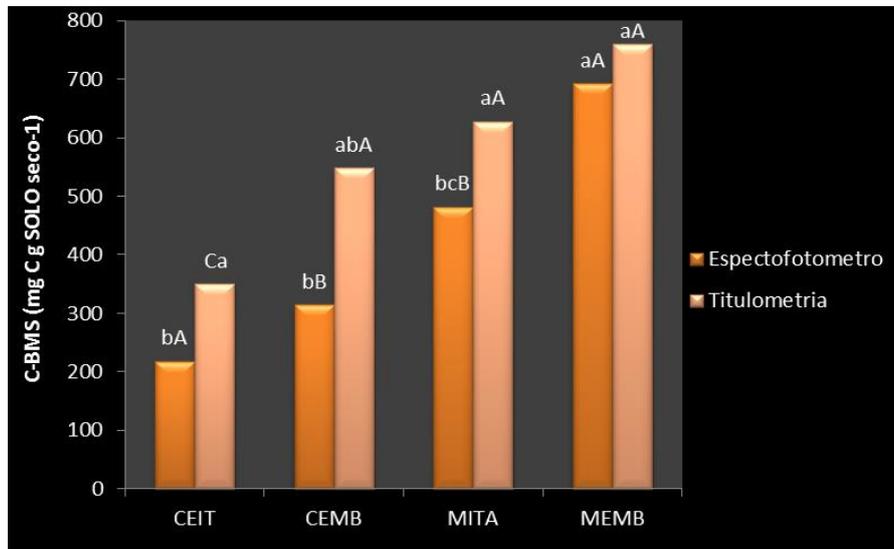
NIELSEN, M. N. & WINDING, A. Microorganisms as indicators of soil health. Denmark: National

Environmental Research Institute, 2002. 84p. (Technical Report, 388).

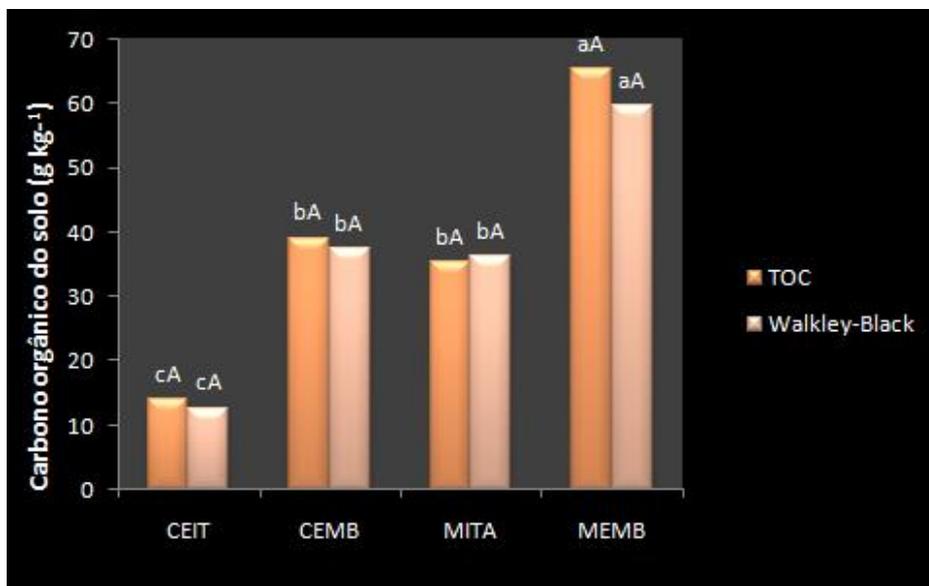
PEREIRA, E. R.; LOPEZ, A. H. D.; FROTA, C. et al. Comparação de metodologias para a determinação da matéria orgânica de solos representativos de Mato Grosso do Sul. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIAS E GESTÃO DE LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, 15.; SIMPÓSIO SOBRE METODOLOGIAS DE LABORATÓRIOS DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2., 2010. A pesquisa agropecuária como instrumento para a competitividade e o desenvolvimento sustentável: resumos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

SILVA, A. O.; SILVA, W. M.; MERCANTE, F. M. Método alternativo para quantificação do carbono da biomassa microbiana do solo In: SEMINÁRIO DE AGROECOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL, 4., 2012.. O saber tradicional e o científico: a interação encurtando caminhos para o desenvolvimento sustentável: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 1 CD ROM. .

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, 19:703-707, 1987.



**Figura 1** É Carbono da biomassa microbiana do solo, avaliada em duas fitosionomias distintas: Cerrado (CEIT: cerrado Itahum; CEMB: cerrado Embrapa) e Floresta Semidecídua (MITA: mata Itahum; MEMB: Mata Embrapa), pelo método de titulometria e espectrofotometria. Valores médios de quatro repetições. Letras diferentes sobre a barras, sendo minúscula entre diferentes sistemas naturais, para cada método, e maiúscula entre os métodos de espectrofotometria e titulometria, para cada sistema, indicam contraste pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 2** É Carbono orgânico do solo, avaliada em duas fitosionomias distintas: Cerrado (CEIT: cerrado Itahum; CEMB: cerrado Embrapa) e Floresta Semidecídua (MITA: mata Itahum; MEMB: Mata Embrapa), pelo método Walkley-Black e Auto analisador. TOC. Valores médios de quatro repetições. Letras diferentes sobre as barras, sendo minúscula entre diferentes sistemas naturais, para cada método, e maiúscula entre os métodos de Walkley-Black e Auto analisador. TOC, para cada sistema, indicam contraste pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.