

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 248

Uso de Espectrofotometria como Alternativa para a Diminuição da Produção de Resíduos de Cromo na Quantificação do Carbono da Biomassa Microbiana

*Adriano Moreira Knupp
Anderson Petrônio de Brito Ferreira*

Embrapa Arroz e Feijão
Santo Antônio de Goiás, GO
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rod. GO 462, Km 12
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (0xx62) 3533 2100
Fax: (0xx62) 3533 2123
www.cnpaf.embrapa.br
sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Luís Fernando Stone*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Membro: *Beata Emöke Madari*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*
Capa: *Sebastião José de Araújo*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2009): 500 exemplares

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 Arroz e Feijão

Knupp, Adriano Moreira.

Uso de espectrofotometria como alternativa para a diminuição da
produção de resíduos de cromo na quantificação do carbono da biomassa
microbiana / Adriano Moreira Knupp, Enderson Petrônio de Brito Ferreira. –
Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2009.

32 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 248)

1. Espectrofotometria. 2. Análise química. 3. Metal pesado. 1. Ferreira,
Enderson Petrônio de Brito. II. Título. III. Embrapa Arroz e Feijão. IV. Série.

CDD 621.367 (21. ed.)

© Embrapa 2009

Autores

Adriano Moreira Knupp

Biólogo, Mestre em Biotecnologia Vegetal,
analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio
de Goiás, GO
adrianoknupp@cnpaf.embrapa.br

Enderson Petrônio de Brito Ferreira

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitotecnia,
pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo
Antônio de Goiás, GO
enderson@cnpaf.embrapa.br

Apresentação

Em função de sua extrema importância para o fortalecimento do agronegócio brasileiro, a Embrapa possui uma presença marcante no país e no mundo. Cada vez mais, suas ações devem ser pautadas em sintonia com as exigências de um mercado global, extremamente plástico.

Neste cenário, o desenvolvimento sustentável, muito além de um simples modismo, ocupa, de maneira crescente, uma importância como estilo de produção e consumo (inclusive agregando valores às marcas) que visa ao equilíbrio ambiental, econômico e social.

Em consonância com a irreversível mudança nos paradigmas, nos últimos anos, a Embrapa Arroz e Feijão vem desenvolvendo seu plano de gestão ambiental focando na mobilização, conscientização e capacitação do seu corpo técnico para o reconhecimento dos impactos negativos de suas atividades e para a proposição de ações que venham diminuir ou mitigar esses efeitos.

Neste contexto, a melhoria constante de seus produtos e processos, que sempre foi o foco da empresa, não deve estar dissociada de ações pró-ativas para a preservação ambiental.

Este trabalho vislumbra a possibilidade de utilização da espectrofotometria para a quantificação do carbono da biomassa microbiana como forma de tornar a análise mais ágil e menos onerosa do ponto de vista ambiental.

Os Autores

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Introdução | 9 |
| Objetivos | 12 |
| Material e métodos | 12 |
| a) Coleta de amostras de solo | 12 |
| b) Elaboração de solução digestora para análise espectrofotométrica | 13 |
| c) Construção das curvas-padrão para análise espectrofotométrica | 14 |
| d) Extração e quantificação do Carbono da Biomassa Microbiana (C-BMS) | 15 |
| e) Recuperação do carbono de soluções-padrão por titrimetria: | 18 |
| Resultados e discussão | 18 |
| Conclusões | 30 |
| Referências | 31 |

Uso de Espectrofotometria como Alternativa para a Diminuição da Produção de Resíduos de Cromo na Quantificação do Carbono da Biomassa Microbiana

Adriano Moreira Knupp

Anderson Petrônio de Brito Ferreira

Introdução

O grande desafio da espécie humana neste século XXI será o equacionamento das suas atividades com a sustentabilidade ambiental.

A forma imediatista de lidar com o planeta Terra tem trazido consequências irreparáveis e a humanidade começou a perceber a necessidade de desenvolver-se economicamente de maneira menos vilipendiosa no intuito de proteger sua própria existência. Desde os últimos anos do século passado, diversos eventos de cunho mundial vêm sendo organizados com a função de alertar a sociedade, e o poder constituído, para a necessidade de mudanças de paradigmas.

Numa dessas iniciativas, nos anos de 1980, foi gerado o Relatório Brundtland, que estabeleceu a definição de desenvolvimento sustentável (apesar de a conferência de Estocolmo de 1972 ter abordado esse tema sem uma expressão definida), estabelecendo que as necessidades do presente devam ser atendidas sem que se comprometa a possibilidade das gerações futuras atenderem às suas necessidades (COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, 1991).

Em consonância com os preceitos do desenvolvimento sustentável, as ações da Embrapa têm sido pautadas numa forte responsabilidade

ambiental e, de maneira crescente, novas estratégias e programas vêm sendo implantados visando à diminuição do impacto ambiental das atividades de pesquisa, além dos programas de conscientização de funcionários e das comunidades vizinhas.

Algumas atividades desenvolvidas em laboratório utilizam reagentes perigosos à saúde do usuário, além de gerarem altas quantidades de resíduos, aumentando o passivo ambiental da Embrapa. Além das preocupações inerentes à manipulação de produtos, com o uso adequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e Coletiva (EPC), ações e metodologias que venham a reduzir os volumes de resíduos produzidos se fazem cada vez mais necessárias.

Na Embrapa Arroz e Feijão, o procedimento para a quantificação do carbono da biomassa microbiana (C-BMS), realizado no laboratório de Biologia do Solo, é baseado na dicromatometria, onde as concentrações de carbono nos extratos fumigados e não fumigados são determinadas por via indireta, através da titulação do cromo hexavalente em excesso após a digestão com dicromato de potássio. Uma solução de sulfato ferroso amoniacal $0,0333 \text{ mol L}^{-1}$ é utilizada para a titulação.

O dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) é um sólido solúvel em água, considerado altamente tóxico, cujo cromo presente encontra-se na forma hexavalente, a mais reativa com organismos vivos. O grande poder de toxidez desse cromo se deve ao fato de possuir livre difusão através das membranas celulares e de ser um forte agente oxidante. Além disso, o cromo trivalente, um dos produtos da digestão do dicromato na quantificação de carbono, em grandes concentrações, pode causar problemas celulares em virtude de possuir alta capacidade de interagir com diversos compostos orgânicos, tais como importantes enzimas funcionais, inibindo-os (KOTÁS; STASICKA, 2000).

Trabalhos recentes abordaram a capacidade de toxidez do cromo hexavalente, tais como o de Stout et al. (2009), que demonstraram o poder carcinogênico desse composto quando administrado em soluções por via oral em ratos; ou o de Espinoza-Quiñones et al. (2009), que

sugerem a inibição do crescimento radicular em cebolas, promovida pela forma hexavalente, como parâmetro para detectar contaminação em águas de rios; e ainda o de O'Brien et al. (2009) que relatam um mecanismo molecular de indução à mutagênese.

O potencial tóxico do dicromato de potássio implica, não somente na obrigatoriedade da utilização dos EPIs e EPCs, como na manipulação minuciosa e segura para evitar contaminação ambiental e acidentes pessoais, além do tratamento adequado dos resíduos.

Alternativas que venham a reduzir os volumes de resíduos, além de atenuar os riscos de contaminação pessoal e ambiental, podem contribuir para a diminuição dos custos com o tratamento desses resíduos.

Na busca de um método que mostrasse, pelo menos, a mesma eficiência na extração do carbono de amostras de solos que o método proposto por Vance et al. (1987), e que, em contrapartida, reduzisse o volume de resíduos de cromo produzidos no final do processo, foram realizados cálculos para avaliar qual poderia ser o nível de redução dos solutos (dicromato, ácidos e extrato de solo) a ser alcançado para que houvesse uma resposta à leitura espectrofotométrica e que fosse também capaz de abranger uma faixa de concentração de carbono acima daquelas que vêm sendo encontradas nos solos mais ricos, mantendo-se uma margem de segurança para análises futuras, além de se manter a capacidade de quantificação do carbono similar àquela da titrimetria.

O grande passo almejado foi a redução do volume final da solução de digestão, que no proposto por Vance et al. (1987) é formulada com 8 mL do extrato de solo, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, 5 mL de ácido fosfórico concentrado e 2 mL de solução de dicromato de potássio $0,0667 \text{ mol L}^{-1}$. Neste processo, o volume do rejeito final é aumentado, pois, após digestão, cada subamostra recebe um complemento de água destilada até o volume final de 50 mL, em seguida passa por titulação com sulfato ferroso amoniacal $0,0333$

mol L⁻¹, cujo volume utilizado na titulação dependerá da quantidade de cromo hexavalente residual na solução, que por sua vez é influenciada pelos teores de carbono da amostra. Dependendo dos níveis de carbono presentes nas amostras, o volume final de solução contaminada pode chegar a três vezes o volume inicial, que é de 25 mL, o que torna o processo de manipulação e descarte de resíduo mais dispendioso.

Objetivos

Avaliar método alternativo de determinação do C-BMS para a diminuição do volume de resíduos gerados com a digestão do dicromato.

Reduzir a concentração de cromo utilizada na solução digestora sem comprometimento na recuperação dos valores de C-BMS nas amostras.

Agilizar o processo analítico, diminuindo o tempo gasto na determinação do C-BMS.

Material e métodos

a) Coleta de amostras de solo

Solos de três locais distintos, sob diferentes formas de manejo, foram avaliados com intuito de se obter um contraste entre os valores de carbono da biomassa microbiana (C-BMS). Para cada um dos solos, com auxílio de um trado, foram feitas três amostragens para as profundidades 0-10 cm e 10-20 cm. Estas profundidades foram escolhidas em função de a maior atividade biológica do solo ser mais intensa até os 20 cm, por ser a região de maior acúmulo de matéria orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De cada amostra de campo, peineradas com malha de 2 mm, foram obtidas triplicatas e cada uma das triplicatas originou seis subamostras no laboratório, das quais três foram utilizadas para fumigação e três não foram fumigadas. Na fazenda Estrela do Sul, a 10 km de distância de Nova Xavantina (MT) foram coletadas, de área de pastagem degradada, em 05 de março de 2009, amostras de um Neossolo Quartzarênico, de textura

franco arenosa, com 1,3% de matéria orgânica (M.O.) nas camadas superficiais, como possível referência para um solo com baixos teores de C-BMS. Em Santo Antônio de Goiás (GO), no dia 04 de abril de 2009, foram coletadas amostras de um Latossolo Vermelho, de textura franco argilosa, com 2,01% de M.O., proveniente da Estação Experimental em Agroecologia (EEA), nas proximidades de uma área de plantio de feijão, no Km 12 da rodovia GO-462 e também de Latossolo Vermelho, de textura franco argilosa, com 2,00 % de M.O., em uma área de mata próxima à Estação. Essas duas áreas foram escolhidas como possíveis referências para solos com maiores teores de C-BMS, supondo-se ainda, a área de mata como aquela que apresentaria os maiores teores entre os três solos.

As amostras obtidas foram avaliadas pelo método titrimétrico proposto por Vance et al. (1987), que é o método mais usado para a avaliação do C-BMS, e pelo método proposto neste trabalho, onde menores volumes de dicromato e ácido são utilizados e a avaliação é realizada por espectrofotometria. Para efeito de análise de variância, os valores de C-BMS obtidos foram avaliados usando modelo matemático para o delineamento de blocos inteiramente casualizados com a finalidade de diminuir interferência resultante de possível desuniformidade dos solos amostrados. Em seguida, as médias dos tratamentos foram contrastadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), para se avaliar a funcionalidade do processo espectrofotométrico, usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

b) Elaboração de solução digestora para análise espectrofotométrica

A primeira abordagem concebida foi a redução de cada soluto à sua quarta parte, o que corresponderia a 2 mL do extrato de solo, 2,5 mL de ácido sulfúrico, 1,25 mL de ácido fosfórico e 0,5 mL da solução de dicromato. No entanto, como o processo propõe análise por espectrofotometria após a digestão, torna-se dispensável o uso de ácido fosfórico para reagir com compostos de ferro, uma vez que não se utilizará titulação com sulfato ferroso amoniacal, tendo em vista que, por esse processo, a detecção do cromo não sofreria influência de tais compostos.

Os primeiros testes foram realizados com as soluções-padrão de biftalato até que se chegasse a um nível de digestão que abrangesse uma concentração de carbono superior àquelas que vêm sendo obtidas no método proposto por Vance et al. (1987). A partir do sucesso com as soluções padrões e da obtenção das curvas, passar-se-ia para a avaliação das amostras de solo sob os dois processos, titrimetria e o espectrofotométrico. Os valores obtidos nos dois processos foram contrastados para verificar a eficiência da espectrofotometria.

Após a determinação da concentração ideal, capaz de obter alto índice de digestão, para elaboração da solução digestora, o dicromato de potássio foi submetido a aquecimento de 105 °C por uma hora, para secagem. Em seguida, diluiu-se 4,8 g de dicromato de potássio em água destilada e completou-se o volume para 250 mL aos quais foram adicionados 750 mL de ácido sulfúrico. A solução sulfocrômica foi armazenada em frasco âmbar.

c) Construção das curvas-padrão para análise espectrofotométrica

Como referência para as análises espectrofotométricas, curvas-padrão foram desenvolvidas, contendo concentrações conhecidas de carbono. O biftalato de potássio ($C_8H_5KO_4$) foi utilizado como soluto-padrão para as concentrações de carbono. As diferentes concentrações de carbono testadas foram obtidas com a diluição do biftalato de potássio em alíquotas da solução utilizada para extrair o carbono das amostras de solo (K_2SO_4 0,5 M pH 6,5 - 6,8).

Durante o preparo das soluções utilizadas na construção das curvas, pesou-se 0,454 g de biftalato de potássio (cada mg de biftalato corresponde a 0,441 mg de carbono). O biftalato foi diluído em 200 mL de solução extratora (K_2SO_4 0,5 M pH 6,5 - 6,8), obtendo-se uma solução-padrão com concentração de 1 mg C mL⁻¹. A partir dessa solução, por diluições sucessivas em K_2SO_4 , foram obtidas soluções com volume de 50 mL nas seguintes concentrações: 0,8; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg C mL⁻¹.

Alíquotas de 2 mL de cada solução de biftalato, em triplicatas, foram transferidas para tubos de cultura 16x100 mm. Em seguida, cada tubo recebeu 4 mL da solução digestora sulfocrômica (descrita no item anterior) e foi submetido a agitação em vórtex para homogeneizar o conteúdo. Os tubos foram transferidos para bloco digestor aquecido a 100°C durante 30 minutos.

O padrão zero, branco para espectrofotometria, foi obtido com alíquotas de 2 mL da solução extratora (K_2SO_4), que recebeu 4 mL da solução digestora e foi submetido à mesma temperatura (100°C) pelo mesmo tempo (30 minutos) no mesmo bloco das demais amostras.

Após digestão, os tubos foram mantidos fora dos blocos, em suportes apropriados, até alcançarem a temperatura ambiente. Em seguida, com auxílio de um espectrofotômetro, as amostras foram submetidas à leitura em dois diferentes comprimentos de onda (600 e 650 nm). Os valores de absorvância, obtidos em triplicatas para cada concentração de carbono, foram utilizados para construção das curvas-padrão nos dois comprimentos de onda.

d) Extração e quantificação do Carbono da Biomassa Microbiana (C-BMS)

As amostras de solo foram peneiradas através de malha de 2 mm, sendo removidos os fragmentos vegetais. De cada amostra foram obtidas seis subamostras de 20 g cada, das quais três foram submetidas à fumigação e outras três não foram fumigadas. Os teores de umidade das subamostras foram ajustados para 80% da capacidade de campo. Em seguida, as amostras que não sofreram fumigação foram incubadas à temperatura ambiente por sete dias, em frascos hermeticamente fechados e mantidos sob ausência de luz. Aquelas relacionadas para fumigação ficaram incubadas da mesma maneira até o sexto dia, quando foram acondicionadas sem tampas em dessecador sob atmosfera de clorofórmio ($CHCl_3$) e ausência de luz.

No processo de extração do C-BMS, as subamostras receberam 60 mL de uma solução 0,5 M de K_2SO_4 (TATE et al., 1988), sendo agitadas por

40 minutos a 170 rpm e posteriormente deixadas sob decantação por 30 minutos. Em seguida, foram filtradas em papel filtro para a separação do extrato a ser utilizado na determinação do C-BMS pelo método proposto por Vance et al. (1987) e pelo procedimento espectrofotométrico.

Na avaliação do C-BMS pelo método da fumigação-extração, proposto por Vance et al. (1987), uma alíquota de 8 mL do extrato das amostras foi transferida para tubos de digestão (25 cm) e adicionados 2 mL de uma solução 0,0667 mol L⁻¹ de dicromato de potássio e 15 mL de uma solução 2:1 de H₂SO₄:H₃PO₄. Os tubos foram levados para bloco digestor aquecido a 100°C durante 30 minutos. Após aquecimento, os tubos digestores, com as soluções, foram mantidos fora dos blocos até alcançarem a temperatura ambiente. Em seguida, cada subamostra digerida foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL e teve seu volume completado com água destilada até 50 mL. Em cada erlenmeyer foram adicionadas sete gotas do indicador ferroína e, sob agitação, procedeu-se a titulação com solução 0,0333 mol L⁻¹ de sulfato ferroso amoniacal (SFA), dissolvido em ácido sulfúrico 0,4 M. O volume gasto foi anotado em uma ficha de resultados e utilizado posteriormente para quantificação do C-BMS.

Para o estabelecimento dos valores de C-BMS são utilizadas adaptações das fórmulas descritas por De-Polli e Guerra (1997) (Eq. 1 e 2).

Carbono extraído do solo (mg Kg⁻¹):

$$C = (Vb - Va) \cdot N \cdot 0,003 \cdot 60 \cdot (8.Ps)^{-1} \cdot 10^6 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

Vb = volume médio de SFA gasto na titulação dos brancos

Va = volume médio de SFA gasto na titulação das subamostras

N = normalidade real do SFA

Ps = peso de solo seco a 105°C

C-BMS:

$$C\text{-BMS} = FC \cdot kc^{-1} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo:

FC = diferença ente o C obtido das amostras fumigadas e não fumigadas

kc = fator de correção (0,33)

No procedimento espectrofotométrico, do mesmo extrato usado para a avaliação pelo método proposto por Vance et al. (1987), foi retirada de cada uma das subamostras uma alíquota de 2 mL. Cada alíquota foi transferida para tubo de cultura com 16x100 mm e, em seguida, com auxílio de dispensador, cada subamostra recebeu 4 mL da solução digestora sulfocrômica descrita no item *b*. Os tubos foram agitados em vórtex, para homogeneizar a solução, e posteriormente tampados, para evitar evaporação durante a digestão, e em seguida, foram transferidos para um bloco digestor aquecido a 100°C durante 30 minutos, do mesmo modo como descrito para o método proposto por Vance et al. (1987).

Após digestão, os tubos foram mantidos fora dos blocos, em suportes apropriados, até alcançarem a temperatura ambiente. Em seguida, com auxílio de um espectrofotômetro, foram submetidos à leitura em dois comprimentos de onda (600 e 650 nm), tendo sido anotados os valores de absorbância, e as médias das triplicatas foram utilizadas para a quantificação do C-BMS.

A média das triplicatas das subamostras foi substituída na fórmula:

$$X = (\text{média das triplicatas} - b) \cdot a^{-1} \quad (\text{Eq. 3}),$$

onde **a** e **b** são valores das equações de reta das curvas-padrão.

O resultado **X** corresponde a mg C mL⁻¹. Esse valor encontrado foi substituído na fórmula:

$$Z = (X \cdot 60 \cdot 1000) \cdot ps^{-1} \quad (\text{Eq. 4}),$$

onde **60** corresponde ao volume de solução extratora utilizada e **ps** ao peso seco em 20 g de solo.

O resultado **Z** corresponde à mg C Kg⁻¹ de solo seco. Desse valor obtido nas amostras fumigadas subtrai-se o valor obtido para Z nas amostras não fumigadas e, para obtenção do valor de C-BMS, divide-se o resultado pelo fator de correção *kc*, como expresso na fórmula:

$$\{Z (\text{fumigadas}) - Z' (\text{não fumigadas})\} \cdot kc^{-1} \quad (\text{Eq. 5})$$

O valor “kc” para solos tropicais pode ser 0,33, segundo Feigl et al. (1995).

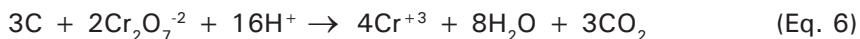
e) Recuperação do carbono de soluções-padrão por titrimetria:

Realizou-se um teste para avaliar a eficiência da recuperação de carbono por titulação. As mesmas soluções de carbono utilizadas nas curvas-padrão, formuladas com biftalato de potássio, serviram de parâmetro para a titulação com sulfato ferroso amoniacal nas mesmas condições empregadas para amostras de solo, com 8 mL da solução de biftalato simulando o extrato de solo e as concentrações de ácidos e dicromato mantidas como no processo convencional. O tempo de digestão e temperatura foram os mesmos (30 minutos; 100°C).

Resultados e discussão

Alguns trabalhos (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1995; GRANER et al., 1998; DUDA et al., 2005) forneceram indícios para a busca da faixa adequada de comprimento de onda que seria adotada neste trabalho. O cromo trivalente e o hexavalente podem ser detectados por comprimentos de onda no intervalo entre 390 e 650 nm. Avaliou-se, então, nessa faixa, em intervalos de 10 nm, quais seriam os melhores comprimentos de onda para análise. Após essa avaliação, decidiu-se utilizar os comprimentos de 600 e 650 nm para detecção do cromo trivalente, devido à boa reprodutibilidade.

Nos dois procedimentos utilizando espectrofotometria, assim como na titulação, o montante da redução de dicromato é considerado quantitativamente ligado ao teor de C-orgânico da amostra (Equação 6). Dessa forma, a única modificação seria a quantificação do cromo trivalente, resultado da redução do dicromato, em detrimento da titulação do excesso de dicromato, como ocorre no método proposto por Vance et al. (1987).



Diversos cálculos e tentativas foram realizados até que se chegasse ao procedimento proposto neste trabalho. As primeiras tentativas de digestão das amostras diretamente nos tubos que seriam utilizados para

espectrofotometria não obtiveram sucesso, pois se utilizou o banho-maria como fonte de calor e não houve digestão adequada das amostras. Procedeu-se, então, a digestão nos blocos digestores, como o descrito nos tópicos anteriores. Uma outra grande dificuldade em obter reprodutibilidade nas análises espectrofotométricas foi a adoção inicial de tubos de cultura de 13x100 mm. A partir do momento que se adotou os tubos de 16x100 mm, aumentou-se o caminho óptico, e passou a haver reprodutibilidade.

Após a definição dos tubos adequados para as análises e da adaptação aos blocos digestores, a partir da Equação 6, estabeleceu-se três concentrações de dicromato para os testes de digestão do padrão com biftalato, em g L^{-1} (2,45; 4,80; 9,16) correspondendo a, respectivamente, 8,33; 16,32 e 31,14 mmol amostra^{-1} . As primeiras tentativas de obtenção das curvas-padrão foram realizadas nas faixas de concentração de carbono entre 0,05 e 2,0 mg mL^{-1} . No entanto, essa faixa, mesmo na maior concentração de dicromato (31,14 mmol amostra^{-1}), mostrou-se saturada em carbono a partir do ponto acima da concentração de 0,8 mg mL^{-1} (Fig. 1), que seria um exagero, pois até 0,6 mg mL^{-1} de detecção é possível alcançar valores de C-BMS três vezes superiores àqueles encontrados nos solos mais ricos em biomassa microbiana, de acordo com os valores encontrados em Moreira e Siqueira (2006).

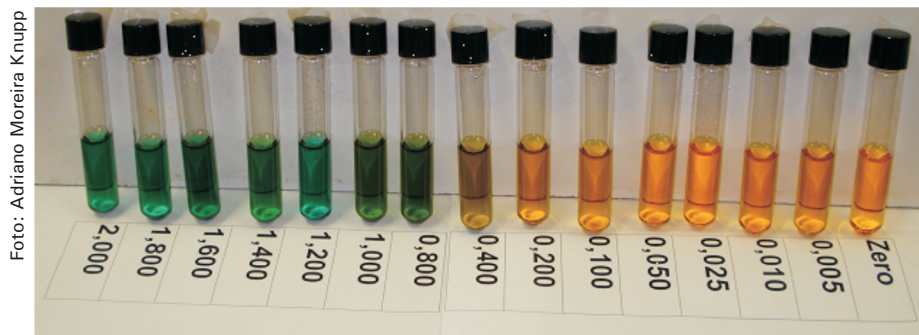


Fig. 1. Tubos contendo soluções digeridas de biftalato de potássio, utilizados como uma das triplicatas na tentativa de construção das curvas-padrão. As amostras foram digeridas com a concentração de 31,14 mmol de dicromato de potássio amostra^{-1} . Os valores expressos correspondem à concentração de carbono em mg mL^{-1} .

Os resultados obtidos nas diferentes concentrações permitiram o estabelecimento da concentração adequada de dicromato para detectar valores de carbono até um nível bastante seguro ao que se tem apresentado atualmente em solos brasileiros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), chegando-se à formulação de uma solução digestora composta por $4,8 \text{ g L}^{-1}$ de dicromato de potássio, diluído em uma solução 3:1 de ácido sulfúrico e água destilada. Isto representa uma redução de 42,42% na concentração de cromo em relação à solução usada para titrimetria. Para construção das curvas-padrão utilizou-se 2 mL da solução de biftalato e 4 mL da solução sulfocrômica digestora e a faixa de concentração de carbono adotada foi entre 0,25 e $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ (Fig. 2).

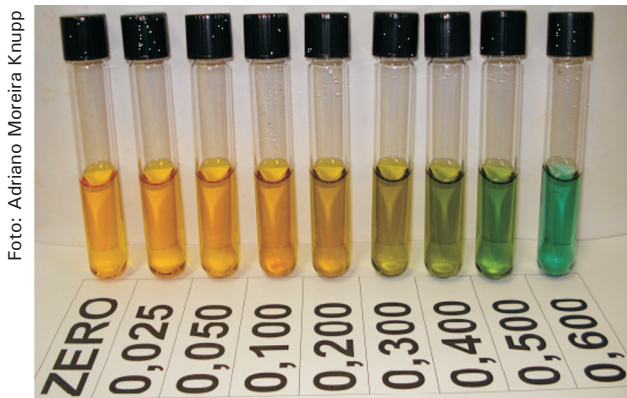


Fig. 2. Tubos contendo soluções digeridas de biftalato de potássio, utilizados como uma das triplicatas para construção das curvas padrão. Os valores expressos correspondem à concentração de carbono em mg mL^{-1} .

Na Tabela 1 estão indicados os resultados das leituras espectrofotométricas obtidas das triplicatas, nos dois comprimentos de onda estabelecidos para o desenvolvimento das curvas-padrão (Fig. 3). Na concentração de $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ de carbono, as leituras das triplicatas foram: 0,686; 0,692; 0,687; para 600 nm; e 0,506; 0,571; 0,506; para 650 nm. Neste ponto atingiu-se o limite de digestão para a concentração de dicromato proposta, o que é suficiente para uma detecção de teores de biomassa microbiana até três vezes maiores do que aqueles que vêm sendo encontrados nos solos com maiores atividades da biomassa, permitindo uma margem de segurança às análises.

Tabela 1. Resultados das leituras espectrofotométricas das soluções de biftalato de potássio, em triplicatas, das quais se obteve as curvas-padrão.

| Carbono (mg mL ⁻¹) | Triplicatas 600 nm | | | Triplicatas 650 nm | | |
|--------------------------------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|
| 0,025 | 0,038 | 0,029 | 0,037 | 0,029 | 0,021 | 0,026 |
| 0,050 | 0,060 | 0,064 | 0,065 | 0,044 | 0,047 | 0,048 |
| 0,100 | 0,129 | 0,112 | 0,135 | 0,091 | 0,083 | 0,095 |
| 0,200 | 0,201 | 0,202 | 0,206 | 0,149 | 0,151 | 0,154 |
| 0,300 | 0,350 | 0,351 | 0,339 | 0,260 | 0,262 | 0,253 |
| 0,400 | 0,454 | 0,457 | 0,463 | 0,343 | 0,345 | 0,346 |
| 0,500 | 0,574 | 0,576 | 0,577 | 0,425 | 0,429 | 0,431 |
| 0,600 | 0,678 | 0,684 | 0,673 | 0,504 | 0,510 | 0,498 |

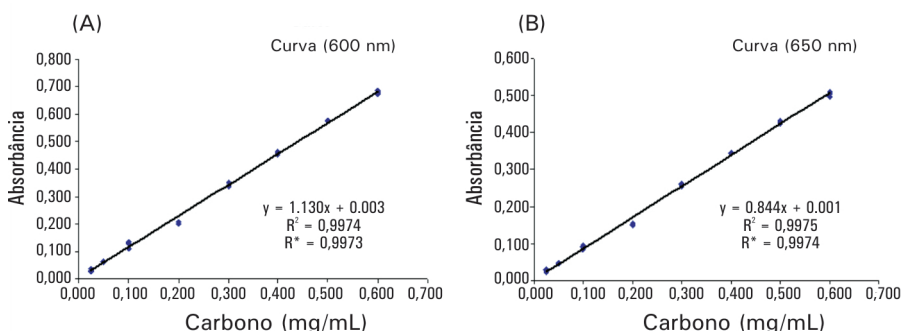


Fig. 3. Curvas-padrão construídas com biftalato de potássio. Leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 600 (A) e 650 nm (B).

No teste realizado para a recuperação do carbono a partir de concentrações conhecidas das soluções de biftalato (as mesmas das curvas-padrão), após as amostras terem sido submetidas à digestão pelo processo convencional e titulação com sulfato ferroso amoniacal, os resultados obtidos (Tabela 2) demonstraram que houve recuperação adequada, porém somente até a concentração de 0,2 mg mL⁻¹ de carbono. Acima desta concentração não foi possível realizar titulação em função das altas concentrações de carbono.

Tabela 2. Resultados obtidos pela titulação dos padrões de biftalato, após digestão, pelo processo convencional.

| Carbono (mg mL ⁻¹) | Volumes de sulfato ferroso amoniacal (mL) | | | mg C Kg ⁻¹ de solo seco | mg C mL ⁻¹ |
|--------------------------------|---|-------|-------|------------------------------------|-----------------------|
| Branco | 22,26 | 22,48 | 22,44 | 0,00 | 0,00 |
| 0,025 | 20,58 | 20,60 | 20,13 | 69,69 | 0,023 |
| 0,050 | 17,80 | 17,83 | 17,89 | 162,18 | 0,054 |
| 0,100 | 14,12 | 14,07 | 14,19 | 294,22 | 0,098 |
| 0,200 | 4,03 | 3,94 | 4,01 | 655,37 | 0,218 |

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do teste de médias obtidos para cada solo, em cada profundidade, nos diferentes métodos utilizados nesse trabalho, titrimetria e espectrofotometria (comprimentos de onda de 600 e 650 nm).

Tabela 3. Comparação entre os métodos utilizados para quantificar o C-BMS em duas profundidades, para cada solo analisado.

| Solo | Método | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ solo) | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ solo) | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) |
|----------------------------|-------------------|---|---|------------------------------------|
| NQ (Nova Xavantina) | | | | |
| 0-10 cm | Titrimetria | 288,72 a | 83,22 a | 622,72 a |
| | Espectr.(600 nm) | 287,57 a | 76,78 a | 638,75 a |
| | Espectr.(650 nm) | 278,19 b | 78,46 a | 605,27 a |
| 10-20 cm | Titrimetria | 286,73 a | 123,90 a | 493,43 a |
| | Espectr.(600 nm) | 290,91 a | 112,68 b | 540,11 a |
| | Espectr.(650 nm) | 280,04 a | 110,32 b | 514,29 a |
| LV (EEA) | | | | |
| 0-10 cm | Titrimetria | 302,17 b | 104,76 a | 598,22 b |
| | Espectr.(600 nm) | 341,48 a | 104,24 a | 724,60 a |
| | Espectr.(650 nm) | 338,53 a | 99,38 a | 724,70 a |
| 10-20 cm | Titrimetria | 282,04 b | 101,00 a | 548,60 b |
| | Espectr.(600 nm) | 314,20 a | 104,95 a | 628,38 a |
| | Espectr.(650 nm) | 308,42 a | 100,92 a | 628,80 a |
| LV (Mata) | | | | |
| 0-10 cm | Titrimetria | 567,46 a | 177,26 a | 1.182,43 a |
| | Espectr. (600 nm) | 529,20 b | 192,26 a | 1.020,63 b |
| | Espectr. (650 nm) | 524,48 b | 186,04 a | 1.025,56 b |
| 10-20 cm | Titrimetria | 590,12 a | 225,49 b | 1.104,95 a |
| | Espectr.(600 nm) | 539,81 b | 257,12 a | 857,06 b |
| | Espectr.(650 nm) | 536,40 b | 250,11 a | 867,57 b |
| 0 – 10 cm | CV (%) | 2,62 | 11,38 | 6,48 |
| 10 – 20 cm | CV (%) | 2,81 | 6,56 | 6,33 |

NQ - Neossolo Quartzarênico; LV = Latossolo Vermelho; CV = Coeficiente de Variação.

C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).

Médias seguidas de mesma letra na coluna, em cada profundidade, não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Comparando-se os valores médios de C-BMS encontrados para o Neossolo Quartzarênico (NQ) de Nova Xavantina, MT, não houve diferença significativa entre a titrimetria e a espectrofotometria, demonstrando que, nas mesmas condições de temperatura e tempo de digestão, foi possível recuperar valores de C-BMS estatisticamente iguais. Entretanto, quando se verifica as médias obtidas para as amostras fumigadas e não fumigadas, pode-se destacar uma maior uniformidade entre aquelas obtidas na primeira profundidade analisada (0-10 cm), detectando-se diferença significativa entre os valores apenas na espectrofotometria a 650 nm para as amostras fumigadas. Na segunda profundidade (10-20 m), os métodos espectrofotométricos apresentaram valores médios menores em relação à titrimetria para as amostras não fumigadas, porém, ressalta-se que os valores obtidos para C-BMS não diferiram estatisticamente.

No Latossolo Vermelho (LV) oriundo da EEA da Embrapa Arroz e Feijão, nas duas profundidades avaliadas, houve diferença significativa entre os valores obtidos para o C-BMS por titrimetria e espectrofotometria. Nesse caso, a espectrofotometria apresentou os maiores valores médios em relação à titulação. Os valores obtidos por espectrofotometria não apresentaram diferença significativa entre os dois comprimentos de onda. Não houve diferença significativa entre as médias obtidas para as amostras não fumigadas, entretanto, as das amostras fumigadas apresentaram diferença entre a titulação e espectrofotometria, resultando em diferença significativa entre os métodos na quantificação do C-BMS.

Os valores de C-BMS obtidos por titrimetria, no Latossolo Vermelho proveniente da área de mata, apresentaram-se significativamente maiores em relação àqueles obtidos por espectrofotometria, nas duas profundidades. Novamente os valores obtidos por espectrofotometria não apresentaram diferença significativa entre os comprimentos de onda. Assim como no Latossolo da EEA, as diferenças encontradas entre os resultados do carbono da biomassa refletiam aquelas obtidas pelas amostras fumigadas.

De maneira geral, os valores médios obtidos das amostras não fumigadas apresentaram valores que não diferiram significativamente entre os três procedimentos, salvo na profundidade de 10-20 cm para o NQ (Nova Xavantina) e o LV (Mata). Entretanto, para as amostras fumigadas, houve diferença entre o processo titrimétrico e os espectrofotométricos, que por sua vez, não variaram entre si. Isso indica que para os Latossolos analisados houve diferença entre as metodologias, porém, essas diferenças não foram no mesmo sentido, para o solo da EEA houve quantificação maior pelo método espectrofotométrico e o contrário acontecendo para Mata. Entre esses solos, fica mais pronunciada a diferenciação entre as metodologias, influenciada pelos valores obtidos das subamostras fumigadas. Feigl et al. (1995) já haviam relatado que as características físicas de Latossolos com altos teores de argila interferem na homogeneidade da fumigação e, em trabalhos futuros, numa maior amostragem de solos diversificados, esses fatores deverão ser considerados, assim como a possível influência do clorofórmio utilizado na fumigação sobre as características químicas do extrato obtido para análise.

Para verificar se as diferenças observadas tiveram influência das repetições, foram comparados os valores obtidos para a média das triplicatas de cada repetição nos diferentes solos em estudo.

Nas amostras oriundas do NQ de Nova Xavantina, nos primeiros 10 cm, os três métodos apresentaram uniformidade entre as triplicatas das subamostras fumigadas. No entanto, as não fumigadas apresentaram, em cada método, pelo menos uma das repetições significativamente diferente das outras (Tabela 4). Entre os 10 e 20 cm do solo, para todos os métodos, nenhuma repetição diferiu significativamente das outras. A boa reprodutibilidade nas três metodologias, para esse solo, fornece indícios da boa aplicabilidade dos métodos espectrofotométricos que apresentaram os mesmos padrões nas triplicatas.

Tabela 4. Comparação entre os valores médios das triplicatas de cada repetição nas duas profundidades analisadas (Neossolo Quartzarênico, Nova Xavantina, MT).

| Método | Repet. | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ solo) | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ solo) | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) | |
|-------------------|------------|--|--|---------------------------------------|----------|
| Titrimetria | 0 - 10 cm | 1 | 292,33 a | 92,61 a | 605,23 a |
| | | 2 | 285,90 a | 75,55 b | 637,42 a |
| | | 3 | 287,93 a | 81,50 b | 625,52 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 288,73 a | 119,34 a | 513,31 a |
| | | 2 | 287,72 a | 128,68 a | 481,92 a |
| | | 3 | 283,74 a | 123,67 a | 485,04 a |
| Espectr. (600 nm) | 0 - 10 cm | 1 | 288,38 a | 68,71 b | 665,68 a |
| | | 2 | 281,29 a | 70,21 b | 639,64 a |
| | | 3 | 293,03 a | 91,43 a | 610,92 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 287,78 a | 115,62 a | 521,69 a |
| | | 2 | 292,54 a | 112,44 a | 545,76 a |
| | | 3 | 292,43 a | 109,98 a | 552,87 a |
| Espectr. (650 nm) | 0 - 10 cm | 1 | 277,54 a | 70,98 b | 625,93 a |
| | | 2 | 271,10 a | 74,34 b | 596,23 a |
| | | 3 | 285,94 a | 90,04 a | 593,64 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 279,26 a | 115,55 a | 496,08 a |
| | | 2 | 276,21 a | 105,88 a | 516,16 a |
| | | 3 | 284,65 a | 109,54 a | 530,63 a |
| 0 - 10 cm | CV (%) | 2,97 | 9,88 | 3,96 | |
| 10 - 20 cm | CV (%) | 5,83 | 6,44 | 10,60 | |

CV = Coeficiente de Variação; C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).
Valores seguidos de mesma letra na coluna, para cada profundidade, não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott (p < 0,05).

As amostragens feitas nos Latossolos Vermelhos (LVs) da EEA (Tabela 5) e da área de Mata (Tabela 6) apresentaram uniformidade entre as triplicatas das repetições para as amostras fumigadas. Nos dois solos as médias entre as repetições foram estatisticamente iguais, entretanto, para as amostras não fumigadas, tanto o LV da EEA quanto o da Mata apresentaram diferença entre as médias das triplicatas. Para o LV da EEA as amostras não fumigadas apresentaram diferenças entre as repetições nas duas profundidades para o método titrimétrico e na profundidade 10-20 cm no método espectrofotométrico, nos dois comprimentos de onda (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre os valores médios das triplicatas de cada repetição nas duas profundidades analisadas (Latossolo Vermelho, EEA da Embrapa Arroz e Feijão).

| Método | Repet. | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) | |
|-------------------|------------|--|--|------------------------------------|----------|
| Titrimetria | 0 - 10 cm | 1 | 313,43 a | 113,72 a | 605,17 a |
| | | 2 | 295,88 a | 95,65 b | 606,76 a |
| | | 3 | 297,21 a | 104,90 a | 582,73 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 275,99 a | 91,61 b | 558,72 a |
| | | 2 | 287,26 a | 104,30 a | 554,45 a |
| | | 3 | 282,86 a | 107,09 a | 532,64 a |
| Espectr. (600 nm) | 0 - 10 cm | 1 | 342,01 a | 101,19 a | 729,77 a |
| | | 2 | 344,13 a | 104,14 a | 710,51 a |
| | | 3 | 338,29 a | 107,39 a | 733,52 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 316,97 a | 93,78 b | 666,03 b |
| | | 2 | 312,50 a | 99,58 b | 638,38 b |
| | | 3 | 313,12 a | 121,49 a | 580,72 a |
| Espectr. (650 nm) | 0 - 10 cm | 1 | 337,20 a | 93,42 a | 738,72 a |
| | | 2 | 333,36 a | 101,67 a | 702,10 a |
| | | 3 | 345,02 a | 103,04 a | 733,30 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 309,29 a | 92,00 b | 658,45 a |
| | | 2 | 306,33 a | 95,12 b | 640,03 a |
| | | 3 | 309,65 a | 115,64 a | 587,91 b |
| 0 - 10 cm | CV (%) | 2,89 | 5,83 | 3,99 | |
| 10 - 20 cm | CV (%) | 2,67 | 5,04 | 4,93 | |

CV = Coeficiente de Variação; C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).

Valores seguidos de mesma letra na coluna, para cada profundidade, não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

No LV da Mata houve diferença entre as repetições das amostras não fumigadas na profundidade 0-10 cm pelo método titrimétrico e nas duas profundidades para o método espectrofotométrico no comprimento de onda 600 nm. Para o comprimento de onda 650 nm não houve diferença entre as repetições não fumigadas (Tabela 6). A diferença observada entre repetições não fumigadas, nos dois solos, teve influência nos resultados obtidos para o C-BMS. Entretanto, quando se obtém as médias finais, essa variação entre as médias das amostras de triplicatas perde seu efeito, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 6. Comparação entre os valores médios das triplicatas de cada repetição nas duas profundidades analisadas (Latossolo Vermelho, Mata, Santo Antônio de Goiás).

| Método | Repet. | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) |
|-------------------|------------|--|----------|--|------|------------------------------------|
| Titrimetria | 0 - 10 cm | 1 | 560,40 a | 197,81 a | | 1.098,75 b |
| | | 2 | 569,44 a | 165,00 b | | 1.225,57 a |
| | | 3 | 572,54 a | 168,96 b | | 1.222,96 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 584,93 a | 217,95 a | | 1.112,06 a |
| | | 2 | 590,53 a | 232,66 a | | 1.084,44 a |
| | | 3 | 594,91 a | 225,87 a | | 1.118,33 a |
| Espectr. (600 nm) | 0 - 10 cm | 1 | 537,40 a | 213,18 a | | 1.085,65 a |
| | | 2 | 522,51 a | 179,13 b | | 1.038,89 a |
| | | 3 | 527,71 a | 184,47 b | | 937,35 b |
| | 10 - 20 cm | 1 | 538,94 a | 266,83 a | | 824,57 a |
| | | 2 | 544,08 a | 248,81 b | | 894,77 a |
| | | 3 | 536,40 a | 255,71 b | | 851,83 a |
| Espectr. (650 nm) | 0 - 10 cm | 1 | 531,91 a | 201,05 a | | 1.081,98 a |
| | | 2 | 517,73 a | 174,86 a | | 1.035,04 a |
| | | 3 | 523,79 a | 182,22 a | | 959,65 a |
| | 10 - 20 cm | 1 | 536,72 a | 255,57 a | | 852,01 a |
| | | 2 | 539,90 a | 243,72 a | | 897,52 a |
| | | 3 | 532,58 a | 251,02 a | | 853,19 a |
| 0 - 10 cm | CV (%) | 1,62 | 8,46 | | 5,65 | |
| 10 - 20 cm | CV (%) | 1,80 | 3,23 | | 3,52 | |

CV = Coeficiente de Variação; C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).
 Valores seguidos de mesma letra na coluna, para cada profundidade, não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott (p < 0,05).

À medida que aumenta a profundidade dos solos, há redução quantitativa em diversos grupos de micro-organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em função disso, as análises realizadas no laboratório têm buscado verificar diferenças entre profundidades na quantificação do C-BMS. As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam os resultados obtidos para cada solo avaliado comparando-se os valores obtidos nos dois níveis de profundidade (0-10 e 10-20 cm).

Na comparação entre os resultados obtidos para as duas profundidades no Neossolo Quartzarênico (Tabela 7), as três formas de avaliação foram capazes de detectar diferença significativa nos valores de C-BMS, com os valores maiores sendo verificados na camada mais superficial. Entretanto, nos dois Latossolos Vermelhos analisados, da EEA (Tabela 8) e de Mata (Tabela 9), as diferenças

entre as profundidades foram observadas apenas nos processos espectrofotométricos, nos dois comprimentos de onda.

Os resultados observados para o C-BMS do Neossolo Quartzarênico (Tabela 7) foram influenciados mais pelas diferenças entre as amostras não fumigadas, assim como os do Latossolo Vermelho da região de mata (Tabela 9). Para o LV da EEA, entretanto, os valores foram influenciados pelas diferenças entre as amostras fumigadas.

Tabela 7. Comparação entre as médias das duas profundidades, para cada um dos diferentes métodos empregados nas análises (Neossolo Quartzarênico, Nova Xavantina, MT).

| Método | Profundidade | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ solo) | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ solo) | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) |
|-------------------|--------------|--|--|---------------------------------------|
| Titulação | 0 - 10 cm | 288,72 a | 83,22 b | 622,72 a |
| | 10 - 20 cm | 286,73 a | 123,90 a | 493,43 b |
| Espectr. (600 nm) | 0 - 10 cm | 287,57 a | 76,78 b | 638,75 a |
| | 10 - 20 cm | 290,91 a | 112,68 a | 540,11 b |
| Espectr. (650 nm) | 0 - 10 cm | 278,19 a | 78,46 b | 605,27 a |
| | 10 - 20 cm | 280,04 a | 110,32 a | 514,29 b |
| CV (%) | | 4,18 | 22,47 | 12,41 |

Médias seguidas de mesma letra em profundidades diferentes não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

CV = Coeficiente de Variação; C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).

Tabela 8. Comparação entre as médias das duas profundidades, para cada um dos diferentes métodos empregados nas análises (Latosolo Vermelho, EEA da Embrapa Arroz e Feijão).

| Método | Profundidade | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) |
|-------------------|--------------|---|---|---------------------------------------|
| Titrimetria | 0 - 10 cm | 302,17 a | 104,76 a | 598,22 a |
| | 10 - 20 cm | 282,04 b | 101,00 a | 548,60 a |
| Espectr. (600 nm) | 0 - 10 cm | 341,48 a | 104,24 a | 724,60 a |
| | 10 - 20 cm | 314,20 b | 104,95 a | 628,38 b |
| Espectr. (650 nm) | 0 - 10 cm | 338,53 a | 99,38 a | 724,70 a |
| | 10 - 20 cm | 308,42 a | 100,92 a | 628,80 b |
| CV (%) | | 5,38 | 8,65 | 8,43 |

Médias seguidas de mesma letra em profundidades diferentes não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

CV = Coeficiente de Variação; C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).

Tabela 9. Comparação entre as médias das duas profundidades, para cada um dos diferentes métodos empregados nas análises (Latossolo Vermelho, Mata, Santo Antônio de Goiás).

| Método | Profundidade | Amostra Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | Amostra Não Fumigada (mg C Kg ⁻¹ Solo seco) | C-BMS (mg C kg ⁻¹ solo) |
|-------------------|--------------|--|--|------------------------------------|
| Titrimetria | 0 - 10 cm | 567,46 b | 177,26 b | 1.182,43 a |
| | 10 - 20 cm | 590,12 a | 225,49 a | 1.104,95 a |
| Espectr. (600 nm) | 0 - 10 cm | 529,20 a | 192,26 b | 1.020,63 a |
| | 10 - 20 cm | 539,81 a | 257,12 a | 857,06 b |
| Espectr. (650 nm) | 0 - 10 cm | 524,47 a | 186,04 b | 1.025,56 a |
| | 10 - 20 cm | 536,40 a | 250,10 a | 867,57 b |
| CV (%) | | 2,30 | 16,75 | 9,56 |

Médias seguidas de mesma letra em profundidades diferentes não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

CV = Coeficiente de Variação; C-BMS = (Fumigada - Não Fumigada / 0,33).

Os resultados apresentados fornecem indícios de que a espectrofotometria pode ser uma ferramenta eficiente para avaliar o C-BMS, com potencial para substituição da titrimetria num prazo médio. Assim, com a nova formulação, a solução final, sulfocrômica digestora mais o extrato da subamostra, passaria a possuir um volume de 6 mL, contra os 25 mL do processo titrimétrico. Isso significa uma redução de até dez vezes o volume final do resíduo gerado, já que para a titulação de dez amostras, ou seja, 60 subamostras (média de um dia de trabalho), numa estimativa modesta de gastar-se 15 mL de sulfato ferroso amoniacal para cada uma, pode haver uma produção de resíduo final com cromo, ácido sulfúrio, ácido fosfórico, sulfato ferroso e água destilada de cerca de 3900 mL, ou 65 mL por subamostra. Para a mesma quantidade de subamostras na nova formulação, há uma produção de resíduo final de cerca de 360 mL, ou 6 mL por subamostra.

Além da redução do volume final do resíduo gerado, foi reduzida a concentração de dicromato presente na solução inicial. Em uma subamostra, a solução de dicromato convencional utilizada para digestão possui uma concentração de 39,23 mg de dicromato por subamostra. Na nova formulação, essa concentração é reduzida

para 19,2 mg por subamostra (uma redução de 42,42%). A leitura espectrofotométrica, diretamente nos tubos utilizados no processo de digestão, permite uma redução no tempo da quantificação do C-BMs em 20%, além de eliminar o uso de sulfato ferroso amoniacal nessa análise, gerando economia de resíduos e recursos.

A preparação prévia da solução digestora em volumes significativos (4 ou 5 litros) pode tornar o processo de quantificação de carbono mais ágil, uma vez que não haveria necessidade de construção de curvas padrão a cada análise, necessitando de uma nova curva apenas quando a solução necessitar ser reposta. Os trabalhos de quantificação de C-BMS que têm sido realizados no laboratório de Biologia do Solo (projetos, teses e dissertações) analisam cada um, em média 100 amostras, com seis subamostras cada, totalizando 600 subamostras que são analisadas num tempo médio de quatro meses. Assim, 600 subamostras gastariam 2,4 L de solução sulfocrômica digestora, que poderia ser preparada previamente, desde que fosse armazenada em frascos de vidro âmbar, tendo em vista que o cromo hexavalente pode ser reduzido sob influência da luz (WANG et al., 2009). A partir dessa solução se construiria uma curva única, pois toda análise seria feita com a mesma solução, reduzindo-se variações decorrentes de novos preparos de soluções. Isto, aliado à eliminação da titulação, reduziria o tempo médio de quatro meses em pelo menos 25 dias.

Conclusões

O uso da espectrofotometria pode, em médio prazo, substituir a titrimetria como forma de quantificar o carbono da biomassa microbiana;

A adoção da espectrofotometria em detrimento da titrimetria reduz em até dez vezes o volume de resíduos produzidos na análise;

A nova solução sulfocrômica digestora, proposta para espectrofotometria, reduz a concentração molar de dicromato em 42,42%;

Nos Latossolos analisados houve diferença entre as metodologias.

Referências

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D 1252-95**: Standard test methods for chemical oxygen demand (dichromate oxygen demand) of water. Philadelphia, 1995.

COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. **Nosso futuro comum**. 2. ed. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1991. 430 p.

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

DUDA, G. P.; MONTEIRO, M. T.; SALVIANO, A. M.; GUERRA, J. G. M. Comparação entre métodos colorimétrico e titrimétrico para determinação de carbono microbiano. **Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 1, p. 52-57, jan./mar. 2005.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; SZYMANSKI, N.; PALÁCIO, S. M.; MÓDENES, A. N.; RIZZUTTO, M. A.; SILVA JUNIOR, R. G.; OLIVEIRA, A. P.; ORO, A. C. P.; MARTIN, N. Inhibition effect on the *Allium cepa* L. root growth when using hexavalent chromium-doped river waters. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 82, n. 6, p. 767-771, Jun. 2009.

FEIGL, B. J.; SPARLING, G. P.; ROSS, D. J.; CERRI, C. C. Soil microbial in Amazonian soils: evaluation of methods and estimatives of pool sizes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 1467-1472, Nov. 1995.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GRANER, C. A. F.; ZUCCARI, M. L.; PINHO, S. Z. de. Determinação da demanda química de oxigênio em águas por espectrofotometria simultânea dos íons crômio (III) e dicromato. **Eclética Química**, São Paulo, v. 23, p. 31-44, 1998.

KOTÁS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, Oxon, v. 107, n. 3, p. 263-283, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

O`BRIEN, T. J.; WITCHER, P.; BROOKS, B.; PATIERNO, S. R. DNA polymerase zeta is essential for hexavalent chromium-induced mutagenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 663, n. 1/2, p. 77-83, Apr. 2009.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

STOUT, M. D.; HERBERT, R. A.; KISSLING, G. E.; COLLINS, B. J.; TRAVLOS, G. S.; WITT, K. L.; MELNICK, R. L.; ABDO, K. M.; MALARKEY, D. E.; HOOTH, M. J. Hexavalent chromium is carcinogenic to F344/N rats and B6C3F1 mice after of chronic of oral exposure. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v. 117, n. 5, p. 716-722, May 2009.

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, n. 3, 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, n. 6, p. 703-707, 1987.

WANG, S. L.; CHEN, C. C.; TZOU, Y. M.; HSU, C. L.; CHEN, J. H.; LIN, C. F. A mechanism study of light-induced Cr (VI) reduction in an acidic solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 164, n. 1, p. 223-228, May 2009.