



Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-C)

Edmilson Evangelista da Silva¹
Pedro Henrique Sabadin de Azevedo²
Helvécio De-Polli³

Introdução

As metodologias para a estimativa da BMS-C tem sido objeto de ajustes e críticas, entretanto as propostas descritas por VANCE et al. (1987) e TATE et al. (1988) proporcionaram avanços significativos na quantificação dessa biomassa viva dos microrganismos do solo (DE-POLLI & GUERRA, 1999). Em trabalho realizado por (ANDREA & HOLLWEG, 2004) confirmaram que a fumigação-extração, com base no trabalho realizado por VANCE et al. (1987), é o mais adequado à determinação da BMS-C. O método é mais rápido sendo empregado sem maiores limitações em solos ácidos e com adição recente de matéria orgânica, porém devendo-se evitar solos com teores de carbono muito elevados, sendo aplicável para solos com teores inferiores a 100g de C kg⁻¹ de solo (SPARLING & WEST, 1988).

O conhecimento dos níveis de BMS-C no solo se tornam importantes para conservação da matéria orgânica do solo, monitoramento de áreas sob influência antrópica, servindo como sensível indicador de alterações provocadas no ambiente.

Objetivou-se com este documento apresentar de forma sucinta, adaptações na metodologia originalmente proposta por VANCE et al. (1987), com algumas modificações obtidas em trabalhos

de outros autores, criando desta forma uma metodologia simplificada e de mais fácil uso na determinação do BMS-C.

Método

Fumigação-extração segundo VANCE et al. (1987), sendo a relação solo extrator 1:2,5 segundo TATE et al. (1988) e $k_C=0,33$ preconizado por SPARLING & WEST (1988), realizando fumigação com adição de clorofórmio (isento de etanol) diretamente na amostra, como descrito por BROOKES et al. (1982) e WITT et al. (2000), mantendo-as em local escuro por 24 horas, procedendo-se a extração e quantificação do carbono microbiano pelo método (WALKLEY & BLACK, 1934) modificado segundo TEDESCO et al. (1995), sem aquecimento externo em chapa. Vale ressaltar que a fumigação também pode ser feita sob vácuo com uso de dessecador conforme metodologia original de VANCE et al. (1987).

Materiais e equipamentos necessários

Para fumigação

- Frascos de vidro de 100 mL com tampa;
- Pipeta com graduação de 1 mL;
- Clorofórmio P.A. (CHCl₃) isento de etanol;

¹ Doutorando em Fitotecnia, UFRRJ – BR 465, km 07, Caixa Postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: edmilson@cnpab.embrapa.br

² Graduando em Química, UFRRJ. E-mail: pedrosabadin@hotmail.com

³ Pesquisador Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: depolli@cnpab.embrapa.br

Para extração

- Balança analítica com precisão de 0,1 mg;
- Frascos de vidro de 100 mL com tampa;
- pHmetro;
- Balão volumétrico de 100 e 1000 mL;
- Becher de 100 e 1000 mL;
- Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M: pesar 28,0528 g de hidróxido de potássio. Transferir para um becher de 1000 mL, adicionar cuidadosamente 700 mL de água deionizada. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume com água deionizada após resfriamento;
- Solução de ácido sulfúrico 0,5 M: transferir 27,18 mL de ácido sulfúrico PA com auxílio de dispensador automático de 0 a 50 mL para um becher de 1000 mL contendo 100 mL de água deionizada, em capela de exaustão. Adicionar mais 700 mL de água deionizada, homogeneizar a solução no becher e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, aferindo o valor com água deionizada;
- Solução de sulfato de potássio (K₂SO₄) 0,5 M: pesar 87,1001 g do sal, transferir para becher de 1000 mL e adicionar 800 mL de água deionizada. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. Antes da aferição final do volume da solução deve-se corrigir o pH para a faixa entre 6,5-6,8, transferindo uma alíquota da solução solubilizada para um becher e realizando a leitura no pHmetro. Se necessária à correção do pH, adicionar no balão gotas de solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M se o meio estiver ácido e gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 M se o meio estiver básico, sempre retornando a alíquota à origem e realizando a leitura após cada adição. Após correção do pH, aferir o volume à 1000 mL com água deionizada;
- Dispensador automático com capacidade de 0 a 50 mL;
- Agitador orbital;

- Funil;
- Papel de filtro (filtração rápida) de 28 µm;
- Tubos de 50 mL com tampa;

Para determinação do carbono microbiano

- Pipeta automática de 10 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) 0,066 M: pesar 19,4161 g do sal, previamente seco em estufa 105°C e transferir para um becher de 1000 mL, adicionando 700 mL de água deionizada. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico, aferindo o volume à 1000 mL com água deionizada;
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) P.A.;
- Ácido orto-fosfórico (H₃PO₄) P.A.;
- Difenilamina ((C₆H₅)₂NH) 1% (m/v) em H₂SO₄: pesar 1,000 g de difenilamina, transferir para um becher de 100 mL, adicionar 50 mL de ácido sulfúrico concentrado, dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, aferindo o volume à 100 mL com o mesmo ácido;
- Agitador magnético;
- Solução de sulfato ferroso amoniacal [(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O] 0,033 M: pesar 13,000 g do sal, transferir para um becher de 1000 mL e dissolver em 600 mL de água deionizada, adicionar 10 mL de ácido sulfúrico e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume a 1000 mL com água deionizada;
- Bureta ou titulador automático com precisão de 0,01 mL.

Amostra

As amostras devem ser coletadas em pontos e profundidades previamente determinados, conforme o planejamento da pesquisa. A umidade do solo nas amostras para o processamento poderá ser em torno de 60% da capacidade de campo ou conforme o objeto da pesquisa. As amostras devem ser imediatamente armazenadas, sendo mantidas o mais próximo das condições em que foram coletadas até sua chegada ao

laboratório, onde serão preparadas, procedendo as análises em até três dias ou armazenadas em geladeira a 4°C por até dez dias.

Limitações do método

O método possui limitações quanto a replicabilidade, pois sua utilização se dá em amostras "frescas" de solo, com isso, posteriores coletas podem divergir quanto aos resultados, levando a alta variabilidade até mesmo em replicas de laboratório, sendo necessário o uso de triplicatas. Outro fator importante está na umidade do solo, pois solos com alto teor de umidade são de difícil manuseio no processo de tamisagem, além de influir negativamente na fumigação do solo, interferindo na difusão do clorofórmio. Em contrapartida solos muito secos são desfavoráveis, pois os microorganismos se encontram em forma latente, e portanto sua membrana celular menos susceptível ao rompimento no processo de fumigação, subestimando o valor real da biomassa microbiana. Para evitar tais inconvenientes aconselha-se que a amostragem de campo seja a mais próxima possível de 60 % da capacidade de campo do solo.

Como citado acima, por possuir uma alta variabilidade e a análise realizada em triplicata, seu uso em larga escala é pouco prático, dependendo da capacidade analítica do laboratório e a experiência dos envolvidos na análise.

Procedimento

Preparação da amostra

As amostras recém coletadas devem ser peneiradas em malha de 2 mm, retirando-se os fragmentos de animais e vegetais por meio de catação, para que em seguida seja processada.

Determinação da umidade na capacidade de campo do solo

A forma de determinação da umidade na capacidade de campo do solo aqui descrita, apesar de expedita, fornece precisão suficiente.

O método baseia-se na determinação da umidade do solo na capacidade máxima de retenção de água (capacidade de campo) e na determinação

da umidade do solo no momento da coleta das amostras, para que se determine se a umidade do solo na coleta é correspondente à desejada.

Realizar o preenchimento de proveta de 100 mL com cerca de 80 mL de solo recém coletado e já peneirado. Adicionar água até que a frente de molhação atinja cerca de 40 a 50 % do volume de solo, recobrir a proveta com papel alumínio, deixando o solo em repouso por 12 horas, ou até que a frente de molhação estacione. A frente de molhação não deve tocar o fundo da proveta, o que invalidaria o procedimento, neste caso deve-se repetir o teste com nova amostra com quantidade menor de água. Retirar uma porção de solo da parte molhada, pesar e levar para estufa à 105°C por 24 horas ou até que o solo atinja peso constante, obtendo o peso do solo seco posteriormente. A determinação da umidade total do solo na capacidade de campo e das amostras oriundas do campo (para umidade total do solo) é obtida pela Equação 1:

$$U \text{ (g de água g}^{-1} \text{ de solo)} = (P_U - P_S)/P_S$$

Equação 1 – Cálculo para determinação da umidade total do solo, onde: P_U = peso do solo úmido ; P_S = peso do solo seco, usado tanto para a amostra de solo trazida do campo quanto a retirada da proveta.

Para determinar a umidade percentual relativa (U_R) das amostra frescas de solo frente à umidade do solo na capacidade de campo é utilizada a Equação 2:

$$U_R \text{ (%) } = (U_A / U_C) \cdot 100$$

Equação 2 – Determinação da umidade percentual relativa, onde: U_R = umidade relativa do solo fresco frente a capacidade de campo; U_A = umidade do solo amostrado (g de água g⁻¹ de solo); U_C = umidade do solo na capacidade de campo (g de água g⁻¹ de solo).

Procedimento analítico

As amostras serão analisadas em triplicata, para isto, cada amostra será dividida em sete sub-amostras de 20 g (três fumigadas, três não-fumigadas e uma para obtenção da umidade do solo), devidamente pesadas e acondicionadas em frascos de vidro de 100 mL.

Cabe ressaltar que podem ser utilizados os mesmos extratos obtidos na fumigação-extração realizada para determinação da BMS-N (nitrogênio da biomassa microbiana do solo), conforme descrito por SILVA et al. (2007).

Determinação da umidade do solo

O frasco previamente destinado à determinação de umidade do solo deve ser seco em estufa a 105°C por 24 horas ou até obter peso constante. Após seca, a amostra deve ser acondicionada em dessecador até equilíbrio de temperatura e em seguida pesada.

Fumigação

Imediatamente após a pesagem da amostra de solo adicionar aproximadamente 1 mL de clorofórmio isento de etanol com o auxílio de uma pipeta com graduação de 1 mL, em todos os frascos destinados a fumigação (Figura 1). Os frascos são em seguida fechados e armazenados em local isento de luminosidade por 24 horas, com temperatura em torno de 25 a 28°C. No dia seguinte retirar a tampa dos frascos em capela de exaustão, deixando evaporar todo o clorofórmio presente até eliminação completa, como preconizado por BROOKES et al. (1982) e WITT et al. (2000).



Figura 1 – Adição direta de clorofórmio na amostra

Extração

A extração se dá nas amostras fumigadas, após tempo de fumigação de 24h, seguida de eliminação dos resíduos de clorofórmio, e nas não-fumigadas, realizado imediatamente após pesagem, procedendo da seguinte forma:

Adicionar 50 mL de solução 0,5 M de sulfato de potássio (K_2SO_4), com o auxílio de um dispensador de 0 a 50 mL.

Agitar por 30 minutos em agitador orbital a 220 RPM, esperar decantar por 30 minutos e transferir o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta para um filtro de papel acoplado a funil e tubo de 50 mL, evitando resuspensão e recuperação de material decantado (Figura 2). Ao final da filtragem é obtido o extrato de cada sub-amostra (fumigada ou não-fumigada), que devem ser direcionadas para quantificação do carbono microbiano ou armazenados em geladeira a 4°C por no máximo 10 dias.



Figura 2 – Filtração do material extraído

Determinação do carbono microbiano

Transferir 8 mL do extrato previamente filtrado para um Erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 2 mL de solução 0,066 M de dicromato de potássio, 10 mL de ácido sulfúrico P.A. e 5 mL de ácido ortofosfórico P.A., todos com o auxílio de dispensador, e em ordem cronológica. Esperar esfriar e adicionar cerca de 70 mL de água deionizada, esperar esfriar novamente, adicionar aproximadamente 4 gotas de difenilamina e titular sob agitação magnética com uma solução 0,033 M de sulfato ferroso amoniacal. Ao final da titulação, a coloração da solução irá do púrpura (A) para verde (B) (Figura 3).

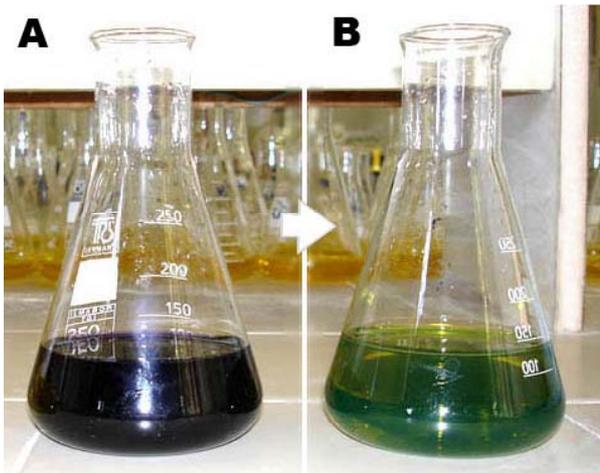


Figura 3 – Ponto estequiométrico da volumetria de oxi-redução

Cálculo do teor de C nos extratos (Equação 4)

$$C \text{ (mg C kg}^{-1} \text{ solo)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 0,003 \cdot V_1 \cdot 10^6}{P_s \cdot V_2}$$

Equação 4 – Determinação do carbono nos extratos fumigado e não-fumigado do solo, onde: C - carbono extraído do solo; V_b (mL) - volume do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); V_a (mL) - volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra; M - Molaridade exata do sulfato ferroso amoniacal; V_1 - volume do extrator (K_2SO_4) utilizado; V_2 - alíquota pipetada do extrato para a titulação; 0,003 - miliequivalente do carbono; P_s (g) - massa de solo seco.

Cálculo da molaridade exata da solução de sulfato ferroso amoniacal $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O]$ 0,033 M

Para a realização da padronização (molaridade exata) da solução de sulfato ferroso amoniacal utilizar a Equação 3, posteriormente a quantificação do carbono microbiano pois necessitam-se dos valores das amostras controle (branco):

$$M_1 = [(M_2 \cdot V_2) \cdot 6] / V_1$$

Equação 3 – Determinação da molaridade exata do sulfato ferroso amoniacal, onde: M_1 - Molaridade exata padronizada do sulfato ferroso amoniacal; M_2 - Molaridade exata do dicromato de potássio (0,066 M); 6 - Razão estequiométrica ($K_2Cr_2O_7$); V_1 - volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra controle (branco); V_2 - Volume da alíquota de dicromato de potássio utilizada.

Cálculo da BMS-C

O cálculo da BMS-C é dado pela Equação 5, utilizando $k_C=0,33$ descrito por SPARLING & WEST (1988):

$$BMS-C \text{ (mg C microbiano kg}^{-1} \text{ solo)} = FC \cdot k_C^{-1}$$

Equação 5 – Cálculo da biomassa microbiana do solo, onde: BMS-C - carbono da biomassa microbiana do solo em mg de C por kg de solo (ou $\mu\text{g g}^{-1}$); FC - fluxo obtido da diferença entre a quantidade de C (mg kg^{-1}), da Equação 4, recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada e k_C - fator de correção.

Referências Bibliográficas

ANDREA, M. M.; HOLLWEG, M. J. M. Comparação de métodos para determinação da biomassa microbiana em dois solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 981-986, nov./dec. 2004.

BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 319-329, 1982.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. C, N e P na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 389-411.

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação do nitrogênio da biomassa microbiana do solo (BMS-N)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 6 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 96).

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial- C - calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C-labeled cells. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 337-343, 1988.

TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial- C - effects of experimental- variables and some different calibration procedures. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 329-335, 1988.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; VLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solos, 1995. 174 p.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, Baltimore, v. 37, p. 29-38, 1934.

WITT, C.; GAUNT, J. L.; GALICIA, C. C.; OTTOW, J. C. G.; NEUE, H. U. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 510-519, mar. 2000.

Comunicado Técnico, 98

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2007): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: José Guilherme Marinho Guerra e José Antônio Azevedo Espindola
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.