

## 067 - Método alternativo para quantificação do carbono da biomassa microbiana do solo

### *Alternative method for quantification of soil microbial biomass carbon*

SILVA, Alessandra Oliveira. UFGD/Embrapa Agropecuária Oeste, silva.alessandra\_@hotmail.com; SILVA, William Marra. Embrapa Agropecuária Oeste, willian@cpao.embrapa.br; MERCANTE, Fábio Martins. Embrapa Agropecuária Oeste, mercante@cpao.embrapa.br.

### Resumo

O método da fumigação-extração, por titulometria, tem sido amplamente utilizado no Brasil para determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS), parâmetro empregado como bioindicador de qualidade do solo. Contudo, esta metodologia envolve a manipulação de ácidos e de substâncias carcinogênicas, como o dicromato de potássio. Visando reduzir os passivos ambientais decorrentes do uso desse método, o presente trabalho teve como objetivo buscar uma alternativa para quantificação dos teores de C-BMS, estabelecendo uma comparação entre os métodos de espectrofotometria e titulometria. Foram utilizadas amostras de solo de dois sistemas de manejo comparativos, coletadas em área de ensaio experimental de longa duração, estabelecido na Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados-MS, num Latossolo Vermelho Distroférrico típico, de textura muito argilosa. As amostras foram retiradas em dois sistemas de manejo, sob preparo convencional e plantio direto, na profundidade de 0 – 0,10 m. Os valores de C-BMS, obtidos por espectrofotometria, foram superiores aos obtidos por titulometria, independentemente do manejo avaliado. Contudo, verificou-se uma correlação linear positiva e significativa entre os métodos ( $r^2 = 0,9476$ ). Assim, 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 C-BMS e, conseqüentemente, a geração de resíduos tóxicos.

**Palavras-chave:** qualidade ambiental, dicromato de potássio, extração de carbono.

### Abstract

*The fumigation-extraction method, by titration, has been widely used in Brazil to determine the carbon of the microbial biomass in soil, a parameter used as bioindicator of soil quality. However, this methodology involves the manipulation of acids and carcinogenic substances, such as potassium dichromate. In order to reduce potential environmental contamination arising from the use of this method, this study aimed to test an alternative to quantify the levels of microbial biomass carbon, establishing a comparison between the methods of spectrophotometry and titrimetry. Samples of Hapludox loamy soil, from two tillage systems, collected in the long-term integration crop-livestock experiment at Embrapa Western Region Agriculture, in Dourados-MS, were compared. The samples were collected in two management systems under conventional tillage and no-tillage in the depth of 0 – 0.10 m each one. The values of microbial biomass carbon obtained by spectrophotometry were higher than those obtained by titration, independently of the management evaluated. However, there was a significant positive linear correlation between the methods ( $r^2 = 0.9476$ ). The method of spectrophotometry is presented as an alternative to the titration method, allowing to eliminate the use of potassium dichromate in analytical procedures for quantification of soil microbial biomass and hence the generation of toxic waste.*

**Keywords:** environmental quality, potassium dichromate, carbon extraction.

## Introdução

A biomassa microbiana do solo (BMS) é fundamental na manutenção e produtividade dos agroecossistemas, que dependem em grande parte, de processos mediados pelos microrganismos. A biomassa microbiana representa o compartimento central do ciclo de carbono no solo e, de acordo com as condições edafoclimáticas do ecossistema e da composição dos resíduos vegetais existentes sobre a superfície do solo, pode funcionar como compartimento de reserva, dreno ou como um catalisador na decomposição da matéria orgânica (PAUL; CLARK, 1989). Neste sentido, a avaliação da BMS tem sido proposta como um indicador do estado e das alterações da matéria orgânica do solo e sugerida como uma medida sensível ao aumento ou decréscimo de sua quantidade (TÓTOLA; CHAER, 2002). Os indicadores biológicos de qualidade do solo, como a BMS, são utilizados como parâmetros importantes para o manejo adequado do solo em estudos de sustentabilidade (MENDES et al., 2011). Contudo, deve-se salientar que determinados métodos analíticos empregados na sua quantificação, como os teores de C-BMS, apesar de eficientes, geram compostos tóxicos, que não podem ser descartados diretamente no ambiente, além de evitar o manuseio pelo analista.

O método da fumigação-extração, descrito por Vance et al. (1987), tem sido amplamente utilizado no Brasil para determinação do C-BMS. Porém, a quantificação do carbono envolve a manipulação de ácidos e substâncias carcinogênicas, como o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Segundo Kotás e Stasicka (2000), o cromo trivalente, um dos produtos da digestão do dicromato na quantificação de carbono, em grande concentração, pode causar problemas celulares, devido à sua alta capacidade de interação com diversos compostos orgânicos, tais como importantes enzimas funcionais, inibindo-os.

Neste contexto, as metodologias para se estimar o C-BMS tem sido objeto de ajustes e críticas, no sentido de se buscar alternativas para reduzir a geração de resíduos no processo analítico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma comparação entre os métodos de espectrofotometria e titulometria para quantificação dos teores de C-BMS, visando eliminar a geração de resíduos tóxicos, decorrentes de substâncias carcinogênicas.

## Metodologia

Foram utilizadas amostras de solo de dois sistemas de manejo comparativos, em área de ensaio experimental de longa duração, em cultivos adjacentes, sendo: (i) sistema convencional (SC), com o cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no verão e de aveia (*Avena strigosa* Schreb), no outono/inverno. Nesse tipo de manejo, o solo foi preparado com grades de disco até 0,20 m de profundidade, sendo utilizado herbicida residual em pré-emergência, numa área de 2,0 ha; e (ii) sistema plantio direto (PD), com soja e milho no verão, rotacionado com trigo, aveia e nabo-forrageiro no inverno e milheto na primavera. Para comparação com a condição original do solo, foi incluído um fragmento de mata nativa (Floresta Semidecidual), numa área próxima aos sistemas de produção agrícola. As parcelas experimentais com os manejos encontravam-se dispostas em faixas, no Campo Experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS (22°16' S e 54°49' W), num Latossolo Vermelho Distroférrico típico, de textura muito argilosa. A amostragem do solo foi realizada em julho de 2012, na profundidade de 0 a 10 cm, sendo coletadas cinco amostras compostas em cada sistema.

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 os métodos. Inicialmente, as amostras de solo foram peneiradas (< 2mm) e subdivididas em triplicatas, sendo três fumigadas e três não fumigadas. O carbono foi extraído com 50 mL de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) 0,5 M, 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 M, 5 mL de ácido fosfórico concentrado e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo aquecidos em chapa aquecedora (300°C), por 5 minutos, e resfriada, acrescentando 80 mL de água destilada. A titulação foi realizada com sulfato ferroso amoniacal [ $(NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O)$ ] 0,033M 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 ( $Na_2P_2O_7$ )) 0,1M, 46 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0,5 M, 20 mL de permanganato de potássio ( $KMnO_4$ ) 0,1 M, 80 mL de sulfato de manganês mono-hidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) 0,1 M e 2,5 mL de ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  concentrado. As subamostras foram agitadas e mantidas em repouso por 2 horas e, em seguida, foram submetidas à leitura num espectrofotômetro, em comprimento de onda de 495 nm.

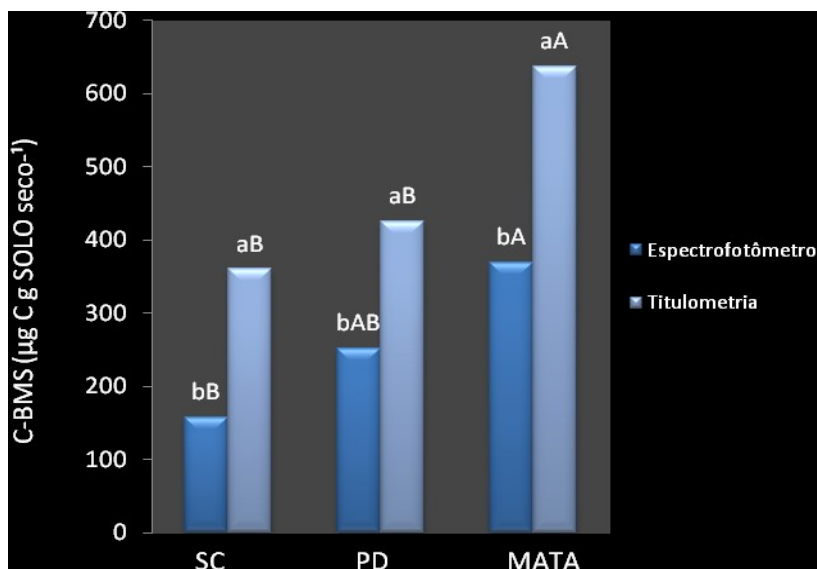
Os resultados foram submetidos à análise de variância e as comparações de médias foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Além disso, procedeu-se à análise de regressão na comparação entre os métodos.

## Resultados e Discussão

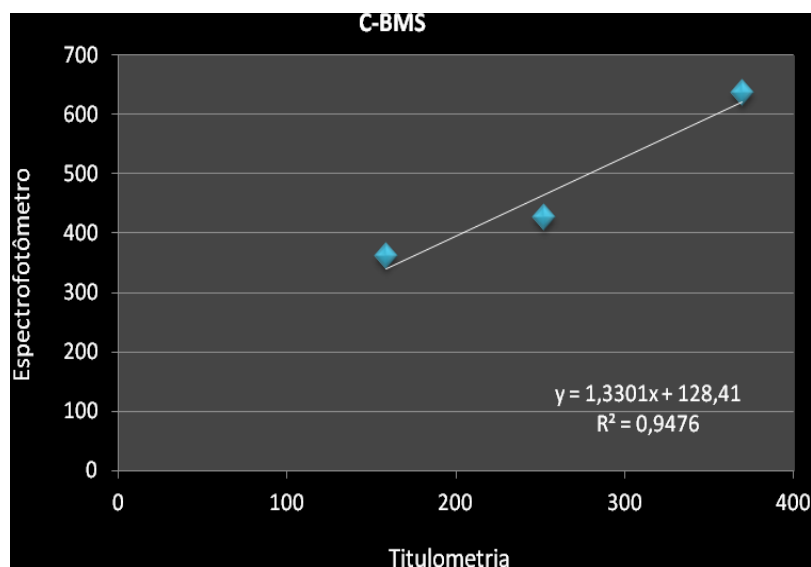
Os resultados de carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS), obtidos por espectrofotometria, foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos obtidos por titulometria, independentemente do manejo avaliado (Figura 1). Contudo, verificou-se uma correlação linear positiva e significativa entre os métodos ( $r^2 = 0,9476$ ), conforme Figura 2.

O C-BMS, determinado por titulometria, proveniente da área de mata, apresentou-se superior ( $p < 0,05$ ) aos verificados nos sistemas convencional e plantio direto (Figura 1). Pelo método da espectrometria, os resultados de C-BMS no sistema sob mata nativa foi similar ao plantio direto e superior ao sistema convencional de cultivo (Figura 1). De modo geral, os valores do C-BMS variaram de 158 a 637  $\mu g$  de  $C\ g^{-1}$  solo seco. Considerando a média dos dois métodos, o sistema plantio direto apresentou valores mais elevados de C-BMS em relação ao plantio convencional.

Na comparação dos métodos da espectrofotometria com o método titulométrico para quantificação do C-BMS, Knupp e Ferreira (2011) verificaram uma redução de 42% na concentração de dicromato de potássio para a nova formulação da solução digestora e de cerca de 20% no tempo de execução da análise, além de redução no volume de resíduos tóxicos, quando se utilizou análise pelo espectrofotômetro.



**Figura 1.** Carbono da biomassa microbiana do solo, avaliada em diferentes sistemas de manejo: sistema convencional (SC), sistema plantio direto (PD) e vegetação nativa (Mata), pelos métodos de titulometria e espectrofotometria. Valores médios de cinco repetições. Letras diferentes sobre as barras, sendo maiúsculas entre os manejos do solo, para cada método, e minúsculas entre os métodos de espectrofotometria e titulometria, em cada sistema de manejo, indicam contraste pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 2.** Regressão linear entre os métodos por espectrofotometria e titulometria na análise do carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS). Valores médios de cinco repetições.

## Conclusão



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.

### Agradecimentos

Ao Vladimir Andrei Tarasiuk, assistente do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Agropecuária Oeste, pelo auxílio na realização das análises. Fábio Martins Mercante agradece ao CNPq, pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida.

### Referências

KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B. Eficiência da quantificação do carbono da biomassa microbiana por espectrofotometria comparada ao método titrimétrico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 4, p. 588-595, 2011.

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

MENDES, I. C. et al. Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: FALEIRO, A. et al. (Ed.). **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 219-244.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 272 p.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microorganismos e processos microbiológicos como indicadores de qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. H. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, p. 195-276, 2002.

VANCE, E. D. et al. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.