

Comparação de Métodos para a Determinação da Biomassa Microbiana do Solo com Diferentes Cultivos no Submédio do Vale do São Francisco



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2015

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 125

Comparação de Métodos para a Determinação da Biomassa Microbiana do Solo com Diferentes Cultivos no Submédio do Vale do São Francisco

*Carlos Alberto Tuão Gava
Paulo Ivan Fernandes Júnior*

Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2015

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.embrapa.br/semiarido>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros: Alessandra Monteiro Salviano

Diana Signor Deon

Fernanda Muniz Bez Birolo

Francislene Angelotti

Gislene Feitosa Brito Gama

José Maria Pinto

Juliana Martins Ribeiro

Mizael Félix da Silva Neto

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Rafaela Priscila Antonio

Roseli Freire de Melo

Salete Alves de Moraes

Supervisor editorial: Sidinei Anuniação Silva

Revisor de texto: Sidinei Anuniação Silva

Normalização bibliográfica: Sidinei Anuniação Silva

Foto da capa: Herbert Mouse de L. Targino

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2015): Formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação

Embrapa Semiárido

Gava, Carlos Alberto Tuão.

Comparação de métodos para a determinação da biomassa microbiana do solo com diferentes cultivos no Submédio do Vale do São Francisco / por Carlos Alberto Tuão Gava, Paulo Ivan Fernandes Júnior. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015.

22 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 125).

1. Solo. 2. Microbiologia do solo. Fumigação do solo. 3. Biomassa do solo. 4. Umidade do solo. I. Gava, Carlos Alberto Tuão. II. Fernandes Júnior, Paulo Ivan. III. Título. IV. Série.

CDD 631.46

© Embrapa 2015

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
Introdução	6
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	12
Conclusões	19
Referências	19

Comparação de Métodos para a Determinação da Biomassa Microbiana do Solo com Diferentes Cultivos no Submédio do Vale do São Francisco

Carlos Alberto Tuão Gava¹; Paulo Ivan Fernandes Júnior²

Resumo

A biomassa microbiana do solo (BMS) é a variável que mais rapidamente responde às alterações do uso do solo ou mudanças de condições ambientais. Desde os estudos iniciais, vários métodos foram desenvolvidos buscando-se aumentar a reprodutibilidade e produtividade da análise. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da correção da umidade do solo, como pré-tratamento das amostras, e a eficiência de três diferentes métodos de fumigação sobre a liberação do carbono da biomassa e a eficiência da determinação do teor de carbono microbiano do solo. As amostras de solo foram coletadas em um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico em áreas com o cultivo de culturas anuais (melão e melancia), perenes (uva e manga) e um fragmento de Caatinga localizado em área limitrofe. Os métodos avaliados foram: a correção ou não da umidade natural para 60% da capacidade de campo; a aplicação de vapor de clorofórmio; a aplicação direta de clorofórmio ou o tratamento em forno de micro-ondas. A fumigação em forno de micro-ondas resultou nos valores mais baixos de BMS e maior variabilidade interna, independentemente da correção de umidade. O método de fumigação com clorofórmio resultou em menor coeficiente de variação da média.

Termos para indexação: microbiologia do solo, biomassa do solo, umidade do solo.

¹Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Poteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Biólogo, D.Sc. em Ciências do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Comparing Methods for Soil Microbial Biomass Determination in Soils Under Different Crops in the Submedium of the São Francisco Valley

Abstract

Soil microbial biomass (SMB) is the variable that quickly responds to environmental and soil management changes. Since the initial studies a range of methods have been developed in order to increase reproducibility and productivity of soil processing. The objective of this work was to evaluate the efficiency of three methods of soil samples fumigation and water content for SMB analysis. Soil samples were collected in a dystrophic Yellow-Red Argis soil (dystrophic Ultisol) cultivated with annual (melon and watermelon) and perennial (mango and grape) crops, and a fragment of Caatinga as a reference area. The treatments evaluated were: natural water content or correction to 60% of field capacity; the application of chloroform vapor in a confined environment; direct application of chloroform to a soil samples; or heating in a microwave oven. Soil water content correction resulted in a higher extraction of soil microbial carbon (C-SMB), however the results showed a higher coefficient of variation. Values obtained for SMB analysis using soil samples fumigation in micro-wave oven were consistently smaller than chloroform based methods. Chloroform fumigation of soil will be applied on future studies of SMB fluctuation as a function of soil seasonal wetting and dry cycles in natural Semi-arid environments.

Index terms: soil microbiology, soil biomass, soil moisture.

Introdução

A biomassa microbiana do solo (BMS) é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo (MOS), formada por organismos menores que 5×10^{-3} mm (JENKINSON; LADD, 1981), que pode funcionar como um reservatório de nutrientes parcial e periodicamente liberado para o solo (DE-POLLI; PIMENTEL, 2005). A BMS é a variável que mais rapidamente responde às mudanças impostas ao solo pela alteração de uso e, por isso, tem sido utilizada como um sensível indicador para identificar a influência de práticas de manejo sobre a qualidade do solo (POWLSON et al., 1987; DRIJBER et al., 2000). Em condições naturais, a atividade e a população microbiana do solo estão em um equilíbrio dinâmico cuja variação é influenciada por fatores bióticos e abióticos. Variações quantitativas e qualitativas nas populações microbianas podem decorrer de ações antropogênicas (remoção da vegetação, preparo do solo, adubação, irrigação, etc.) e, principalmente nas condições do Semiárido, das variações sazonais da disponibilidade de água, resultando em alterações quantificáveis da biomassa microbiana ou na intensidade de diferentes processos do solo, que por sua vez podem ser utilizados como bioindicadores (BLAGODATSKAYA; KURYAKOV, 2013).

Há diversos métodos para a estimativa da BMS, que variam significativamente nos princípios de determinação. Entre estes métodos existem a observação direta por microscopia e a utilização de fatores de conversão de biovolume em biomassa (ALEXANDER, 1977; GRISI; GRAY, 1985; PELCZAR JÚNIOR et al., 1996), determinação de constituintes celulares como o ATP, ácido murâmico e ácidos nucleicos (CARDOSO, 2004; HAN et al., 2007) e a taxa de respiração basal induzida pela adição de nutrientes (ANDERSON; DOMSCH, 1978). Além disso, o teor de ergosterol e de quitina do solo tem sido utilizado para a determinação da biomassa fúngica (CARDOSO, 2004; GESSNER; CHAUVET, 1993; NIELSEN; MADSEN, 2000).

De modo geral, os métodos de determinação da BMS pela quantificação do C em extratos de solo se baseiam na premissa da liberação do C constituinte das células microbianas e na comparação com teor de C solúvel com uma amostra não tratada, ou seja, sem o emprego do método de liberação do C microbiano. Dessa forma, o tratamento adequado das amostras para a liberação do C microbiano é um passo fundamental para a acurácia do método de determinação, uma vez que

o emprego de técnicas inadequadas pode colaborar para a obtenção de valores que superestimem ou subestimem a BMS em determinada amostra de solo, implicando assim no uso equivocado deste bioindicador.

O método inicial para a determinação da BMS foi a fumigação-incubação e os estudos iniciais foram realizados em meados do século 20, quando se determinou o potencial de esterilização parcial do solo com o emprego de vapor de clorofórmio (JENKINSON; POWLSON 1976). O aumento da evolução de CO_2 e do conteúdo de NH_4^+ a partir de amostras fumigadas foi utilizado para estimar o teor de C e N da BMS (ANDERSON; INGRAM, 1993; HOWARTH; PAUL, 1994). O método de fumigação-extração utilizando vapor de clorofórmio e a comparação com a quantidade de C extraído de amostras não fumigadas foi desenvolvido por Jenkinson e Powlson (1976).

A partir do processo inicial, descrito por Jenkinson (1966), Tate et al. (1988) propuseram a extração dos constituintes microbianos por K_2SO_4 0,5 M, seguido de digestão a quente em solução contendo dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) para a oxidação do C e a quantificação do dicromato remanescente por titrimetria. Neste caso, a quantificação C ou N é realizada pela comparação com o extrato de uma amostra não tratada (fumigada). A fórmula para a transformação deste fluxo de C solúvel do solo (CS) para C microbiano (C-BMS) foi descrita por Vance et al. (1987). O novo método permitiu quantificar a BMS com vantagens como eliminar a imobilização de C e N produzido na lise microbiana pelos coloides do solo ou a desnitrificação; reduzir a influência de C e N de origem não microbiana; aumentar a produtividade do processo pela diminuição do tempo de análise (HOWARTH; PAUL, 1994).

Após estes estudos pioneiros, diversos autores propuseram modificações no método de fumigação, extração, digestão dos extratos, bem como nos métodos de cálculo buscando-se aumentar a reprodutibilidade e a produtividade da determinação da BMS (ISLAM; WEIL, 1996). Uma das metodologias alternativas propostas, preconiza a adição do clorofórmio diretamente na massa de solo a ser avaliada e posterior remoção do vapor utilizando-se vácuo (FRIGHETTO; SCHNEIDER, 2000). Outro método, descrito por Islam e Weil (1998), preconiza o tratamento de subamostras em forno de micro-ondas para o rompimento das células microbianas e posterior extração utilizando-se K_2SO_4 0,5 M. Em ambos os casos, busca-se aumentar a produtividade do processamento das amostras, tornando-o um método de análise de rotina para a identificação da qualidade do solo ou dos impactos de sistemas de manejo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da correção da umidade do solo como pré-tratamento das amostras e a eficiência de três diferentes métodos de fumigação das amostras sobre a liberação do carbono da biomassa para a solução do solo por meio de sua quantificação e avaliação da viabilidade das células microbianas remanescentes.

Material e Métodos

As coletas de amostras foram realizadas em áreas experimentais com o cultivo sucessivo de culturas irrigadas: 1) amostras coletadas na linha de plantio em área com cultivo de melancia (*Citrullus lanatus* Thumb. Mansf.) por 4 anos, com histórico anterior de cultivo de banana (*Musa* sp.) e culturas anuais por período superior a 15 anos; 2) amostras coletadas na linha de plantio em área com cultivo de videira (*Vitis vinifera* L.) por período superior a 8 anos; 3) amostras coletadas na área de projeção da copa em cultivo de manga (*Mangifera indica* L.) por 4 anos, com histórico de cultivo perene por mais de 15 anos; 4) área com cultivo de meloeiro (*Cucumis melo* L.) por 2 anos consecutivos, com histórico de cultivo de tamareira (*Phoenix dactylifera*) por 20 anos; 5) fragmento de vegetação de Caatinga.

As áreas amostradas são limítrofes e localizam-se em um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, localizado no Campo Experimental de Bebedouro, nas dependências da Embrapa Semiárido, localizada no Perímetro Irrigado de Bebedouro (Petrolina, PE).

Em cada área foram coletadas cinco amostras compostas de solo, cada uma proveniente da homogeneização de dez subamostras simples, retiradas na camada de 0-10 cm. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas e peneiradas em malha de 2,0 mm, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas, sob refrigeração, para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido.

Uma segunda subamostra foi armazenada a 10 °C por 72 horas até a realização das análises microbiológicas. Em uma terceira subamostra, determinou-se a curva de retenção de umidade do solo pelo método da centrifuga tendo como a capacidade de campo (CC) o teor de umidade retida a uma força de 0,33 Mpa (COSTA et al., 2008).

Para fins de análise do teor de C-BMS, as amostras de solo foram subdivididas em dois grupos: 1) um grupo foi processado diretamente para a análise do C-BMS, conforme descrito a seguir; 2) do segundo

grupo, 200 g das subamostras receberam um volume de água suficiente para alcançar 60% da CC e foram homogeneizadas de forma a alcançar a distribuição uniforme aparente da umidade, seguindo imediatamente para o processamento. Para cada subamostra foram retiradas sete alíquotas de 20 g de solo para cada um dos três métodos de determinação da BMS, sendo três destinadas aos diferentes métodos de fumigação (F), três não fumigadas e uma para a determinação do teor de umidade do solo. Do grupo que recebeu a correção de umidade, três alíquotas de 20 g também foram destinadas à contagem de microrganismos viáveis, conforme descrito a seguir.

A avaliação da BMS-C foi realizada utilizando-se três métodos de fumigação das amostras:

Fumigação extração – O método da fumigação-extração, proposto por Jenkinson e Powlson (1976) e descrito em De-Polli e Guerra (1999), foi executado pela adição de clorofórmio livre de etanol (FRIGHETO; SCHNEIDER, 2000) em um frasco separado em ambiente hermeticamente fechado sob baixa pressão até o borbulhamento do clorofórmio. Após 24 horas o vapor de clorofórmio foi removido utilizando-se bomba de vácuo e repouso em ambiente ventilado.

Aplicação direta de clorofórmio nas amostras – No segundo método, uma alíquota de 1,0 mL de clorofórmio livre de etanol (FRIGHETO; SCHNEIDER, 2000) foi adicionada diretamente às amostras de 20 g do solo em beakers de 50 mL e permaneceram em ambiente hermeticamente fechado por 15 minutos. O vapor de clorofórmio foi removido utilizando-se aplicação de vácuo e um período de 2 horas de em repouso em ambiente ventilado.

Irradiação em forno micro-ondas – O método de irradiação das amostras, proposto por Islam e Weil (1996), foi executado pela exposição das amostras de solo a radiação micro-ondas em um forno de micro-ondas doméstico de 650 W de potência nominal. O tempo de exposição depende da energia liberada pelo equipamento e foi calculada segundo a metodologia descrita por Islam e Weill (1999).

1) A energia aplicada pelo micro-ondas foi estimada medindo-se a elevação da temperatura de 1 L de água destilada, com temperatura inicial ajustada para 22 °C, com exposição por 2 minutos em micro-ondas doméstico com plataforma giratória (NEAS; COLLINS, 1988). A potência real foi determinada aplicando-se o resultado de alteração da temperatura à equação:

$$P = C_p K \Delta T m / t \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual P é a potência real aparente absorvida pela água; C é a capacidade térmica da água ($\text{J.mL}^{-1}.\text{°K}^{-1}$); ΔT é a variação observada na temperatura da água; $K = 4,184$ é o fator de correção térmica para W ; m , a massa de água utilizada; e t (s) o tempo de aquecimento da amostra.

2) O tempo de exposição da amostra a irradiação foi estimado pela equação:

$$T (s) = (r \times w) / P \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual r é a energia a ser aplicada pelo micro-ondas (J.g solo^{-1}), definida por Islam e Weill (1996) em 800 J.g^{-1} de solo; w é a massa total de solo (g); P é a potencia real do equipamento (W.s^{-1}), definida na equação 1.

A aplicação das equações nas condições de análise resultou na determinação de $P = 627 \text{ W (J.s}^{-1})$ e o tempo de aquecimento de 15,6 (~ 16) segundos. As amostras foram expostas à radiação micro-ondas por metade do tempo previsto (8 segundos) e, em seguida, removidas, homogeneizadas e resfriadas à temperatura ambiente e retornadas ao micro-ondas para a complementação da energia total calculada. Este procedimento foi desenvolvido por Islam e Weil (1998) com o objetivo de impedir ou a minimizar a formação de bolsões de superaquecimento e a desidratação excessiva das amostras.

O carbono do solo (C-S) foi extraído das amostras fumigadas e não fumigadas utilizando-se 100 mL de uma solução de K_2SO_4 0,5 M. Os extratos obtidos foram filtrados em papel filtro quantitativo (filragem lenta) e digeridos a 100 °C após a adição de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0667 mol L^{-1} , água destilada e H_2SO_4 e H_3PO_4 (2:1 v/v). Em seguida, o teor de C solúvel do solo foi determinado por titulação dos extratos com $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}]$ 0,05 mol L^{-1} após a adição de indicador ferroína e H_2SO_4 . A solução titulante foi padronizada previamente por adição de ferroína e H_2SO_4 em uma alíquota e titulação com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0667 mol L^{-1} .

Após a fumigação, o teor de carbono microbiano (C-BMS) foi estimado pela equação de Vance et al. (1987) como recomendado por Anderson e Ingram (1993):

$$C\text{-BMS} (\mu\text{g de C.g}^{-1} \text{ de solo}) = 2,64 \times (CS\text{-F} - CS\text{-NF}) \quad (\text{Equação 3})$$

Para o método da irradiação de Islam e Weill (1998) o teor de C-BMS foi calculado utilizando-se a fórmula descrita pelos mesmos autores:

$$C\text{-BMS} (\mu g \text{ de } C.g^{-1} \text{ de solo}) = (CS\text{-}F - CS\text{-}NF)/0,213 \quad (\text{Equação 4})$$

Em ambos os casos, CS-F é o teor de carbono solúvel (CS) em K_2SO_4 0,5 M na amostra fumigada; CS-NF é teor de CS na subamostra não fumigada.

Para correção do teor de C-BMS em função da umidade das amostras utilizou-se a equação:

$$C\text{-BMS}_c = C\text{-BMS}/(1\text{-}UG) \quad (\text{Equação 5})$$

Na qual UG é o teor de umidade gravimétrica das amostras.

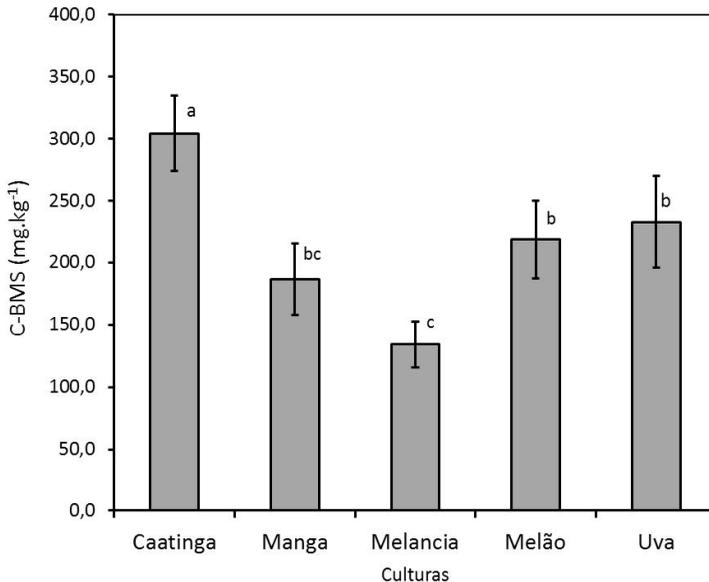
Três alíquotas de 20 g, retiradas das amostras de solo, foram submetidas aos diferentes procedimentos de fumigação descritos anteriormente e utilizadas para a contagem de microrganismos viáveis. As alíquotas foram transferidas para frascos contendo 80 mL de solução de Triton X-100 0,01 % e permaneceram em agitação por 1 hora em agitador orbital a 120 rpms. Alíquotas de 10 mL foram tomadas e procedeu-se uma diluição seriada e plaqueamento para a contagem de bactérias totais e fungos. Cem microlitros das diluições foram inoculadas em placa de Petri contendo meio Agar nutritivo adicionado de 50 mg L⁻¹ de cicloheximida e, para contagem de fungos, em meio BDA contendo 50 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 50 mg L⁻¹ de cloreto de tetraciclina e rosa de bengala 0,03 % (MARTIN, 1950). As placas foram mantidas em estufas BOD a 25 °C por 72 horas, período após o qual se procedeu a contagem do número de colônias, expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se análise de variância (Anova) considerando-se um arranjo fatorial com dois fatores: métodos de fumigação, com três níveis, e ao pré-tratamento de correção da umidade do solo, com dois níveis. O delineamento foi em blocos ao acaso com cinco amostras por área avaliada e três repetições por amostra. Após a análise de variância, os resultados foram comparados utilizando-se o teste de Tukey a 5 % de significância. O coeficiente de variação da média (CVM%) para os métodos de fumigação foi calculado utilizando a fórmula:

$$CVM\% = DP/ \quad \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Resultados e Discussão

Na análise de variância considerando apenas o efeito do fator cultura (dados de métodos reunidos) sobre o teor de C-BMS, houve efeito significativo do manejo sobre o teor de carbono da biomassa microbiana ($P < 0,01$). De um lado, as amostras coletadas em área de referência de vegetação de Caatinga apresentaram, em média, os valores mais elevados de C-BMS ($304,49 \pm 30,16 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto as amostras oriundas da área com cultivo de melancia, os valores foram mais baixos ($134,13 \pm 18,31 \text{ mg kg}^{-1}$), refletindo o uso mais intenso de estratégias de preparo do solo em culturas anuais (Figura 1). Por outro lado, as culturas perenes apresentaram teores intermediários de C-BMS, provavelmente por causa do manejo menos intensivo do solo. As amostras oriundas da área de cultivo de meloeiro apresentaram valores similares às culturas anuais, o que se deve ao fato de que, anteriormente, a área foi cultivada com tamareiras por um longo período.



Colunas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 1. Teor de carbono da biomassa microbiana (C-BMS) ($\bar{X} \pm EP$) em um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico com diferentes culturas no Campo Experimental de Bebedouro, Petrolina, PE, 2012.

Os diferentes fatores considerados no experimento foram analisados em esquema fatorial. Verificou-se haver interação tripla significativa para o teor de carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS) entre os métodos de pré-tratamento das amostras, fumigação e os diferentes usos do solo analisados ($P < 0,001$), indicando a dependência entre a manipulação da amostra após a coleta e o teor de C-BMS nas amostras coletadas.

O pré-tratamento das amostras, com a correção ou não da umidade gravimétrica (UG) para 60% da capacidade de campo, apresentou interação significativa tanto com os métodos de fumigação ($P < 0,001$) quanto para as culturas ($P < 0,001$). De modo geral, a correção da UG resultou em teor médio de $348,79 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($\pm 126,79 \text{ mg.kg}^{-1}$) de C-BMS, enquanto na ausência de correção o teor detectado foi de $81,88 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Na Tabela 1 são apresentadas as médias para C-BMS ($\bar{X} \pm \text{DP}$) obtidas da interação entre os fatores, o coeficiente de variação das médias (CVM), o coeficiente de variação total (CV) e os valores para a diferença mínima significativa (DMS) estimada pelo teste de Tukey para os diferentes fatores considerados no experimento. O método de fumigação influenciou nos valores dos teores de C-BMS obtidos para as amostras oriundas de uma mesma cultura pelo teste de Tukey a 5 % de significância (Tabela 1). Em todos os casos, os valores para o C-BMS determinados utilizando-se o método de irradiação em forno de micro-ondas foram menores do que aqueles obtidos com os métodos com o uso de clorofórmio. Os resultados não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre a adição de clorofórmio pela saturação do ambiente ou pela aplicação direta sobre a amostra (Tabela 1).

De modo geral, o coeficiente de variação da média (CVM%) foi mais baixo para as condições de correção da umidade a 60% da CC, mesmo para o método de irradiação das amostras. Além disso, a análise da dispersão dos resultados obtidos com os diferentes métodos de pré-tratamento da amostra, apresentados nos box-plot da Figura 1, permitem verificar que com a correção da umidade das amostras obteve-se tanto um aumento de extração do C-BMS, quanto uma redução da dispersão dos resultados, independentemente do método de fumigação utilizado, como pode ser observado no gráfico em box-plot. Nos métodos com fumigação por clorofórmio, em ambas as condições de umidade, há um aumento na dispersão no 2º e 3º quartil (25-75%), provavelmente resultado do aumento dos valores detectados. No entanto, há a eliminação da ocorrência de valores discrepantes (Figura 2).

Tabela 1. Teores de carbono da biomassa microbiana (mg kg^{-1}) de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico com diferentes culturas, obtidos a partir de diferentes métodos de pré-tratamentos das amostras e de fumigação. Médias de cinco repetições.

Tratamentos	Culturas	Umidade gravimétrica real		Umidade gravimétrica corrigida (60 % CC)	
		Média (\pm DP)	CVM* (%)	Média	CVM* (%)
Clorofórmio (Saturação)	Caatinga	279,00 (85,97)	30,81	504,14 (51,15)	10,15
	Manga	39,56 (18,59)	47	577,85 (85,44)	14,79
	Melancia	37,84 (3,60)	9,51	208,84 (17,12)	8,18
	Melão	53,31 (30,64)	57,48	340,74 (30,16)	8,85
	Uva	67,07 (17,62)	26,27	416,34 (58,36)	14,02
Clorofórmio (Direto)	Caatinga	254,42 (47,52)	18,68	453,59 (85,55)	18,86
	Manga	50,61 (21,66)	42,8	348,78 (84,40)	24,2
	Melancia	69,31 (12,44)	17,95	222,39 (36,46)	15,57
	Melão	120,20 (17,14)	14,26	363,54 (50,60)	13,92
	Uva	42,51 (22,76)	53,54	447,78 (51,68)	11,54
Irradiação	Caatinga	70,67 (12,48)	17,66	296,26 (73,15)	42,93
	Manga	36,52 (13,93)	37,85	246,55 (74,35)	24,69
	Melancia	19,84 (5,49)	27,65	288,98 (116,27)	30,16
	Melão	38,66 (10,08)	26,07	234,41 (88,19)	40,24
	Uva	48,73 (43,05)	88,34	281,69 (120,93)	37,62
Média		81,88 (81,61)	99,68	348,79 (126,79)	36,35
CV (%) Fumigação ²		59,7		13,9	
CV (%) Clorofórmio		52,9		15,5	
CV (%) Irradiação		132,7		21,1	
DMS (Culturas) ³					40,74
DMS (Fumigação)					32,14
DMS (Pré-tratamento)					15,32

¹Coefficiente de variação da média (%) estimado por $CVM\% = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100$. ²Coefficiente de variação $CV\% = \sqrt{\frac{OMR}{\bar{x}}} \times 100$. ³Diferença mínima significativa estimada pelo teste de Tukey $\Delta = q \times (\sqrt{\frac{OMR}{f}} \sqrt{f})$ para as médias dos diferentes fatores.

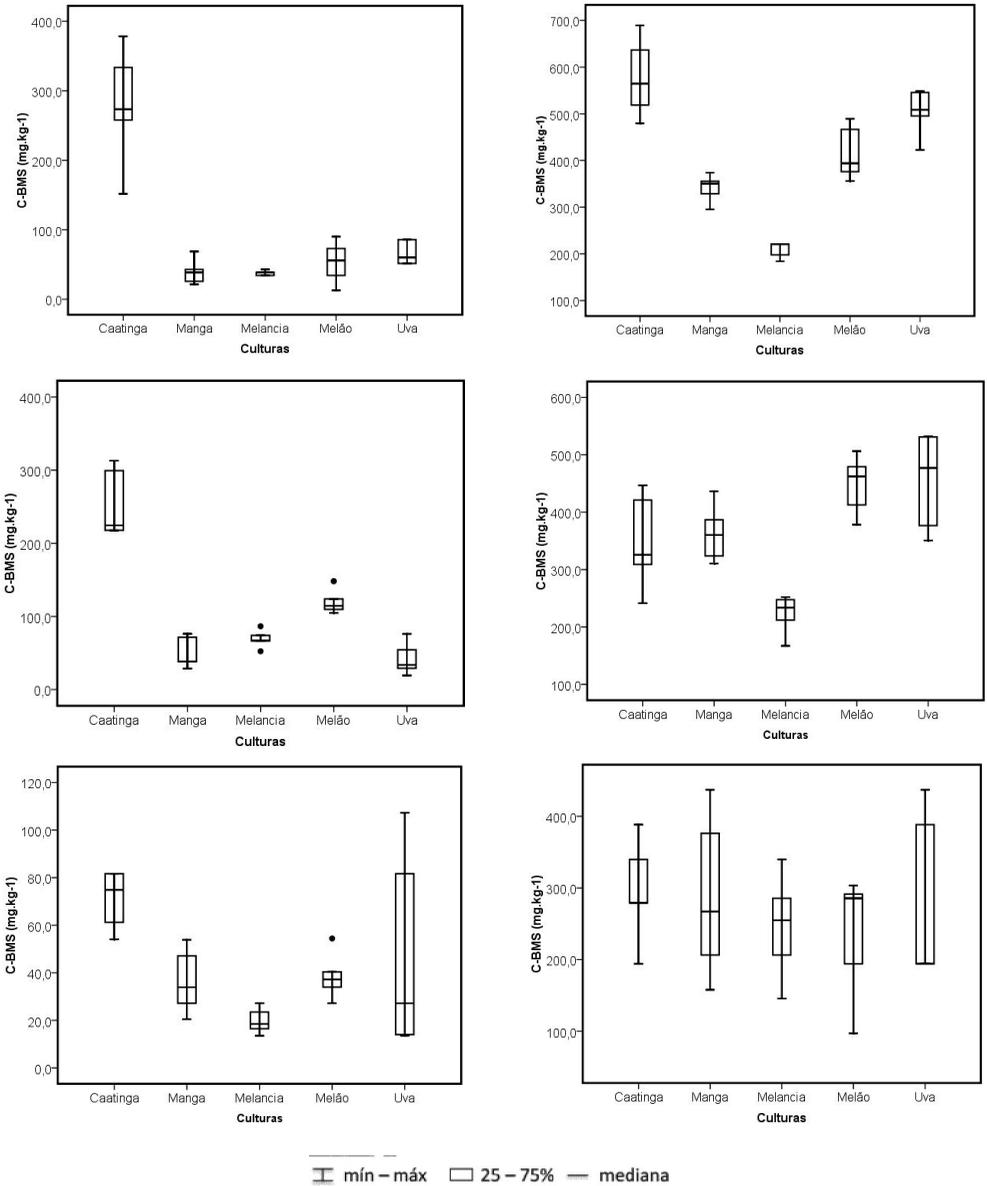


Figura 2. Box plot (mediana, dispersão – mínimo e máximo - e quartis – 25% e 75%) para os teores de carbono da biomassa microbiana de um Argissolo Vermelho-Amarelo com diferentes formas de uso determinado segundo diferentes métodos de fumigação. A e D – fumigação; B e E – clorofórmio; C e F – Irradiação) e ao pré-tratamento das amostras (A – C – umidade natural; D – F - umidade 60% CC).

Um conjunto de hipóteses pode ser levantado para explicar os maiores valores observados para C-BMS nas amostras umedecidas: uma rápida multiplicação de bactérias no período de preparo das amostras; a maior umidade das amostras reduz a adsorção dos lisados celulares pelos colóides do solo, aumentando a eficiência de extração por K_2SO_4 0,5 M (ANDERSON; INGRAM, 1993); a existência de umidade aumentaria a eficiência de aquecimento e de distribuição do calor na amostra. Esta última hipótese é corroborada pelos estudos de Ferris (1984) que demonstrou que o efeito da radiação micro-ondas é mais letal aos micro-organismos na presença de umidade já que, por causa de suas características, há maior resistência ao aquecimento dos minerais do solo (JONES et al., 2002).

No entanto, a partir da quantificação da ocorrência de estruturas viáveis de micro-organismos heterotróficos nas amostras de solo após os tratamentos de fumigação, verificou-se que todos os métodos promoveram uma redução de, ao menos, duas unidades logarítmicas no número de células bacterianas viáveis nas amostras de solo, não apresentando diferença significativa entre os métodos (Tabela 2). Não houve efeito significativo da umidificação das amostras no número de colônias obtidas em meio de cultura pelo teste de F ($P > 0,05$). Fato que, provavelmente, pode ser atribuído à ocorrência de bactérias endosporulantes (Firmicutes) nas amostras, que apresentam baixa atividade de troca de gases, maior resistência e menor permeabilidade de membrana, conferida pela deposição interna de peptidoglicanos (MADIGAN et al., 1997). Contudo, verificou-se uma variação significativa no número de propágulos fúngicos viáveis dependente do método de tratamento ao qual a amostra foi submetida.

Os métodos nos quais se utilizou a aplicação de clorofórmio apresentaram os menores valores médios para propágulos fúngicos viáveis após o tratamento (Tabela 2) enquanto a irradiação apresentou os mais elevados números de propágulos viáveis. É possível que, no caso do clorofórmio, os propágulos viáveis remanescentes tratem-se de estruturas de resistência (clamidósporos e escleródios), com baixa permeabilidade gasosa, com paredes espessas e enrijecidas pela deposição de quitina e melanina (MADIGAN et al., 1997). Embora as bactérias geralmente apresentem maior diversidade e números totais em amostras de solo, os fungos, apresentando maiores dimensões,

respondem pela maior parte da biomassa microbiana total (MILLE-LINDBLOM et al., 2004). Além disso, possuindo parede celular contendo glucanos e quitina, os fungos apresentam maior resistência aos tratamentos que causam a lise celular. Desta forma, a diferença verificada entre os resultados apresentados pelos diferentes métodos para o conteúdo de carbono da biomassa microbiana neste trabalho pode ser explicada pela reduzida capacidade do método de irradiação em causar a lise celular do micélio fúngico e, conseqüente, liberação dos constituintes celulares.

Tabela 2. População microbiana (\log UFC \pm EP) de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico com diferentes culturas em amostras tomadas previamente e após o tratamento recomendado pelos diferentes métodos de fumigação para a análise da biomassa microbiana.

Manejo	Não fumigado	Clorofórmio (Saturação)	Clorofórmio (Direto)	Irradiação
Bactérias				
Caatinga	7,28 (0,32)	4,48 (1,12)	6,19 (0,05)	5,01 (1,26)
Manga	7,51 (0,41)	5,67 (0,63)	6,32 (0,16)	7,17 (0,11)
Melancia	7,46 (0,53)	6,09 (0,09)	6,36 (0,08)	6,44 (0,13)
Melão	7,45 (0,26)	6,27 (0,29)	6,51 (0,23)	6,71 (0,14)
Uva	6,78 (0,24)	6,11 (0,18)	6,19 (0,12)	6,15 (0,37)
Média	7,30 (0,38)	5,72 (0,28)	6,26 (0,07)	6,29 (0,28)
Fungos				
Caatinga	4,84 (0,17)	1,54 (0,94)	1,66 (0,24)	4,39 (0,16)
Manga	5,29 (0,94)	1,05 (0,18)	0,64 (0,64)	4,91 (0,06)
Melancia	4,52 (1,06)	0,32 (0,71)	1,67 (1,02)	3,53 (0,16)
Melão	5,00 (0,19)	1,51 (0,20)	3,29 (0,83)	4,72 (0,16)
Uva	5,37 (0,06)	1,54 (0,94)	0,43 (0,82)	4,09 (1,02)
Média	5,01 (0,13)	1,13 (0,41)	1,45 (0,40)	4,53 (0,20)

Em suas considerações na apresentação do método de irradiação, Islam e Weil (1998) consideram que na matriz do citossol microbiano a radiação de micro-ondas promove o superaquecimento e evaporação da água livre ou da camada de solvatação das macromoléculas, aumentando a pressão de vapor interna e causando degradação molecular e, em seguida, ocorre a membranas celulares. Além disso, associado às altas temperaturas geradas, um efeito físico direto da irradiação altera a permeabilidade de membranas e pode causar sua ruptura (MCCLEAN et al., 1981; NEAS; COLLINS, 1988) resultando, em todos os casos, no extravasamento de constituintes celulares para a solução do solo, que passariam a ser detectados como um aumento do teor de C solúvel, princípio básico da metodologia.

A exatidão, a precisão e a sensibilidade são parâmetros que devem ser considerados na escolha de um procedimento de análise. Em geral, a análise de C-BMS apresenta grande variabilidade entre as subamostras, independentemente dos métodos utilizados. Contudo, neste trabalho, as médias estimadas para os métodos que preconizam a utilização de vapor de clorofórmio apresentaram os menores coeficientes de variação da média (CVM%) ou total (CV), em detrimento do método de irradiação utilizando micro-ondas. No entanto, em todos os métodos, a adição de água às amostras resultou em uma forte elevação do teor de C-BMS, gerando um artefato de análise que pode impedir a correta quantificação do comportamento da população microbiana no solo em função de práticas de manejo ou da influência da variação sazonal do clima, recomendando o método de fumigação utilizando vapor de clorofórmio, principalmente nos casos em que se estudam amostras oriundas de solo com baixo teor de umidade, condição comum no Semiárido brasileiro.

Considerando-se que a avaliação do carbono da biomassa microbiana em condições naturais utilizando o método de irradiação resultou em teores subestimados, o método não deve ser recomendado para a avaliação do C-BMS em estudos com umidade natural do solo, nos quais poderão haver amostras com baixo teor de umidade gravimétrica. Embora mais lento, o método de fumigação com vapor de clorofórmio apresentou resultados mais consistentes, com baixa dispersão dos valores detectados nas médias, resultando em baixo coeficiente de variação, por isso, é recomendado para estudos envolvendo amostras de baixa umidade como em avaliação dos ciclos naturais de umedecimento e secagem.

Conclusões

As amostras coletadas em área de referência de vegetação de Caatinga apresentaram os valores mais elevados de C-BMS, seguida das amostras oriundas da área com cultivo das culturas perenes, enquanto o solo sob cultivo de melancia apresentou os valores mais baixos.

A correção da umidade do solo como pré-tratamento das amostras resultou na obtenção de maiores teores de C-BMS.

O método de fumigação pela exposição das amostras em ambiente saturado com vapor de clorofórmio resultou em valores de C-BMS similares a aplicação direta de clorofórmio às amostras, no entanto, apresentou menor variabilidade dos valores obtidos.

O método de fumigação por micro-ondas resultou em valores inferiores de C-BMS, principalmente nas amostras que não receberam correção da umidade como pré-tratamento.

Os métodos de aplicação direta de clorofórmio e de fumigação por micro-ondas não reduziram significativamente o número de propágulos viáveis de bactérias do solo.

A aplicação de ambos os tratamentos com clorofórmio resultou em redução dos propágulos fúngicos viáveis quando comparado ao solo natural, enquanto a fumigação em micro-ondas não promoveu a lise das estruturas fúngicas.

Referências

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 467 p.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, [Cham], v. 10, n. 3, p. 215-221, 1978.

ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. **Tropical soil biological and fertility**: a handbook of methods. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 1993. 221 p.

BLAGODATSKAYA, E.; KUZYAKOV, Y. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, [Cham], v. 67, p. 192-211, 2013.

CARDOSO, M. O. Métodos para quantificação da biomassa microbiana do solo. **Revista Agropecuária Técnica**, [Araçá], v. 25, p. 136-143, 2004.

COSTA, W. A.; OLIVEIRA, C. A. da S.; KATO, E. Modelos de ajuste e métodos para a determinação da curva de retenção de água de um Latossolo Vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, p. 515-523, 2008.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. C. N e P na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. de A.; CAMARGO, F. A. de O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 389-412.

DEPOLLI, H.; PIMENTEL, M. S. Indicadores de qualidade do solo. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.). **Agroecologia**: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília, DF: Embrapa, 2005. p. 323-340.

DRIJBER, R. A.; DORAN, J. W.; PARKHURST, A. M.; LYON, D. J. Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. **Soil Biology & Biochemistry**, [Cham], v. 32, n. 10, p. 1.419-1.430, 2000.

FRIGHETTO, R. T. S.; SCHNEIDER, R. P. Problemas encontrados na avaliação de micro-organismos do solo. In: FRIGHETTO, R. T. S., VALARINI, P. J. (Coord.). **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 41-44. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 21).

GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic Hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 59, p. 502-507, 1993.

GRISI, B. M.; GRAY, T. R. G. Biomassa microbiana de solo estimada de biovolume com o uso da microscopia de fluorescência. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 9, n. 2, p. 131-138, 1985.

HAN, W.; SARAH J. KEMMIT, S. J.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass and activity in Chinese tea gardens of varying stand age and productivity. **Soil Biology & Biochemistry**, [Cham], v. 39, p. 1.468-1.478, 2007.

HORWAT, W. R.; PAUL, E. A. Microbial biomass. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S. (Ed.). **Methods of soil analysis**: part 2: microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Society of America, 1994. p. 753-774.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 27, p. 408-416, 1998.

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. p. 415-471.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, [Cham], v. 8, p. 209-213, 1976.

JONES, D. A.; LELYVELD, T. P.; MAVROFIDIS, S. D.; KINGMAN, S. W.; MILES, N. J. Microwave heating applications in environmental engineering: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, [Oxford], v. 34, p. 75-90, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock**: biology of microorganisms. 8th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997. 892 p.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, [Rosemont], n. 69, p. 215-232, 1950.

McCLEAN, V. E. R.; SHEPPARD, R. J.; GRANT, E. H. A generalized model for the interaction of microwave radiation with bound water in biological material. **Journal of Microwave Power**, [Rockville Pike], v. 16, p. 1-7, 1981.

MILLE-LINDBLOM C.; von WACHENFELDT, E.; TRANVIK L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **Journal of Microbiological Methods**, [Cham], v. 59, p. 253-62, 2004.

NEAS, E. D.; COLLINS, M. J. Microwave heating: theoretical concepts and equipment design. In: KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. (Ed.). **Introduction to microwave sample preparation: theory and practice**. Washington: American Chemical Society, 1988. p. 7-32.

NIELSEN K. N.; MADSEN, J. Ø. Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [Philadelphia], v. 898, p. 227-234. 2000.

PELCZAR JUNIOR, R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to the straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, [Cham], v. 19, p. 159-164, 1987.

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**, [Cham], 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**, [Cham], v. 19, p. 703-707, 1987.



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



CGPE 12680