

**ATIVIDADE E BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO:
VISÃO DA METODOLOGIA**

KÁTIA REGINA DO ROSÁRIO NASCIMENTO SALES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO/2007**

ATIVIDADE E BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO: VISÃO DA METODOLOGIA

KÁTIA REGINA DO ROSÁRIO NASCIMENTO SALES

Monografia apresentada ao Laboratório de Ciências Químicas do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Licenciado em Química, na área de atuação em Ensino Médio.

Orientadora: Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
OUTUBRO de 2007**

ATIVIDADE E BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO: VISÃO DA METODOLOGIA

KÁTIA REGINA DO ROSÁRIO NASCIMENTO SALES

Monografia apresentada ao Laboratório de Ciências Químicas do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Licenciado em Química, na área de atuação em Ensino Médio.

Aprovada em 26 de Outubro de 2007.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Leda Mathias
(D.Sc, Química Prod. Naturais) - UENF

Prof. Antonio Carlos da Gama-Rodrigues
(D.Sc., Ciência do Solo) - UENF

Prof^a Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues
(Ph.D., Ciência do Solo) - UENF
Orientador

Dedico este trabalho a todos os profissionais que tenham em mente a preocupação e a vontade de a cada dia refletir e melhorar sua condição profissional e humana no contexto de suas relações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por me conceder a oportunidade de chegar até aqui.

Ao meu esposo Robson e filhos Rômulo, Kamila e Brenno pela paciência e carinho sem cobranças.

À minha avó Maria Francisca (in memória) pelo exemplo.

Aos meus avôs (in memória) Sebastião e Claudionora pelo aconchego em uns dos momentos mais difíceis de minha vida.

Aos meus pais Wilson e Gessy e a minha irmã Maisa pelo amor eterno.

A todos da minha família que confiam em mim.

À professora Emanuela pela amizade, confiança e estímulo.

A todos os colegas de classe pelos finais de semana e madrugadas junto estudando, nos momentos alegres e tristes.

A todos os amigos do laboratório de solos do CCTA, em especial Patrícia e Glaucia, meus anjos.

“Tendo sido, pois, justificado pela fé, temos paz com Deus, por nosso Senhor Jesus Cristo; Pelo qual também temos entrada pela fé, a esta graça, na qual estamos firmes, e nos gloriamos na esperança da glória de Deus. E não somente isso, mas também nos gloriamos nas tribulações; sabendo que a tribulação produz a paciência, e a paciência, a experiência, e a experiência, a esperança.” (Romanos, 5:1-5)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento da análise de biomassa microbiana a partir do método da Fumigação-extração e análise da atividade microbiana pela liberação de CO ₂ (Vance et al., 1987)	11
Figura 2: Modo de preparo das amostras determinação do C microbiano	14
Figura 3: Procedimento para preparo da curva padrão de ácido oxálico.....	15
Figura 4: Modo de preparo da solução para a determinação do N-ninidrina.....	16
Figura 5: Teores de C orgânico (a) e N total (b), em solos sob diferentes sítios florestais	20
Figura 6: Carbono da biomassa microbiana do solo; Nitrogênio da biomassa microbiana do solo.....	21
Figura 7: Respiração microbiana acumulada no período de sete dias (c), em solos sob diferentes sítios florestais	22
Figura 8: alfa-aminoácido	23
Figura 9: Parte de uma molécula de proteína.....	23
Figura 10: Equilíbrio entre as formas catiônicas e Aniônicas dos aminoácidos.....	24
Figura 11: Reação com ninidrina e hidridantina proposta por Mahler e Cordes.....	27
Figura 12: Mecanismo I (reação com ninidrina e hidridantina).....	27
Figura 13: Mecanismo II (reação com ninidrina e hidridantina).....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais classes de compostos contendo carbono.....	4
Quadro 2: Equipamentos utilizados para a análise química e da biomassa microbiana.....	7
Quadro 3: Volumes da solução de leucina ($2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) a serem pipetados para construção da curva padrão e concentrações obtidas	16
Quadro 4: Caracterização química do solo sob diferentes sítios florestais.	22

LISTA DE ABREVIATURAS

CFC – Clorofluorcarbono

DMSO – Dimetilsulfóxido

ST– Solução Trabalho

TFSA – Terra Fria Seca ao Ar

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
SUMÁRIO.....	1
RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Formação e conservação do solo	4
2.2. Biomassa Microbiana e Qualidade do Solo	5
2.3. Atividade Microbiana.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Técnicas empregadas.....	8
3.2. Reagentes utilizados.....	8
3.2.1. Análise de Carbono Microbiano	8
3.2.2. Análise de Nitrogênio Microbiano	9
3.2.3. Análise de Atividade Microbiana	9
3.3. Caracterização das áreas e coleta do solo	10
3.4. Análise da Biomassa Microbiana	10
3.4.1. Pré-tratamento e tratamento das amostras.....	10
3.4.1.1. Determinação da capacidade de saturação do solo	11
3.4.1.2. Purificação do Clorofórmio	12
3.4.2. Método da Fumigação-Extração	13
3.4.3. Determinação do C microbiano por oxidação com permanganato de potássio	13
3.4.3.1. Preparo das amostras	13

3.4.3.2. Curva padrão.....	14
3.4.4. Determinação do N microbiano (N-ninidrina)	15
3.4.4.1. Curva padrão.....	15
3.4.5. Determinação da Atividade Microbiana (respiração acumulada)	16
3.5. Análise Química do Solo.....	17
3.5.1. Fósforo (P), potássio (K) e sódio (Na)	17
3.5.1.1. Análise de fósforo.....	17
3.5.1.2. Análise de potássio e sódio	17
3.5.2. Cálcio, magnésio trocáveis e alumínio.....	18
3.5.2.1. Análise de cálcio e magnésio	18
3.5.2.2. Análise de alumínio	18
3.5.3. Análise de carbono orgânico.....	18
3.5.4. Análise de nitrogênio total pelo método Kjeldahl.....	19
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	20
4.1. Considerações sobre os métodos utilizados nas análises da biomassa microbiana	23
4.1.1. Fumigação-extração	23
4.1.2. Determinação do C microbiano: Método da oxidação	24
4.1.2.1. Cálculo do C da biomassa microbiana	26
4.1.3. Determinação do N microbiano: Método N-ninidrina	26
4.1.3.1. Cálculo do N da biomassa microbiana	29
4.1.4. Método da Atividade Microbiana.....	30
4.1.4.1. Cálculo da Atividade microbiana do solo	31
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera e o conseqüente aquecimento global (ou efeito estufa) vêm gerando um avanço nos estudos que objetivam minimizar este grave impacto ambiental.

Sabe-se que o carbono é o principal responsável por este efeito e está presente em todas as partes do planeta, como nos oceanos, lagos, atmosfera, rochas, biota e principalmente no solo. Outros elementos como o nitrogênio, enxofre e fósforo fazem parte desta composição. Segundo Joergensen et al. (1990); Grace e Grisi (1992) mostram que a biomassa microbiana do solo libera significativa quantidade de CO₂ para a atmosfera. Este fato é influenciado quantitativamente, pelas diferenças entre os ecossistemas (coberturas vegetais e manejo do solo).

Dentre os métodos propostos para a quantificação da biomassa microbiana, o utilizado neste trabalho é o da Fumigação-Extração, apontado pelos pesquisadores como sendo o mais prático e eficiente.

Este trabalho teve como objetivo descrever com mais detalhes este método, determinando o carbono oxidado pelo permanganato de potássio e o nitrogênio-ninidrina e associando-os com a atividade microbiana, carbono orgânico e nitrogênio total. Foram utilizados para determinação, solos sob diferentes coberturas vegetais, coletado no Parque Estadual do Desengano, situado entre os municípios de Santa Maria Madalena, São Fidélis e Campos dos Goytacazes.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos o aumento da temperatura do planeta tem sido tema de vários debates. A maior concentração de CO₂ (dióxido de carbono) na atmosfera produzido pela queima de combustíveis como petróleo e carvão mineral, por exemplo, é o principal responsável por este fenômeno além de gases, como o CH₄ (metano), CFC (clorofluorcarbono), N₂O (óxido nitroso). Uma maneira de se evitar a emissão de carbono e diminuir o efeito estufa é o uso do solo de forma adequada, evitando-se, por exemplo, as queimadas e os manejos agrícolas impróprios, colaborando para a manutenção do estoque de carbono no solo (Grace e Grisi, 1992).

A maior fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes do solo são encontrados na matéria orgânica, que é formada principalmente pelos restos de vegetais e animais. Este material acumulado sobre o solo torna-se fonte de energia e de nutrientes para o desenvolvimento da fauna e microrganismos que atuam na sua decomposição.

A biomassa microbiana é o agente de decomposição da matéria orgânica e durante este processo disponibiliza nutrientes, como C, N, P, K e S, que poderão ser utilizados pelas plantas e pela biota do solo, exercendo assim um importante papel na fertilidade do solo. O acúmulo e os produtos resultantes da transformação da matéria orgânica por este processo melhoram as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Young, 1989).

Como a produtividade dos ecossistemas naturais depende da ciclagem de nutrientes contidos nos vegetais e na matéria orgânica do solo, estimativas da biomassa microbiana possibilitam estudos comparativos de diferentes coberturas vegetais em sistemas naturais e nos alterados pelos homens.

Diversos métodos podem ser utilizados para mensurações gerais da biomassa microbiana (De-Polli e Guerra, 1999). Contudo, para avaliar a sua função na dinâmica da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, é essencial uma medida direta da quantidade de C e nutrientes imobilizados pelos microrganismos. Atualmente, as metodologias disponíveis têm sido utilizadas para determinação do C, N, P e S microbiano do solo em ecossistemas agrícolas, pastagens e florestas (Gama-Rodrigues, 1999).

Dentre os métodos mais utilizados para determinação do C e N da biomassa microbiana, destacam-se: os de clorofórmio-fumigação-incubação (Jenkinson e Powlson, 1976a, b) e de clorofórmio-fumigação-extração (Vance et al., 1987; Tate et al., 1988), baseados na esterilização parcial (fumigação) de amostras de solos com clorofórmio. O segundo método foi proposto com o objetivo de superar algumas limitações do primeiro, nele a determinação é feita a partir da extração do C e N das amostras fumigadas e não fumigadas. Gama-Rodrigues et al. (1994), realizaram em solos de Itaguaí (RJ), comparações entre os dois métodos e obtiveram maior precisão com o método da fumigação-extração.

Este trabalho tem como objetivo avaliar alterações na biomassa e atividade microbiana de solos sob diferentes coberturas vegetais e reunir informações mais detalhadas a respeito da metodologia empregada para obter esses resultados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formação e conservação do solo

Os solos são constituídos de quatro componentes principais: partículas minerais; materiais orgânicos; água e ar, os quais estão normalmente tão misturados que sua separação só pode ser feita em laboratório, por métodos específicos.

As partículas minerais, juntamente com os materiais orgânicos, formam a fase sólida de um determinado solo e suas proporções são relativamente fixas. A quantidade dos materiais orgânicos pode variar tanto entre um tipo de solo e outro, como entre horizontes de um mesmo perfil. Normalmente, maiores teores desses materiais são encontrados nos horizontes mais superficiais.

De acordo com Manahan (1994), as principais classes de compostos orgânicos presentes no solo são: húmus, ácidos graxos, sacarídeos, moléculas de N e compostos contendo P; que apresentam composição diferenciada (Quadro 1).

Quadro 1. Principais classes de compostos orgânicos presentes no solo

Tipos de compostos	Composição	Significado
Húmus	Resíduo de plantas resistentes a degradação, principalmente C, H e O	Componentes orgânicos mais abundantes, melhora a propriedade física do solo; troca de nutrientes, reservatórios de N fixo.
Ácido graxo, Resinas e Ceras	Lipídios	Em geral uma pequena percentagem da matéria orgânica do solo pode, desfavoravelmente, afetar as propriedades físicas pela sua característica hidrofóbica..
Sacarídeos	Celulose, amidos, hemicelulose, gomas	Principal fonte de alimento para os microorganismos do solo, auxilia na estabilização dos agregados do solo.
Moléculas contendo Nitrogênio (N)	Nitrogênio ligado ao húmus, aminoácidos, amino-açúcares, outros compostos	Produz nitrogênio para fertilidade do solo
Compostos com fósforo (P)	Ésteres de fosfato, fosfato de inositol (ácido fítico), fosfolipídeos	Fontes de fosfatos para as plantas.

Fonte: Manahan (1994)

No solo, entremeando-se aos materiais sólidos, encontram-se a água e o ar que ocupam o espaço poroso (também chamado de “vazio”). Suas proporções, ao contrário dos sólidos minerais e orgânicos, podem ter grandes variações em espaço de tempo relativamente pequeno. Logo após uma forte chuva, por exemplo, a quase totalidade dos poros estará preenchida com água, sendo mínima a quantidade de ar presente. Se a drenagem do terreno for boa, algumas horas após essa chuva, parte da água se infiltra e escorre em profundidade, voltando o ar a ocupar boa parte dos poros. Uma boa condição para as plantas é quando o ar e a água ocupam volumes iguais aos dos poros do solo (Lepsch, 2002).

2.2. Biomassa Microbiana e Qualidade do Solo

A biomassa microbiana é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo incluindo bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas e microfauna, excluindo-se raízes de plantas e animais do solo maiores do que $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, contendo em média de 2 a 5% de C total do solo (Jenkinson e Ladd, 1981) e 1 a 5% do N total do solo (Smith e Paul, 1990).

A biomassa microbiana do solo tem papel fundamental na manutenção e produtividade dos ecossistemas, sendo a principal responsável pela decomposição e mineralização de resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo sua influência tanto na transformação da matéria orgânica quanto na estocagem de carbono e nutrientes, regulando a taxa de decomposição e a ciclagem dos elementos (Jenkinson e Ladd, 1981). Diante disso, a biomassa e atividade microbiana têm sido propostas como bioindicadores dos níveis da matéria orgânica do solo ou como índice de qualidade do solo (Mele e Carter, 1993).

A determinação de propriedades, processos e características químicas, físicas e biológicas do solo relacionadas a sua funcionalidade, têm oferecido uma maneira indireta de medir a qualidade do solo, servindo não apenas como indicadores de qualidade, mas também para o monitoramento de mudanças no ambiente edáfico (Reinert, 1998; Sans, 2000).

De maneira geral, é possível obter informações bastante detalhadas sobre propriedades químicas e físicas do solo, enquanto que

o aspecto biológico é pouco conhecido (D'Andréa et al., 2002). No entanto, a mensuração da biomassa microbiana do solo fornece uma indicação antecipada dos efeitos das diferentes práticas de manejo e ajuda na interpretação dos impactos em longo prazo na matéria orgânica total do solo (Mendham et al., 2002)

A quantificação da biomassa microbiana não deve ser considerada apenas como mais um atributo pontual de fertilidade do solo. Ao contrário, deve estar associada à atividade microbiana (CO₂ liberado e atributos químicos, tais como C orgânico e N total (Monteiro e Gama-Rodrigues, 2004). Assim, permite-se a obtenção de índices de aferição da sustentabilidade dos ecossistemas e o entendimento da fertilidade do solo como um processo dinâmico.

2.3. Atividade Microbiana

As determinações da biomassa não fornecem indicações sobre os níveis de atividade das populações microbianas do solo. Sendo assim, é importante também avaliar parâmetros que estimem a atividade microbiana.

A atividade dos microrganismos é, geralmente, medida em termos metabólicos, através dos indicadores de CO₂ liberado, O₂ absorvido, atividades enzimáticas e caloríficas, N, P, S mineralizados (Grisi, 1995). O termo respiração do solo é definido como a absorção de O₂ e/ou a liberação de CO₂ pelas entidades vivas e metabolizantes do solo. Já a respiração microbiana é definida como a absorção de O₂ ou liberação de CO₂ pelas bactérias, fungos, algas e protozoários no solo, incluindo as trocas de gases que resultam de ambos os metabólicos aeróbio e anaeróbio (Anderson, 1982). A vantagem de se medir CO₂, ao invés de O₂, é que o CO₂ reflete a atividade, tanto de microrganismos aeróbios quanto de anaeróbios. Portanto, a vantagem em se medir o CO₂ total do sistema está em avaliar a atividade tanto de organismos aeróbios quanto anaeróbios presentes no solo.

Na avaliação da atividade heterotrófica a partir da liberação de C-CO₂, a quantidade de C liberado é indicativo do carbono lábil ou prontamente metabolizável do solo (Doran e Parkin, 1996).

A interpretação dos resultados da atividade microbiana deve ser feita com critério, uma vez que elevados valores de respiração nem sempre indicam condições desejáveis: uma alta taxa de respiração pode significar, em curto prazo, liberação de

nutrientes e, em longo prazo, perda de carbono orgânico do solo para a atmosfera (Parkin et al., 1996).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Técnicas empregadas

Todas as reações foram conduzidas utilizando-se vidrarias de uso comum em laboratório (funil de separação, balões volumétricos, pipetas automáticas, vidros de snap-cap, funis e tubos de ensaio de 15 mL). Os aparelhos utilizados nas diferentes determinações com os respectivos modelos e marcas são listados no Quadro 2.

Quadro 2. Equipamentos utilizados nas determinações químicas e da biomassa microbiana

Aparelho	Modelo	Marca
Agitador de tubos	-	Quimis
pH-metro	B474	Micronal
Absorção atômica	AA 6200	Shimadzu
Fotômetro de chama	-	Análises
Balança analítica	-	Marconi
Espectrofotômetro	U2000	Hitachi

3.2. Reagentes utilizados

Os reagentes empregados em cada uma das análises de biomassa e atividade microbiana são listados nos tópicos a seguir. Os reagentes de grau PA utilizados foram adquiridos de fontes comerciais Merck, Sigma e Vetec.

3.2.1. Análise de Carbono Microbiano

- 1) Sulfato de potássio (K_2SO_4) a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH entre 6,5 e 6,8
- 2) Solução trabalho (ST)
 - 2a) 300 mL de pirofosfato de sódio ($Na_4P_2O_7$) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
 - 2b) 46 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$
 - 2c)* 20 mL de permanganato de potássio ($KMnO_4$) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
 - 2d)* 80 mL de sulfato de manganês mono hidratado ($MnSO_4.H_2O$) a 1 mol L^{-1}

Na preparação da solução trabalho, os reagentes foram adicionados a um balão volumétrico na seqüência descrita acima. A adição do sulfato de manganês deve ser lenta, homogeneizando-se a mistura para evitar a formação de precipitado. Após esta etapa, completou-se o volume com água deionizada até o total de 1000 mL. A solução foi, então, reservada em vidro escuro, envolto por papel alumínio, visando evitar a incidência de luz.

3) Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

4) Solução padrão (para o preparo da curva de calibração) de carbono – ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 500 mol L^{-1}

*Estes reagentes foram preparados no momento da determinação para garantir maior precisão dos resultados

3.2.2. Análise de Nitrogênio Microbiano

1) Reagente de Ninidrina – 200 mL

1a) 4g de ninidrina ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$)

1b) 0,6g de hidridantina ($\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1c) 150 mL de Dimetilsulfóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)

1d)* 50 mL de acetato de lítio ($\text{C}_6\text{H}_3\text{LiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4 mol L^{-1} pH 5,2

2)*Ácido cítrico tampão a pH 5,0 – 200 mL

2a) 8,4g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

2b) 3,2g de NaOH

3) Álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) a 50%

4) Curva padrão de isoleucina ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$) a $2 \mu\text{mol L}^{-1}$

1 mol – 131,17g

2 mmol – 0,262g

2000 μmol – 0,262g

*Estes reagentes foram preparados no momento da determinação para garantir maior precisão nos resultados

3.2.3. Análise de Atividade Microbiana

1) Hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L^{-1}

2) Cloreto de bário (BaCl_2) 10%

3) Fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$) 1%

4) Ácido clorídrico (HCl) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$

3.3. Caracterização das áreas e coleta do solo

A área em estudo pertence ao Parque Estadual do desengano, compreendendo aproximadamente 25.000 ha. Situa-se entre os municípios de Santa Maria Madalena, São Fidélis e Campos dos Goytacazes. As amostras de solo foram coletadas em três segmentos florestais (mata preservada, mata não preservada e capoeira), pasto e plantação de eucalipto, no município de Santa Maria Madalena (RJ). Para cada parcela de 1000 m², foram estabelecidas quatro parcelas (20 x 25m) permanentes por área, para amostragem do solo. Nestas, foram coletadas 30 amostras simples de solo para formar uma amostra composta, da camada de 0-10cm.

As coletas foram realizadas de modo a garantir a representatividade da área. As amostras que não foram analisadas logo após a coleta, ficaram armazenadas a temperatura de 4°C (Wardle, 1992).

3.4. Análise da Biomassa Microbiana

3.4.1. Pré-tratamento e tratamento das amostras

O fluxograma apresentado na Figura 1 ilustra cada uma das etapas do pré-tratamento e tratamento das amostras de solo. Os solos foram homogeneizados e peneirados em uma malha de 2 mm. Após o peneiramento, foram retiradas as raízes e os restos visíveis das plantas e animais do solo. As amostras foram incubadas por um período de 5 a 7 dias em um ambiente vedado contendo hidróxido de sódio e outro com água (pré-incubação).

Neste mesmo dia, pesou-se cerca de 30g da amostra, anotou-se o valor exato, e levou-se para estufa a temperatura constante de 105°C por mais de 24 horas. Calculou-se a umidade atual a partir dos dados de peso antes e depois da estufa.

Decorrido o período da pré-incubação pesou-se 500g das amostras que foram transferidas para recipientes vedados e padronizou-se a umidade para 40% da capacidade de saturação, com o auxílio de um borrifador. A capacidade de saturação e a quantidade de água a ser adicionada ao solo foram determinadas

conforme procedimento descrito no item 3.4.1.1. No dia em que se pesou as amostras, determinou-se também a umidade atual após a saturação do solo.

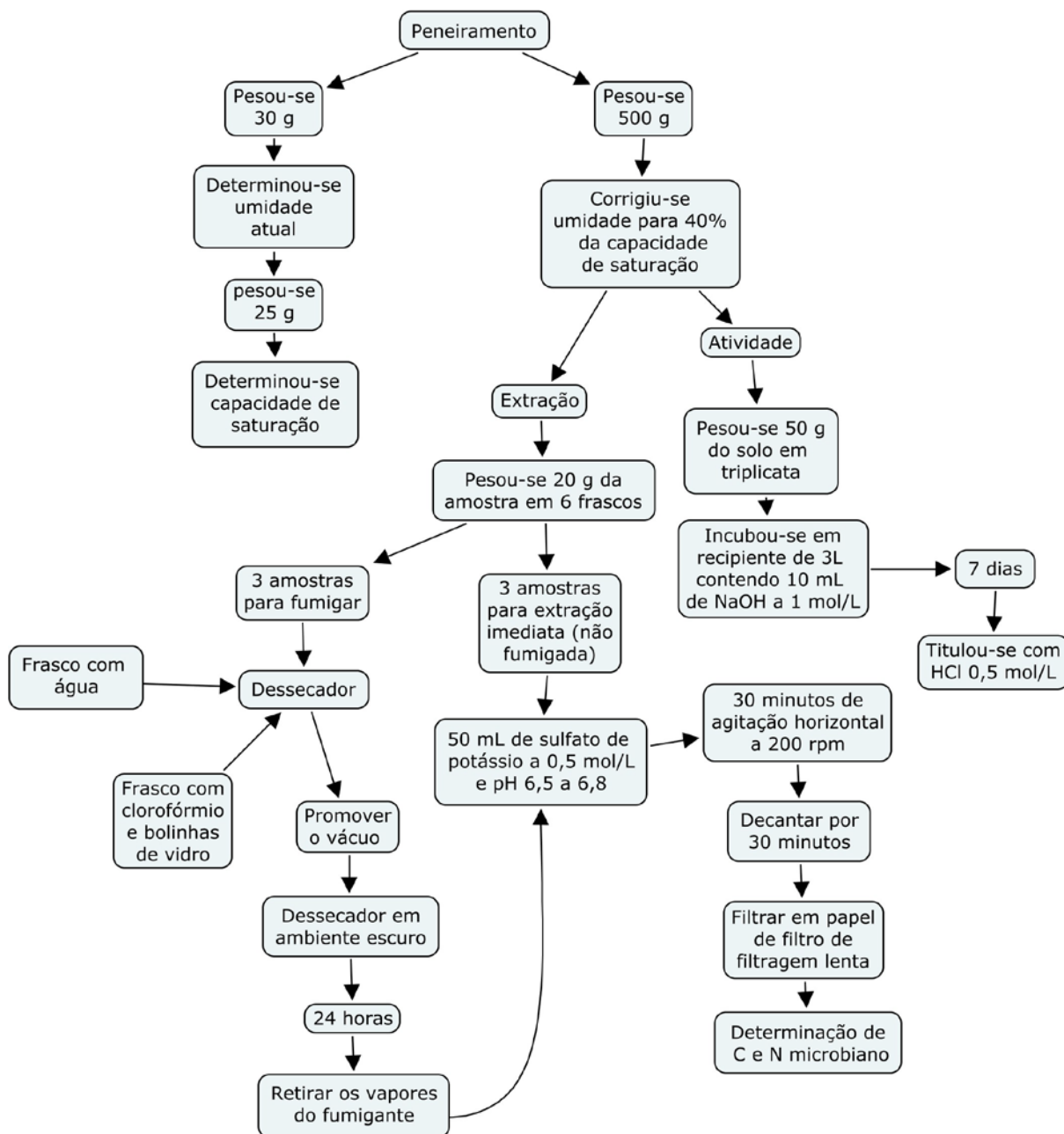


Figura 1: Procedimento da análise de biomassa microbiana a partir do método da Fumigação-extração e análise da atividade microbiana pela liberação de CO₂

3.4.1.1. Determinação da capacidade de saturação do solo

Secou-se um cadinho de Gooch (com poros de porcelana com diâmetros de 10 μm) em estufa a 105°C, deixando-se resfriar em dessecador e pesando-se (peso A) em seguida. Mergulhou-se o cadinho em água para saturar o filtro de porcelana,

removendo-se o excesso de água do vidro usando um papel absorvente. Então, o cadinho com filtro umedecido foi pesado (peso B).

Adicionou-se ao cadinho com filtro umedecido 25g de solo previamente seco em estufa a 105°C. O solo sobre o cadinho deve ser nivelado. A parte inferior do cadinho foi mergulhada em um Becker com água, até a cobertura do filtro. É importante evitar que se forme bolha de ar na água por baixo do filtro de porcelana.

O cadinho permaneceu imerso por duas horas. Terminado este tempo o cadinho foi removido do Becker, as partes de vidro foram secas com papel absorvente, e foi pesado (peso C). Levou-se o cadinho à estufa a temperatura de 105°C, durante um mínimo de 6 horas. Após o término do tempo, resfriou-se o cadinho em dessecador, até que atingisse a temperatura ambiente, pesando-o novamente (peso D).

Calculou-se a capacidade de saturação da seguinte maneira:

$C - B = (\text{solo saturado})$ $D - A = (\text{solo seco})$ <p>Quantidade de água (retida em 25g de solo, em gramas) = (Solo saturado) – (solo seco)</p>
--

A padronização da umidade em 40% viabiliza a utilização do método entre solos com diferentes umidades.

O método fumigação-extração (FE) se baseia na ação de um fumigante (clorofórmio purificado – isento de álcool) sobre a biomassa microbiana do solo. A seguir é descrito o procedimento de purificação do clorofórmio.

3.4.1.2. Purificação do Clorofórmio

Em um funil de decantação com capacidade de 1000 mL adicionou-se 500mL CHCl_3 e 25mL de H_2SO_4 concentrado.

- Agitou-se a solução, despressurizando o funil periodicamente durante a agitação. Deixou-se em repouso, retirou-se o ácido e descartou.
- O mesmo procedimento foi feito após adição de 150mL água deionizada.
- Após separação das fases, retirou-se o clorofórmio repetiu-se o procedimento até as duas fases ficassem bem límpidas.
- Em seguida destilou-se o clorofórmio a 65°C

- Por fim, adicionou-se carbonato de potássio anidro para retirar água residual.

3.4.2. Método da Fumigação-Extração (Vance et al.1987)

No dia seguinte pesou-se 20g de solo (amostra feita em triplicata), sendo três para serem fumigadas e três para a extração imediata (não fumigadas) com 50 mL de sulfato de potássio a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH entre 6,5 e 6,8. Agitou-se por 30 minutos em aparelho de agitação circular a 200 rpm, em seguida deixou-se em repouso por trinta minutos. Após este período foi feita a filtração do sobrenadante em papel de filtragem lenta.

Colocou-se as amostras que foram fumigadas em um dessecador que continha um frasco com 10 mL de clorofórmio purificado e bolinhas de vidro e outro com água. O dessecador foi submetido a vácuo de 16pol Hg, observando se houve vaporização do clorofórmio. O dessecador foi mantido em ambiente escuro por vinte e quatro horas.

Após este período fez-se a aspiração sucessiva do dessecador com a bomba de vácuo, para que fosse retirado o excesso do clorofórmio, e os frascos de clorofórmio e de água foram retirados. Prosseguiu-se a extração com o sulfato de potássio das três sub-amostras fumigadas.

De posse dos extratos fumigados e não fumigados, procedeu-se a preparação das amostras (extratos) para a quantificação do carbono e do nitrogênio microbiano pelo método espectrofotométrico.

3.4.3. Determinação do C microbiano por oxidação com permanganato de potássio

3.4.3.1. Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado adicionando 2mL de extrato, 3mL de água deionizada, 2,5mL de solução trabalho (ST) e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado em tubos de ensaio de 15 mL, conforme o esquema apresentado na Figura 2.

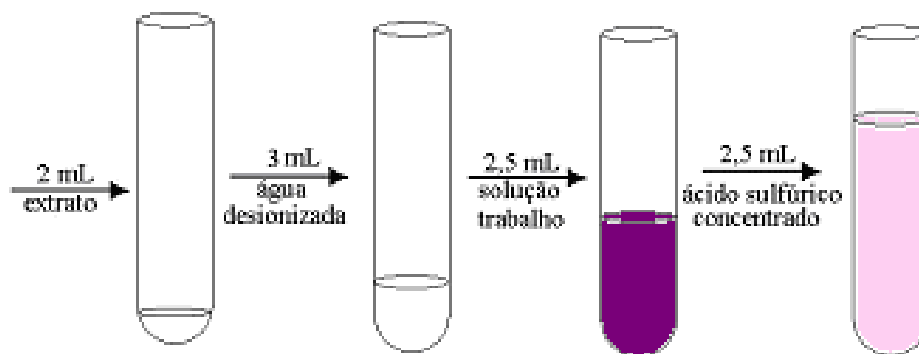


Figura 2: Modo de preparo das amostras determinação do C microbiano

3.4.3.2. Curva padrão

Para o preparo da solução padrão utilizou-se uma solução estoque de ácido oxálico 500 mg.L^{-1} que foi diluída para a concentração 60 mg L^{-1} . De acordo com o esquema da Figura 3, a partir desta solução, em tubos de ensaio de 15 mL, foram preparadas soluções com diferentes concentrações ($24, 18, 12, 6$ e 0 mg L^{-1}) para a obtenção da curva padrão.

Depois do preparo das amostras e da curva, os tubos de ensaio foram submetidos à agitação (vortéx). Após um intervalo de 18 horas procedeu-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 495 nm .

Como a reação é de oxi-redução, o aparelho deve ser zerado na concentração máxima da curva (24 mg L^{-1}). Acima desta concentração não se observa linearidade entre absorvância e concentração de C, conforme a lei de Lambert e Beer.

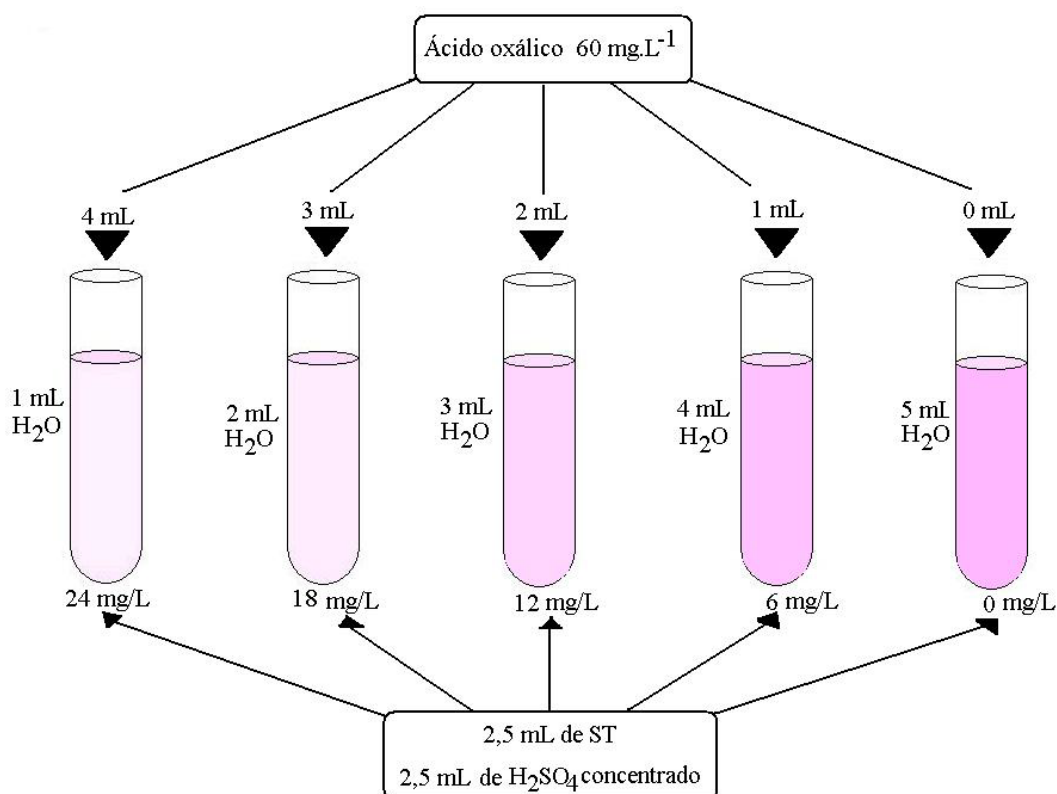


Figura 3: Procedimento para preparo da curva padrão de ácido oxálico

3.4.4. Determinação do N microbiano (N-ninidrina)

A determinação do N-ninidrina foi realizada a partir da adição do extrato 0,75 mL em tubos de ensaio de 15 mL, 1,75 mL de ácido cítrico tampão, 1,25 mL de reagente de ninidrina. O tubo de ensaio foi levado ao banho-maria por 25 minutos com temperatura constante de 100°C. Destaca-se a necessidade da utilização de um funil sobre o tubo de ensaio enquanto o mesmo permanecer no banho-maria. Após os 25 minutos, deixou-se esfriar a temperatura ambiente e adicionou-se 4,5 mL de etanol 50%. A Figura 4 ilustra este processo.

3.4.4.1. Curva padrão

Para o preparo da curva padrão utilizou-se diferentes volumes de uma solução de leucina (2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). O Quadro 3 descreve os volumes utilizados e as concentrações obtidas. Nos tubos de ensaio foram adicionados 0,75 mL destas concentrações e os demais reagentes como mostra a Figura 4.

Para o preparo do zero da curva (branco) foi utilizado 0,75 mL da solução de sulfato de potássio usado na extração do solo, em substituição a solução de leucina.

Quadro 3: Volumes da solução de leucina (2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a serem pipetados para construção da curva pa-drão e concentrações obtidas

Volume	Concentração / 100 mL
5 mL	100 μmol
10 mL	200 μmol
20 mL	400 μmol
40 mL	800 μmol
50 mL	1000 μmol

Obs: Após preparo, as soluções após devem ser guardadas em geladeira.

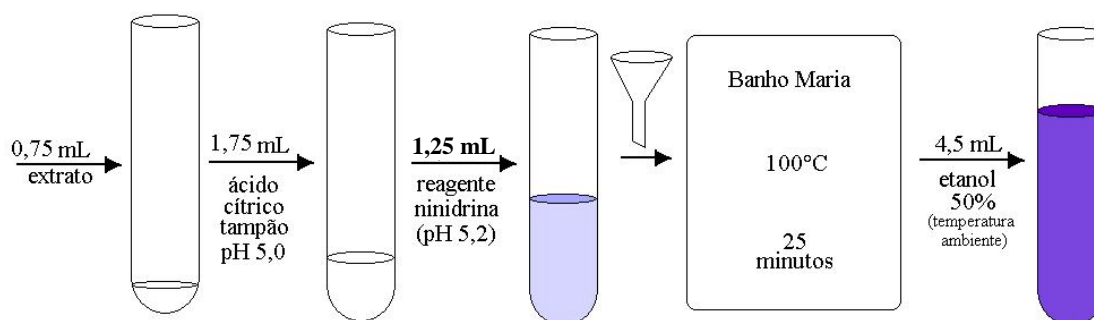


Figura 4: Modo de preparo da solução para a determinação do N-ninidrina

3.4.5. Determinação da Atividade Microbiana (respiração acumulada)

Pesou-se 50g de solo em frascos snap-cap (3 repetições) e incubou-se em recipientes de 3 litros contendo frascos com 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹. Recipientes contendo apenas frascos com 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ também foram incubados como brancos. Todos os recipientes foram hermeticamente fechados e após o período de incubação (7 dias) retirou-se o frasco contendo NaOH 1 mol L⁻¹, adicionando-se 2,0 mL de cloreto de bário (BaCl₂) e três gotas de fenolftaleína 1%. Rapidamente, após as adições procedeu-se a titulação com ácido clorídrico (HCl) 0,5 mol.L⁻¹ padronizado por uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ ou por uma solução de Tris hidroximetil amino-metano (Tham) 0,5 mol L⁻¹.

3.5. Análise Química do Solo

Para as análises químicas as amostras do solo foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas (2 mm).

3.5.1. Fósforo (P), potássio (K) e sódio (Na). (EMBRAPA, 1999)

O extrator químico utilizado para estas análises é denominado extrator de *Mehlich* ou “Carolina do Norte”, onde 1000 mL desta solução é formado por 0,69 mL de ácido clorídrico concentração $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e 4,1 mL de ácido sulfúrico com concentração $0,0125 \text{ mol.L}^{-1}$.

Colocou-se 10 cm^3 de TFSA (terra fria e seca ao ar) em erlenmeyer de 250 mL, e adicionou-se 100 mL do extrator de *Mehlich*. Agitou-se por 10 minutos, deixando em repouso por uma noite.

3.5.1.1. Análise de fósforo

Transferiu-se uma alíquota de 5 mL do extrato para um tubo de ensaio e adicionaram-se 3 mL de água deionizada, 1 mL de reagente sulfomolibídica e 1 mL de ácido ascórbico 0,8%. Após 20 minutos realizou-se a leitura no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 725 nm.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução 1000 mg/L de fósforo, utilizando o reagente fosfato monobásico de potássio.

3.5.1.2. Análise de potássio e sódio

A determinação foi feita diretamente no extrato usando o fotômetro de chama previamente calibrado com uma curva padrão de cloretos de sódio e potássio.

3.5.2. Cálcio, magnésio trocáveis e alumínio (Defelipo e Ribeiro, 1981)

Mediu-se 10 cm³ de TFSA e transferiu-se para erlenmeyer de 250 mL; adicionou-se solução extratora de cloreto de potássio 1 mol L⁻¹. Agitou-se por 10 minutos e, após uma noite de repouso.

3.5.2.1. Análise de cálcio e magnésio

Do extrato retirou-se uma alíquota de 0,5 mL do extrato para um tubo de ensaio de 20 mL juntamente com 9,4 mL de água deionizada e 0,1 mL de cloreto de lantânio 17,66% (para evitar compostos refratários). A leitura, para Ca e Mg, foi feita em aparelho de absorção atômica.

3.5.2.2. Análise de alumínio

Utilizou-se do mesmo extrato da análise anterior, 25 mL da solução extratora, adicionou-se 3 gotas do indicador azul de bromotimol. Titulou-se contra solução de hidróxido de sódio com concentração 0,025 mol.L⁻¹. A equivalência se deu na viragem da coloração amarela para a azul.

3.5.3. Análise de carbono orgânico (Anderson e Ingram, 1996)

Em tubo de ensaio para processo de digestão, foi pesado 0,5g de solo, adicionado 5 mL de dicromato de potássio com concentração 0,21 mol.L⁻¹ e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (deixando que este escorra lentamente pelas paredes do tubo de ensaio). Este processo foi realizado em capela de exaustão.

Adicionaram-se bolinhas de vidro no interior dos tubos de ensaio dos tubos de digestão para evitar um superaquecimento da solução e que a mesma transborde. Também utilizou-se, sobre cada tubo de ensaio, um dedo-frio (funil de refluxo) para que haja um refluxo na hora do aquecimento.

Fez-se a digestão por 1 hora utilizando bloco digestor à 150°C (período em que o cromo VI é reduzido à cromo III, adquirindo coloração verde). Após a digestão, e depois que a solução atingiu a temperatura ambiente, adicionou-se cloreto de bário

a 0,5% ao tubo de ensaio para precipitar o excesso de dicromato que não foi reduzido. Fez-se a leitura da solução utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda 600 nm.

3.5.4. Análise de nitrogênio total pelo método Kjeldahl

Em um tubo de digestão, pesou-se 1g de amostra de solo, adicionou-se ao mesmo uma medida de aproximadamente 0,5g de mistura catalisadora* e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Levou-se o tubo para o bloco digestor mantido dentro da capela, o sistema teve sua temperatura elevada gradualmente até 350°C e mantida nestas condições por período de uma hora. Depois de esfriar e atingir a temperatura ambiente adicionou-se 50 mL de água deionizada. Homogeneizou-se e utilizou-se uma alíquota de 20 mL que foi levado ao analisador automático Kjeldahl, que foi programado para adicionar 20 mL de hidróxido de sódio 40% e 10 mL de água deionizada. Iniciou-se a destilação.

O destilado foi titulado com solução padronizada de ácido clorídrico de 0,05 mol.L⁻¹ e 30 mL de indicador de ácido bórico.

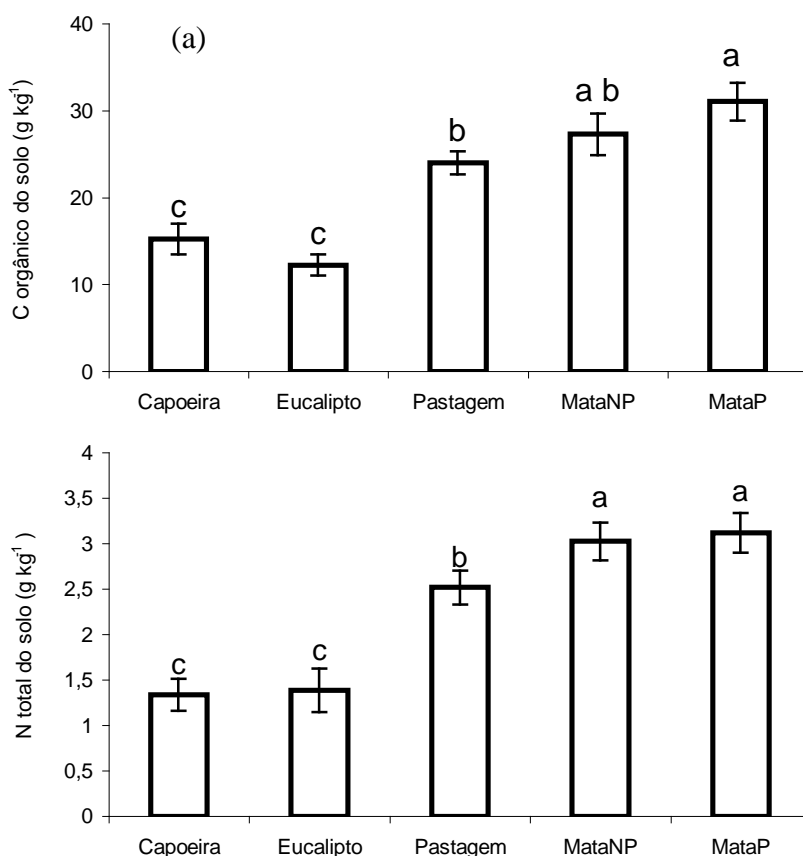
*** Mistura catalisadora**

Macerou-se, em almofariz, 100g de sulfato de sódio ou sulfato de potássio, 10g de sulfato de cobre penta-hidratado e 1g de selênio. Os reagentes foram homogeneizados.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema inteiramente casualizado com comparação de médias pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Foram estabelecidas correlações de Pearson a 5% de probabilidade entre as variáveis do solo.

Os solos sob mata não-preserveda e preservada (MATANP e MATAP, respectivamente) apresentaram significativamente maiores valores de C orgânico e N total (Figura 5). A pastagem apresentou valor intermediário para N total e para o C orgânico que não diferiu da mata não-preserveda. A capoeira e o eucalipto não diferiram entre si e apresentaram valores estatisticamente menores para estes dois nutrientes (Figura 5).

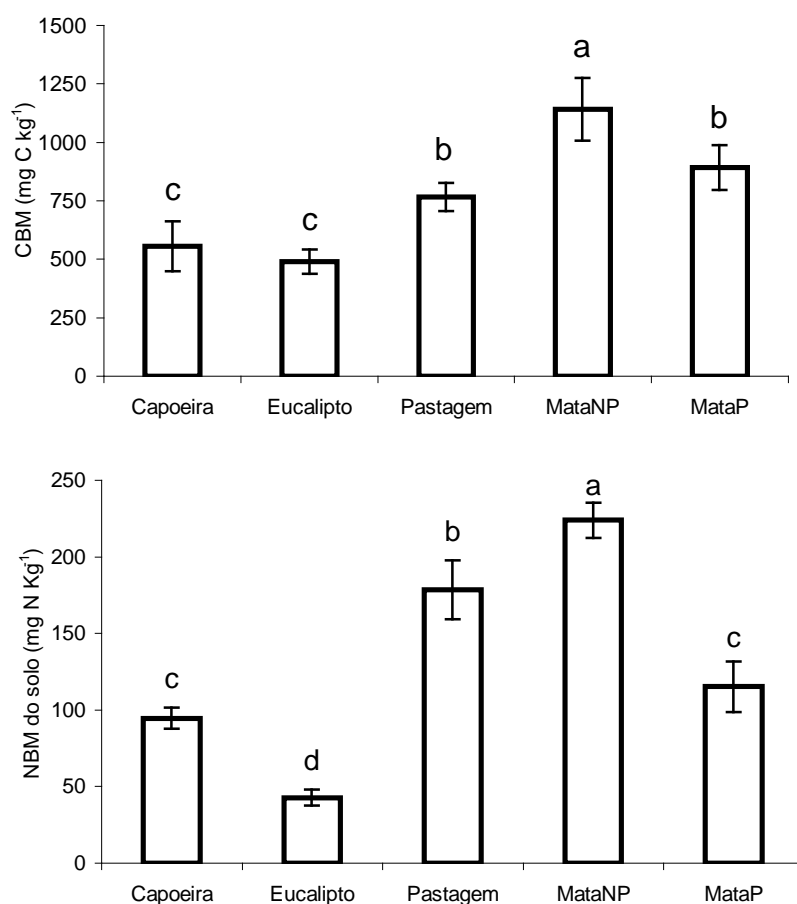


* MATANP: Mata não-preserveda; MATAP: Mata preservada;

** (± intervalo de confiança; médias seguidas por uma mesma letra são iguais entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade)

Figura 5: Teores de C orgânico (a) e N total (b), em solos sob diferentes sítios florestais

O carbono e nitrogênio da biomassa microbiana do solo (CBMS e NBMS, respectivamente) apresentaram em média maiores valores, na mata não-preserveda, diferindo significativamente dos demais sítios. A pastagem e a mata preservada apresentaram valores intermediários para CBMS não diferindo entre si. Para NBMS o valor intermediário foi para a pastagem. A capoeira e a mata preservada apresentaram valores significativamente inferiores, não diferindo entre si e o eucalipto o menor valor (Figura 6).



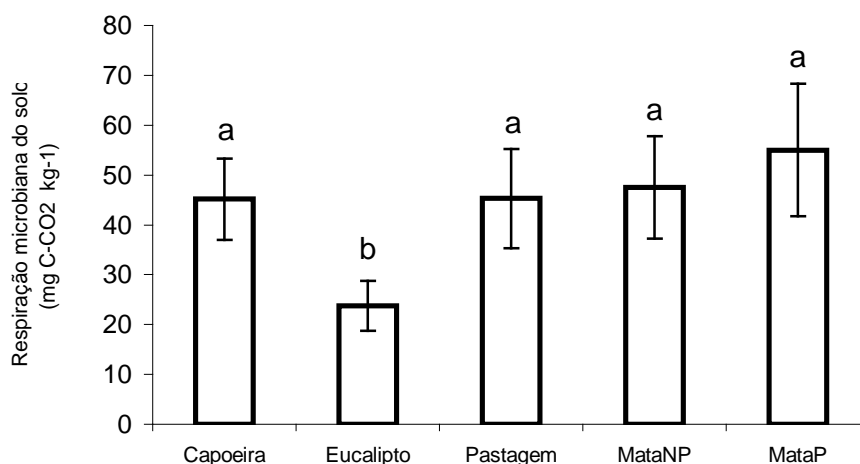
* MataNP: Mata não-preserveda; MataP: Mata preservada

** (\pm intervalo de confiança; médias seguidas por uma mesma letra são iguais entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade).

Figura 6: Carbono da biomassa microbiana do solo; Nitrogênio da biomassa microbiana do solo

A respiração acumulada do solo (RAS) foi significativamente menor no solo sob eucalipto e os demais sítios não diferiram entre si (Figura 7). O CBMS, NBMS e RAS correlacionaram-se significativamente com o C orgânico ($r = 0,79^{**}$; $r = 0,67^{**}$; $r =$

0,63**, respectivamente) e N total do solo ($r = 0,81^{**}$; $r = 0,70^{**}$; $r = 0,56^*$, respectivamente), demonstrando a importância destes nutrientes para a ação da microbiota do solo. O CBM e NBM do solo correlacionaram-se positivamente ($r = 0,81^{**}$), indicando que estes nutrientes foram quantificados do mesmo compartimento do solo. A RAS correlacionou-se positivamente com CBMS ($r = 0,50^*$) e NBMS ($r = 0,45^*$), sugerindo que a maior atividade da biomassa microbiana está refletindo o incremento do C e N da biomassa microbiana.



* MataNP: Mata não-preservada; MataP: Mata preservada

** (\pm intervalo de confiança; médias seguidas por uma mesma letra são iguais entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade).

Figura 7: Respiração microbiana acumulada no período de sete dias (c), em solos sob diferentes sítios florestais

Quadro 4: Caracterização química do solo sob diferentes sítios florestais.

SÍTIOS*	pH	K	Ca	Mg	Al	C	N	P
		mmol/dm ³				g/kg		mg/dm ³
MATA P	3,6	1,02	1,0	1,66	29	31	3	2,168
MATA NP	4,1	2,04	2,5	3,33	22	27	3	4,704
CAPOEIRA	4,1	1,56	2,5	2,5	14	15	1	1,412
EUCALIPTO	4,2	3,06	5,5	6,66	10	12	1	1,788
PASTAGEM	4,4	5,11	13	8,33	9	24	2,5	1,640

*MATA P: Mata preservada; MATA NP: Mata não-preservada

4.1. Considerações sobre os métodos utilizados nas análises da biomassa microbiana

4.1.1. Fumigação-extração (Vance et al., 1987)

Esta metodologia analisa biomassa microbiana extraível em solução aquosa de sulfato de potássio a 0,5 mol L⁻¹. A fumigação do solo com o clorofórmio, além de destruir, rompe as células microbianas, liberando o constituinte microbiano, principalmente do citoplasma, para o solo (Powlson e Jenkinson, 1976), tornando-os extraíveis por vários reagentes (Joergensen e Brookes, 1990).

O uso do clorofórmio como fumigante, em comparação a outros fumigantes comerciais, é recomendado por ser o mais fácil de ser removido do solo após a fumigação (Jenkinson e Powlson, 1976).

As células de todos os organismos vivos são constituídas por substâncias inorgânicas, e por substâncias orgânicas, como carboidratos e proteínas. Os quatro elementos mais abundantes na composição dos organismos são: H, C, N e O (Lehninger, et al., 1995).

As proteínas são constituídas por longas cadeias de α -aminoácidos (Figura 8) unidos por ligações peptídicas (amida) com um grupo amina contendo N carregado positivamente em uma extremidade e um grupo carboxila carregado negativamente na outra extremidade. A cadeia é composta de uma série de grupos laterais diferentes que corresponde a cada um dos 20 aminoácidos (Figura 9) (Campbell, 2000).

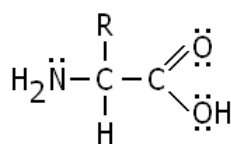


Figura 8: alfa-aminoácido

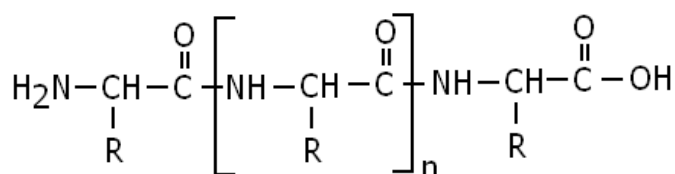


Figura 9: Parte de uma molécula de proteína

Em estado sólido, seco, os aminoácidos existem como íons dipolares, uma forma em que o grupo carboxila se apresenta como íon carboxilato ($-\text{CO}_2^-$), e o grupo amina como íon amínio ($-\text{NH}_3^+$). Em solução aquosa existe equilíbrio entre o íon dipolar e as formas aniônicas e catiônicas do aminoácido (Figura 10).

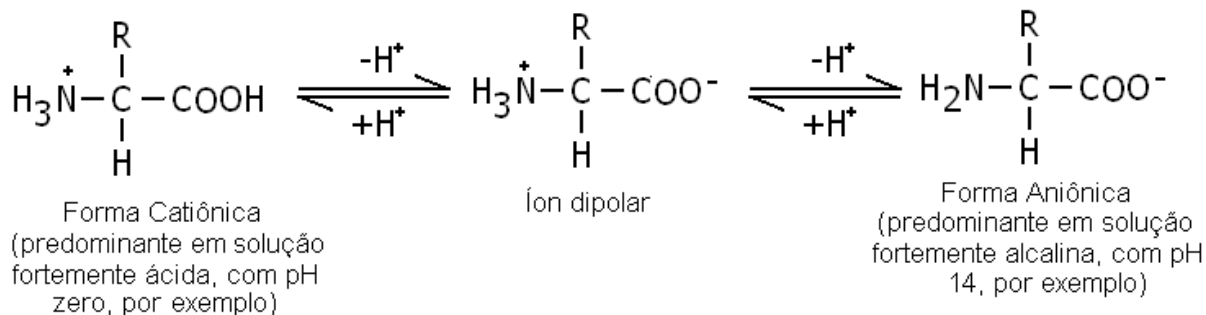


Figura 10: Equilíbrio entre as formas catiônicas e Aniônicas dos aminoácidos

A hidrólise ácida ou alcalina das proteínas leva a mistura de diferentes aminoácidos que contem um grupo básico ($-\text{NH}_2$) e um grupo ácido ($-\text{CO}_2\text{H}$).

A forma do aminoácido predominante numa solução depende do pH da solução e da natureza do aminoácido. Em soluções ácidas, todos os aminoácidos estão presentes como cátions. Dessa forma, as soluções utilizadas na determinação do N-ninidrina são ajustadas a pH ácido com o objetivo de tornar disponível o íon amínio ($-\text{NH}_3^+$) (carga positiva) que reagirá com a ninidrina formando um complexo. Tal reação será descrita em mais detalhes a seguir, no tópico 4.1.3.

Já em soluções fortemente alcalinas, os aminoácidos estão presentes como ânions. Em um certo pH intermediário, o chamado Ponto Isoeletrônico (pI), a concentração do íon dipolar é máxima e as concentrações dos ânions e cátions são iguais, sendo, portanto a carga líquida zero. Este comportamento é bastante utilizado para separação de aminoácidos e proteínas (Palleros, 1999).

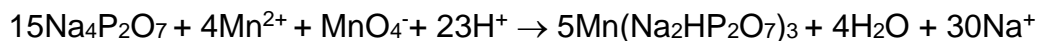
4.1.2. Determinação do C microbiano: Método da oxidação

Trata-se de um simples e sensível método utilizado para determinar colorimetricamente o carbono orgânico oxidado em soluções ácidas de solo. O método é aplicado para 1 mL da amostra contendo 0,08 a 4 μmol de C orgânico praticamente livre de interferências em soluções aeróbicas.

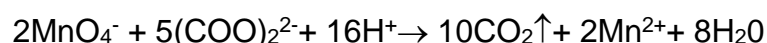
Dion e Mann (1946) demonstraram que um complexo formado pelo Manganês (III) com extrato de solo contendo fosfato, ou especialmente pirofosfato, fornecem uma determinada cor. Este complexo, de cor rosa violeta é estável em solução de pH abaixo de 7. A oxidação orgânica é feita com adição de um ácido forte, resultando imediatamente na alteração desta cor, passando a uma cor rósea. Acompanhado da oxidação do carbono orgânico, o Mn(III) é reduzido. A Medida desta cor é a base para o método proposto. Este método não requer aparelho sofisticado e torna possível a leitura de amostra de solo com baixo concentração de carbono.

Deve-se tomar um cuidado especial na preparação da solução oxidante (solução trabalho). Essa solução pode ser utilizada por algumas semanas quando mantida protegida da luz, como exemplo, pode armazenada em vidro escuro envolvido por papel laminado.

Dion e Mann (1946) desenvolveram uma equação hipotética para explicar a estequiometria da formação do complexo e calcular a quantidade de ácido necessária para prevenir uma precipitação:



A curva preparada com ácido oxálico (padrão primário de carbono) na presença de ácido sulfúrico concentrado, produz dióxido de carbono, conforme descrito na equação abaixo:



Estas reações ocorrem lentamente a temperatura ambiente, sendo esta a razão de se esperar por um período de 18 horas.

Os íons Mn (II) catalizam a reação. Assim a reação é autocatalítica, uma vez que os íons Mn (II) são formados ela se torna cada vez mais rápida.

Há situações em que a solução perde toda cor rosa. Tal resultado indica que a concentração de C na solução está muito alta, sendo necessário fazer uma diluição.

4.1.2.1. Cálculo do C da biomassa microbiana

I. Cálculo do fluxo de carbono

O fluxo de C extraído das amostras de solo fumigadas e não fumigadas foi obtido a partir da aplicação da fórmula:

$$C (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs} - a/b) * V/P * f$$

Onde,

Abs= absorvância da amostra analisada em expetrofotômetro;

a= intercepto da reta encontrada na curva padrão;

b= coeficiente de declividade da reta;

V= volume usado na extração;

P= peso seco do solo;

f= fator de diluição.

II. Cálculo do C da biomassa microbiana

O cálculo do C da biomassa microbiana foi, então, desenvolvido a partir dos valores de fluxo de C obtidos que foram substituídos na fórmula abaixo:

$$CBM = (F_{EC} - NF_{EC}) \mu\text{g/mL de C/gde solo}$$

Onde,

F_{EC} = fluxo de C extraído das amostras fumigadas

NF_{EC} = fluxo de C extraído das amostras não fumigadas

4.1.3. Determinação do N microbiano: Método N-ninidrina

A ninidrina é um oxidante energético que, por uma desaminação oxidativa dos aminoácidos conduzem a formação de um aldeído correspondente com liberação de amoníaco e gás carbônico. A molécula de hidridantina (ninidrina reduzida) em presença de outra ninidrina condensa e, através do aminoácido, produz um complexo violeta (Moore e Stein, 1948; Lamonthe e McCormick, 1973).

O grupo amino dos aminoácidos é muito resistente a hidrólise, porém pode ser removido facilmente por oxidação.

A ninidrina reduzida reage com o NH₃ liberado e outra molécula de ninidrina, formando um complexo de coloração arroxeadada que apresenta absorção máxima em

570 nm. A Figura 11 descreve a reação proposta por Mahler e Cordes (1971). Os mecanismos envolvidos nesta reação são descritos nas Figuras 12 e 13.

A cor não é formada apenas com os aminoácidos, mas também com peptídeos, proteínas, amônio e outros componentes com grupo α -amino livre. A presença de ninidrina reduzida (hidridantina) é essencial para obter um desenvolvimento quantitativo da cor com amônio. A 100°C, a reação com grupo amino livre de proteínas e aminoácidos é essencialmente completada em 15'. A leucina libera a máxima produção de cor após 5'. No entanto, a reação da hidridantina com amônio requer 25' (Joergensen e Brookes, 1990).

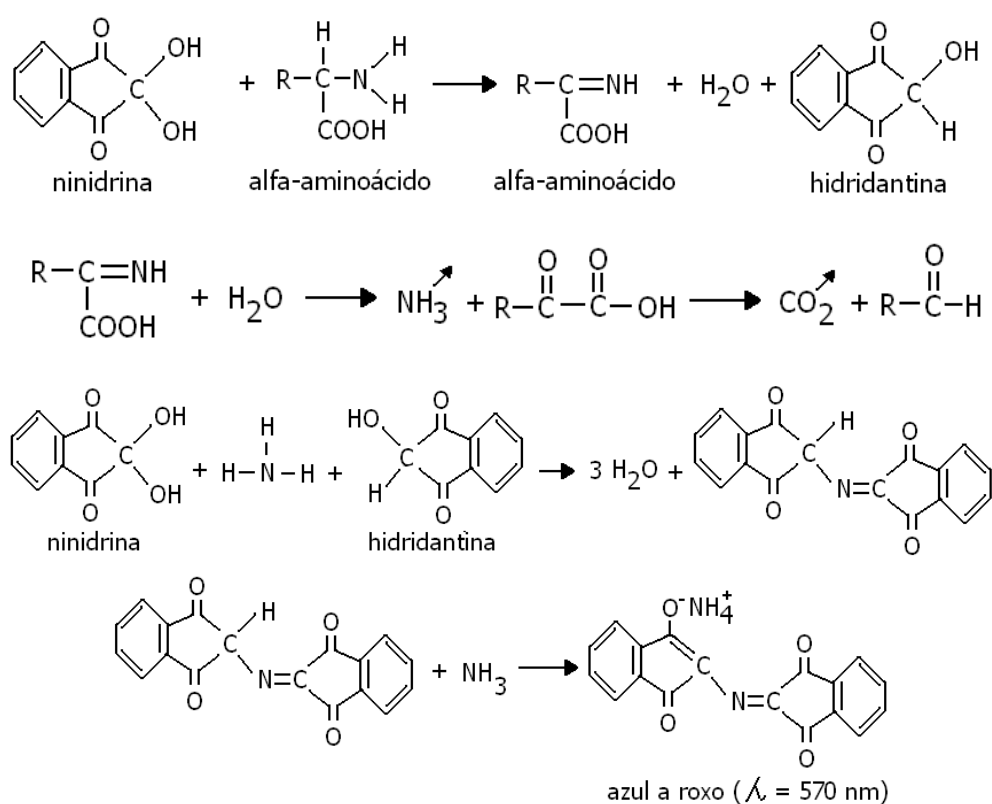


Figura 11. Reação com ninidrina e hidridantina proposta por Mahler e Cordes

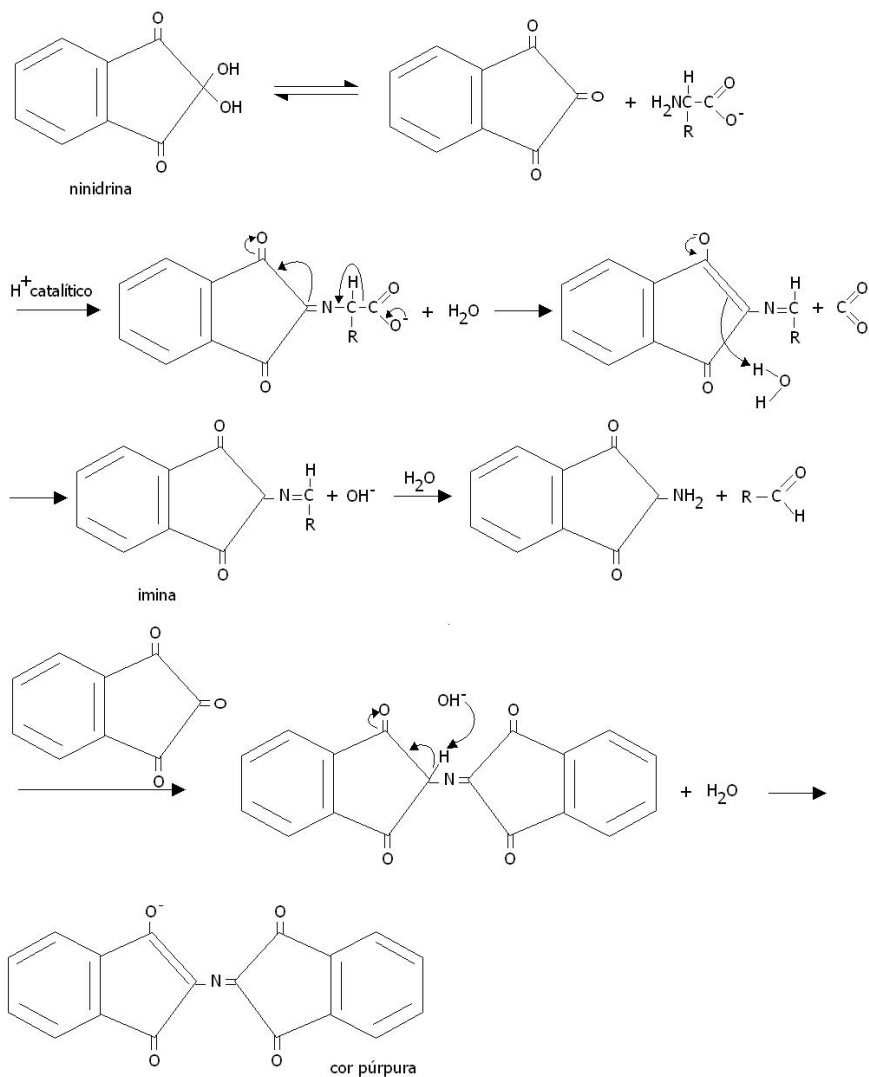


Figura 12: Mecanismo I (Reação com ninidrina e hidridantina)

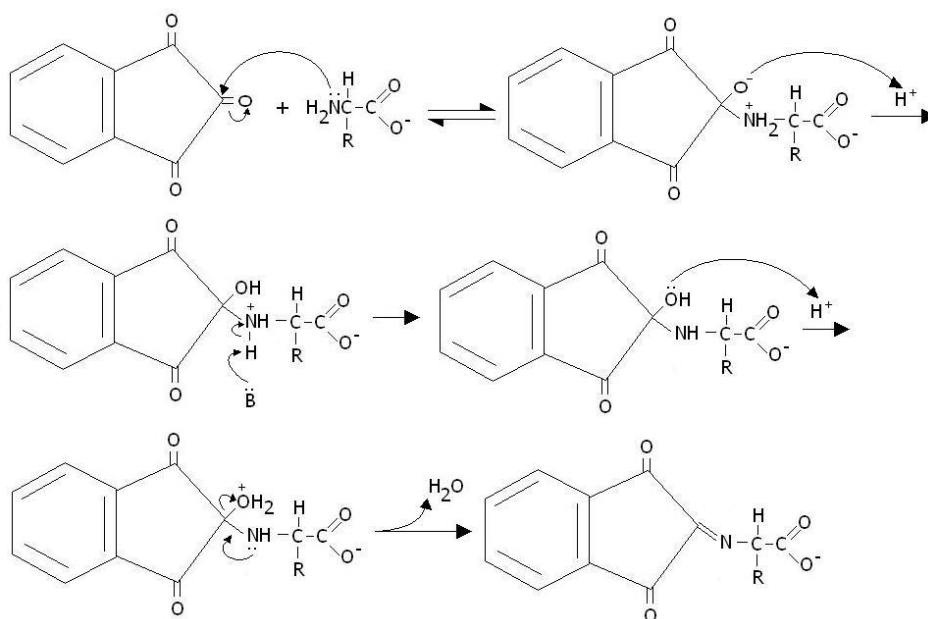


Figura 13: Mecanismo II (Reação com ninidrina e hidridantina)

Outras aminas além dos aminoácidos, também reagem com a ninidrina fornecendo coloração azul, mas sem a liberação de dióxido de carbono. Assim, a ninidrina-reativa-N é a soma de α -amino, aminas primárias e amônio N (Joergensen e Brookes, 1990).

Para reprodutibilidade da medida de N-ninidrina é essencial que a reposta da cor para amônio e aminoácidos seja a mais similar possível. Cuidado especial deve ser tomado para garantir que a reação do amônio com a hidridantina seja completa (Joergensen e Brookes, 1990).

Nesse sentido, o dimetilsulfóxido (DMSO), um reagente anfipático, com alto ponto de ebulição (189°C) e baixa toxicidade, determina os aminoácidos básicos e exerce a função de dissolver bem a hidridantina e produzir, em contato com a ninidrina, um complexo de coloração mais estável. O dimetilsulfóxido deve ser mantido a pH 5.3, a adição da solução tampão de acetato de lítio tem esta função.

Outro aspecto é que a baixa solubilidade do sulfato de potássio (K_2SO_4) em solventes orgânicos causa sérios problemas analíticos e o uso do ácido cítrico supera esta interferência complexando o K^+ (Joergensen e Brookes, 1990).

4.1.3.1. Cálculo do N da biomassa microbiana

I. Cálculo da concentração de leucina

O cálculo da concentração de leucina foi realizado a partir das absorvâncias obtidas em cada um dos pontos da curva.

$$[\text{Leucina}] = K_1 * (\text{abs}) - K_0 \text{ (}\mu\text{mol/L)}$$

Onde,

Abs= absorvância da amostra analisada em espectrofotômetro

K₁= intercepto da reta encontrada na curva padrão;

K₀= coeficiente de declividade da reta;

II. Cálculo da concentração de N na leucina ($\mu\text{g N/mL}$)

$$[\text{Leucina}] * 14 = X \mu\text{g N/mL} \rightarrow (\mu\text{mol/L de leucina} * 14 \mu\text{g N/L}) / 1000$$

III. Cálculo da concentração de N da alíquota da amostra ($\mu\text{g N/mL}$)

$$X \mu\text{g N/mL} * V_i / v_a = Z \mu\text{g N/mL}$$

Onde,

V_t (volume total) = 8,25mL

v_a (volume da alíquota)= 0,75mL

IV. Cálculo da concentração de N-ninidrina por unidade do solo ($\mu\text{gN/g}$ solo)

$$Z \mu\text{g N/mL} \cdot V / \text{peso do solo} = Y \mu\text{g N/g de material} \cdot f = \mu\text{gN/g solo}$$

Onde,

V = volume de K_2SO_4 ;

f = Fator de correção da umidade ($f = \text{PU/PS}$)

PU = peso úmido do solo;

PS = peso seco do solo.

V. Cálculo do N-ninidrina da BM

$$(\mathbf{F_{nin}} - \mathbf{NF_{nin}}) = \mathbf{N-ninidrina da biomassa microbiana}$$

Onde,

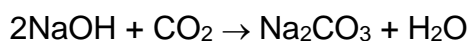
$\mathbf{F_{nin}}$ = N-ninidrina das amostras fumigadas

$\mathbf{NF_{nin}}$ = N-ninidrina das amostras não fumigadas

4.1.4. Método da Atividade Microbiana

A medição do CO_2 liberado pela atividade microbiana, na metodologia adotada no presente trabalho é realizada a partir da incubação dos solos em meio sem aeração e contendo uma solução alcalina de NaOH que tem a função de absorver o CO_2 liberado nesse meio.

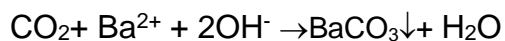
O NaOH em reação com o dióxido de carbono (CO_2) forma o carbonato de sódio (Na_2CO_3) que é solúvel em água:



A solução resultante dessa reação, acrescida de BaCl_2 e fenolftaleína, quando titulada com ácido clorídrico faz liberar na solução: CO_2 , H_2O e NaCl , conforme descrito na equação abaixo:



O CO₂ presente na solução é então quantificado por sua propriedade de turvar a água quando em reação com o cloreto de bário (BaCl₂):



4.1.4.1. Cálculo da Atividade microbiana do solo

A atividade microbiana foi calculada a partir da aplicação dos dados obtidos na fórmula:

$$R = (B - A) * M * 0,006 * 10^6 / PS = \mu\text{gCO}_2\text{-C g}^{-1}\text{solo}$$

Onde,

R= quantidade de CO₂-C liberado

B= Média dos volumes gastos de HCl com as amostras em branco;

A= Volume gasto de HCl na titulação das amostras;

M= Concentração molar exata do HCl

5. CONCLUSÃO

A qualidade da matéria orgânica assim como o manejo do solo influencia a eficiência da biomassa microbiana.

O método da Fumigação-Extração não é suficientemente simples para uma análise de rotina de fertilidade do solo, no entanto, associado a atividade microbiana e ao carbono e nitrogênio total fornece dados confiáveis sobre a ciclagem desses nutrientes (C e N) em solos sob diferentes ecossistemas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. P. E. Soil respiration. In: Page, A. L.; Miller, R. H.; Keeney, D. R. (eds) Method of soil analysis. 2ed. Part 2. Madison: American Society of Agronomy / Soil Science Society of America, 1982. p 831-871.
- ANDERSON, J.D. e INGRAM, J.S.I. Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods. (2 ed) Wallingford, UK CAB International, 1996. 171p.
- CAMPBELL, M.K. Bioquímica. 3ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2000. 752p.
- D'ANDREA, A.F., SILVA, M.L.N., CURI, N., SIQUEIRA, J.O., CARNEIRO, M.A.C. Atributos biológicos da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do Cerrado no Sul do Estado de Goiás. R. Bras. Ci. Solo, 2002. p26: 913-923.
- De-POLLI, H. e GUERRA, J.G.M. C, N e P na biomassa microbiana do solo. In: Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. SANTOS, G.A. e CAMARGO, FAO (Editores). Porto Alegre: Gênese , 1999. P. 389-412.
- DEFELIPO, B.V.; RIBEIRO, A.C. Análise química do solo (metodologia). Viçosa, MG: UFV, Imp. Univ., 1981. 17p. (Boletim de Extensão, 29).
- DION H G; Mann D J. J. Agric. Sci. 36, 239–245. 1946.
- DORAN, J.W., PARKIN, T.B. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: Doran, J.W., Jones, A.J., EDS. Methods for assessing soil quality. Madison, Soil Science Society of America. 1996. p.25-37. (SSSA Special Publication, 49).
- GAMA-RODRIGUES, E.F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (eds) Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais, 1. ed. Porto Alegre: Gênese, 1999. p.227-243.
- GAMA-RODRIGUES, E.F., GUERRA, J.G.M., ALMEIDA, D.L., DE-POLLI, H. Biomassa microbiana de carbono de solos de Itaguaí (RJ): Comparação entre os métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. R. Bras. Ci. Solo, Campinas, 1994. p8: 427-432.
- GRACE, C. e GRISI, B.M. Soil microbial biomass and organic matter dynamics in northern European and tropical soils at elevated temperature. In: Abstracts of the 6th International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona, Espanha. 1992. p.103.
- GRISI, B.M. Biomassa e a atividade de microrganismos do solo : revisão metodológica. Revista Nordestina de Biologia , 1995. p. 10:1-22.
- 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 Decker, 1981. p 5: 415-471.

- JENKINSON, D.S; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, 1976a. p.179-188.
- JENKINSON, D.S., POWLSON, D.S. The effect of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method of measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 1976b. P.8:209-213.
- JOERGENSEN, P.G. e BROOKES, P.C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0,5 M K₂SO₄ soil extracts. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 22:1033-1027, 1990.
- LAMONTHE, P.J. and MCCORMICK, P.G. *Anal. Chem.* 45, 1906-1911. 1973.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2ªed. São Paulo : Sarvier, 1995.
- LEPSCH, I. F. *Formação e Conservação dos Solos*. São Paulo: Oficina de textos. 2002
- MAHLER,H.R.; CORDES,E.H. *Biological Chemistry*.2ª ed. Harper e Row Publishers N.Y. S. Francisco,U.S.A.,1971.
- MANAHAN, S.E. The geosphere and geochemistry. In: Stanley, E.; Manahan, S.E. (eds) *Environmental Chemistry*. 6ed. Boca Raton: CRC Press. 1994 P.433-458.
- MELE, P.M. e CARTER, M.R. Effect of climatic factors on the use of microbial biomass as an indicator of changes in soil organic matter. In: MULONGOY, K. e MERCKX, R. *Soil organic matter dynamics and sustainability of tropical agriculture*. Chichester, John Wiley, 1993. 392p.
- MENDHAM, D.S., SANKARAN, K.V., O'CONNELL, A.M., GROVE, T.S. Eucalyptus globulus harvest residue management effects on soil carbon and microbial biomass at 1 and 5 years after plantation establishment. *Soil Biol. Biochem.*, 2002. p34: 1903-1912.
- MONTEIRO, M. T. e GAMA-RODRIGUES, E. F. Carbono, nitrogênio e atividade da biomassa microbiana em diferentes estruturas de serapilheira de uma floresta natural. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:819-826, 2004.
- MOORE, S. e STEIN, W. H. *J. biol. Chem.* 176, 367. 1948.
- PALLEROS, D.R. *Experimental organic chemistry*. John Wiley e Sons, Inc., Nova York, 1999. pág 533-534
- PARKIN, T.B., DORAN, J.W., FRANCO-VIZCAÍNO, E. Field and laboratory tests of soil respiration. In: DORAN, J.W., JONES, A.J., EDS. *Methods for assessing soil quality*. Madison, Soil Science Society of America. 1996. p.231-245. (SSSA Special Publication, 49).
- REINERT, D.J. Recuperação de solos em sistemas agropastoris. In: DIAS, L.E. e MELLO, J.W.V., eds. *Recuperação de áreas degradadas*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, 1998. p.163-176.

- SANS, L. M. A. . Avaliação da qualidade do solo. In: Oliveira, T.S, Assis Jr, R.N, Romero, R.E, Silva,J.R.C.. (Org.). Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido. 1 ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2000, v. 1, p. 224-232.
- SMITH, J.L., PAUL, E.A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: Bollag, J.M., Stotzky, G. eds. Soil Biochemistry, 1990. p 6: 357-396.
- TATE, K.R., ROSS, D.J. e 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 20:329-335. 1988.
- VANCE, E.D., BROOKES, P.C. e, JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry 19:703-707. 1987.
- WARDLE, D. A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. Biol. Rev., Praga, 67:21-358, 1992.
- YOUNG, A. T. Agroforestry for soil conservation. Oxon, U.K: CAB International. 1989.