

## AGRÁRIA

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN (on line): 1981-0997

v.6, n.4, p.588-595, out.-dez., 2011

Recife, PE, UFRPE. www.agraria.ufrpe.br

DOI:10.5039/agraria.v6i4a1071

Protocolo 1071 - 20/08/2010 \*Aprovado em 28/06/2011

Adriano M. Knupp<sup>1</sup>

Enderson P. de B. Ferreira<sup>1</sup>

# Eficiência da quantificação do carbono da biomassa microbiana por espectrofotometria comparada ao método titrimétrico

## RESUMO

Dentre os parâmetros de qualidade do solo, o carbono da biomassa microbiana ( $C_{mic}$ ) é um dos mais utilizados, porém, o processo de análise mais adotado pelos laboratórios promove a geração de resíduos tóxicos. Com o objetivo de reduzir a geração de resíduos no processo analítico, foram realizados testes comparativos entre a titrimetria e a espectrofotometria para a quantificação do carbono microbiano, a partir de amostras de solo coletadas nas profundidades de 0-10 cm e 10-20 cm em três tipos de solo com características químicas, físicas e de manejo distintas. Os valores de  $C_{mic}$  encontrados nos três solos pelo método espectrofotométrico foram semelhantes aos valores encontrados pela titrimetria. Quando se utilizou a espectrofotometria, houve redução de 42% na concentração de dicromato de potássio para a nova formulação da solução digestora e de cerca de 20% no tempo de execução da análise, além de redução no volume de resíduos tóxicos gerado. De acordo com os resultados obtidos, o uso da espectrofotometria apresentou-se vantajoso do ponto de vista ambiental, além de não diferir estatisticamente do método titrimétrico.

**Palavras-chave:** Extração do carbono, indicadores biológicos, resíduos tóxicos.

## Quantification efficiency of the microbial biomass carbon by spectrophotometry assay as compared to the titrimetric method

## ABSTRACT

Among the soil quality parameters, the microbial biomass carbon ( $C_{mic}$ ) is one of the most used; however, in contrast to the ecological use of this parameter, the analysis process used for  $C_{mic}$  determination has a negative bias with regard to toxic waste generation. Aiming to reduce waste generation in the analytical process, comparative tests were performed between titrimetry and spectrophotometry for the quantification of microbial carbon from soil samples collected at 0-10 cm and 10-20 cm deep in three soil types with different chemical, physical and management characteristics. Results showed that the  $C_{mic}$  values found by spectrophotometry in the three soil types were similar to the values found by titrimetry. When spectrophotometry was used the potassium dichromate concentration was reduced in 42% for the new formulation of the digesting solution. Also, time execution was reduced in 20%, followed by the reduction in the volume of toxic waste generated. According to these results, the spectrophotometry process showed to be environmentally advantageous, besides, it did not differ statistically from the titrimetry method. Ler foneticamente

**Key words:** Carbon extraction, biological indicators, toxic waste.

<sup>1</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Rodovia GO 462, Km 12, Zona Rural, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás-GO, Brasil. Caixa Postal 179. Fone: (62) 3533-2177. E-mail: adrianoknupp@cnpaf.embrapa.br; enderson@cnpaf.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

O solo é um sistema vivo e dinâmico fundamental para a manutenção do equilíbrio ecológico e para a atividade agrícola. Apesar disso, durante muito tempo, a qualidade do solo foi avaliada considerando-se apenas os aspectos químicos e físicos. Nas últimas décadas os índices biológicos de qualidade do solo têm ganhado importância como fatores preponderantes para, junto às análises físicas e químicas, estabelecerem critérios de uso e manejo dos solos nos sistemas agrícolas (Matsuoka et al., 2003).

A biomassa microbiana é um indicador biológico importante por sua capacidade em responder rapidamente às alterações no solo (Spedding et al., 2004). Essa capacidade responsiva deve-se ao fato de os microrganismos participarem diretamente da ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica, estabilização física dos agregados (Franzluebbers et al., 1999) e por serem a principal fonte de enzimas do solo, tornando-se responsáveis pela maioria da atividade biológica deste sistema (Moreira & Siqueira, 2006).

A metodologia clássica para quantificação do carbono proveniente da biomassa microbiana do solo é a fumigação-extração descrita por Vance et al. (1987). Entretanto, além de ser uma metodologia que despande muito tempo para sua execução, exige a manipulação de ácidos e de substâncias carcinogênicas, tais como o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), gerando resíduos de cromo e ácidos em volumes consideráveis.

O dicromato de potássio é um sólido solúvel em água, altamente tóxico, cujo cromo presente encontra-se na forma hexavalente, a mais reativa com organismos vivos. O grande poder de toxidez desse cromo se deve ao fato de possuir livre difusão através das membranas celulares e de ser um forte agente oxidante. Além disso, o cromo trivalente, um dos produtos da digestão do dicromato na quantificação de carbono, em grandes concentrações, pode causar problemas celulares em virtude de possuir alta capacidade de interagir com diversos compostos orgânicos, tais como importantes enzimas funcionais, inibindo-os (Kotás & Stasicka, 2000). Trabalhos recentes abordaram a capacidade de toxidez do cromo hexavalente, tais como o de Stout et al. (2008), que demonstraram o poder carcinogênico desse composto quando administrado em soluções por via oral em ratos; ou o de Espinoza-Quiñones et al. (2009), que sugerem a inibição do crescimento radicular em cebolas, promovida pela forma hexavalente, como parâmetro para detectar contaminação em águas de rios; e ainda o de O'Brien et al. (2009) que relatam um mecanismo molecular de indução à mutagênese.

Os indicadores biológicos de qualidade do solo são utilizados como parâmetros importantes para o manejo adequado do solo em programas de agricultura sustentável, no entanto, metodologias relacionadas, como a quantificação de carbono da biomassa microbiana, geram um passivo ambiental oneroso. Em consonância com os preceitos do desenvolvimento sustentável, as ações de pesquisa devem ser pautadas na responsabilidade ambiental e, de maneira crescente, novas metodologias e adaptações devem ser buscadas. Neste contexto, alternativas que venham a reduzir

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

Na busca por uma metodologia eficiente para quantificar o carbono de amostras de solos e reduzir o volume de resíduos de cromo produzidos no final do processo, objetivou-se, neste trabalho, realizar testes comparativos entre a titrimetria e a espectrofotometria para a quantificação do carbono microbiano, mantendo-se inalteradas, nos dois procedimentos, as fases de incubação, fumigação, extração e digestão do carbono presente nas amostras de solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho, em 2009 coletaram-se solos com características distintas, sob diferentes formas de manejo em três localidades: na fazenda Estrela do Sul, a 10 km de distância de Nova Xavantina (MT) em área de pastagem degradada sobre um Neossolo Quartzarênico (Embrapa, 2006), de textura franco-arenosa, com 1,3% de matéria orgânica (M.O.); em Santo Antônio de Goiás (GO) na Estação Experimental em Agroecologia (EEA) da Embrapa Arroz e Feijão, onde coletaram-se amostras em um Latossolo Vermelho (Embrapa, 2006), de textura franco-argilosa, com 2,01% de M.O., próximo a uma área de plantio orgânico de feijão, e em um Latossolo Vermelho (Embrapa, 2006), de textura franco-argilosa, com 2,00 % de M.O., em uma mata próxima à EEA. As duas últimas áreas foram escolhidas como possíveis referências para solos com maiores teores de  $C_{mic}$ . Para cada classe de solo foram feitas três amostragens nas profundidades 0-10 cm e 10-20 cm. De cada amostra de campo obtida em triplicatas, peneiradas em malha de 2 mm, foram originadas seis subamostras (20 g cada) no laboratório, das quais três foram utilizadas para fumigação e três não foram fumigadas.

No processo de extração do  $C_{mic}$  as subamostras receberam 60 mL de uma solução 0,5 M de  $K_2SO_4$  (Tate et al., 1988), sendo agitadas por 40 min a 170 rpm e posteriormente deixadas sob decantação por 30 minutos. Em seguida foram filtradas em papel filtro para a separação do extrato a ser utilizado na determinação do  $C_{mic}$  pelo método proposto por Vance et al. (1987) e pelo procedimento espectrofotométrico.

No procedimento espectrofotométrico, foi retirada de cada uma das subamostras uma alíquota de 2 mL do mesmo extrato usado para a avaliação pelo método proposto por Vance et al. (1987). Cada alíquota foi transferida para um tubo de cultura com 16x100 mm e, em seguida, com o auxílio de um dispensador, cada subamostra recebeu 4 mL da solução digestora (4,8 g de dicromato de potássio em água destilada e o volume foi completado para 250 mL, sendo acrescido de 750 mL de ácido sulfúrico).

Como referência para as análises espectrofotométricas, curvas padrão foram desenvolvidas, contendo concentrações conhecidas de carbono, usando biftalato de potássio ( $C_8H_5KO_4$ ) e considerando que cada 1 mg desse produto corresponde a 0,441 mg de carbono. O biftalato de potássio foi diluído em 200 mL de solução extratora ( $K_2SO_4$  0,5 M pH

6,5 – 6,8) obtendo-se uma solução padrão com concentração de 1 mg C mL<sup>-1</sup>. A partir desta solução, por diluições sucessivas em K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, foram obtidas soluções com volume de 50 mL nas seguintes concentrações: 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg C mL<sup>-1</sup>.

Alíquotas de 2 mL de cada solução de biftalato de potássio, em triplicatas, foram transferidas para tubos de cultura 16x100 mm. Em seguida, cada tubo recebeu 4 mL da solução digestora sulfocrômica (4,8 g de dicromato de potássio em água destilada e o volume foi completado para 250 mL, sendo acrescido de 750 mL de ácido sulfúrico) e foi submetido à agitação em vórtex para homogeneizar o conteúdo. Os tubos foram transferidos para bloco digestor aquecido a 100°C durante 30 min. O padrão zero para a espectrofotometria (sem biftalato de potássio) foi obtido com alíquotas de 2 mL da solução extratora (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) que recebeu 4 mL da solução digestora sulfocrômica e foi submetida à mesma temperatura (100°C) pelo mesmo tempo das demais amostras.

Após a digestão, os tubos foram mantidos fora dos blocos, em suportes apropriados, até alcançarem a temperatura ambiente. Em seguida, com o auxílio de um espectrofotômetro, as amostras foram submetidas à leitura em dois diferentes comprimentos de onda (600 e 650 nm). Os valores de absorbância, obtidos em triplicatas para cada concentração de carbono, foram utilizados para a construção das curvas padrão nos dois comprimentos de onda. A média das triplicatas das subamostras foi substituída na equação 1:

$$X = (\text{média triplicatas} - b) \cdot a^{-1} \quad (1)$$

em que “a” e “b” são valores das equações de reta das curvas padrão. O resultado “X” corresponde à quantidade de carbono em mg mL<sup>-1</sup>. Esse valor encontrado foi substituído na equação 2:

$$Z = (X \cdot 60 \cdot 1000) \cdot ps^{-1} \quad (2)$$

em que “60” correspondem ao volume de solução extratora utilizada e “ps” ao peso seco em 20 g de solo. O resultado “Z” corresponde à quantidade de C<sub>mic</sub> em mg C<sub>mic</sub> kg<sup>-1</sup> de solo seco. Desse valor obtido nas amostras fumigadas subtrai-se o valor obtido para Z nas amostras não fumigadas e, para a obtenção do valor de C<sub>mic</sub>, divide-se o resultado pelo fator de correção kc, como expresso na equação 3:

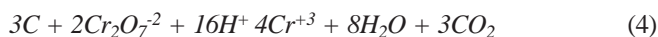
$$C_{mic} = (Z \text{ “amostras fumigadas”} - Z \text{ “amostras não fumigadas”}) / kc^{-1} \quad (3)$$

em que o valor “kc” para solos tropicais é de 0,33 (Feigl et al., 1995).

A adoção dos comprimentos de onda utilizados nesse trabalho teve como base a busca pela quantificação do cromo trivalente, resultante do processo de digestão, ou o hexavalente, resultante da digestão incompleta das amostras. Alguns trabalhos (ASTM, 1995; Graner et al., 1998; Duda et al., 2005; Stout et al., 2009) forneceram indícios para a busca da faixa adequada de comprimento de onda. Os cromos,

trivalente e hexavalente, podem ser detectados por comprimentos de onda no intervalo entre 390 e 650 nm. Avaliou-se, então, nessa faixa, em intervalos de 10 nm, quais seriam os melhores comprimentos de onda para análise. Após esta avaliação, decidiu-se utilizar os comprimentos de 600 e 650 nm para a detecção do cromo trivalente, ou seja, o cromo resultante do processo de digestão do dicromato, devido à boa reprodutibilidade.

Na espectrofotometria, assim como na titrimetria, o montante da redução de dicromato é considerado quantitativamente ligado ao teor de C-orgânico da amostra (4). Dessa forma, a principal modificação seria a quantificação do cromo trivalente, resultado da redução do dicromato, em detrimento da titulação do excesso de dicromato, como ocorre no método proposto por Vance et al. (1987). O ajuste na metodologia permitiu também a redução na concentração do dicromato utilizado para a digestão das amostras.



Uma grande dificuldade em obter-se reprodutibilidade nas análises espectrofotométricas nos testes iniciais foi a adoção de tubos de cultura de 13x100 mm. A partir do momento em que se adotaram os tubos de 16x100 mm, aumentou-se o caminho óptico, e passou a haver reprodutibilidade.

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

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

Para efeito de análise de variância, os valores de C<sub>mic</sub> obtidos foram avaliados usando modelo matemático para o delineamento em blocos inteiramente casualizados, com a finalidade de diminuir a interferência resultante de possível não uniformidade dos solos amostrados. Em seguida, as



**Figura 1.** Tubos contendo concentrações crescentes de carbono em  $\text{mg mL}^{-1}$  em solução de biftalato de potássio após a digestão, utilizadas para a construção da curva padrão em cada comprimento de onda.

**Figure 1.** Glass tubes containing increasing concentrations digested solutions of potassium biphthalate, used to construct the standard curve for each wavelength. The values expressed correspond to the carbon concentration in  $\text{mg mL}^{-1}$ .

médias dos tratamentos foram contrastadas pelo teste de Scott-Knott (Scott & Knott, 1974) usando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os valores de absorvância obtidos das triplicatas, nos comprimentos de onda de 600 e 650 nm. Na concentração de  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$  de carbono, as leituras das triplicatas foram: 0,686; 0,692; 0,687  $A_{600}$ , e 0,506; 0,571; 0,506  $A_{650}$ , respectivamente. Neste ponto atingiu-se o limite de digestão para a concentração de dicromato proposta, o que é suficiente para uma detecção de teores de  $C_{\text{mic}}$  até três vezes maiores do que aqueles que vêm sendo encontrados nos solos com maiores atividades da biomassa, permitindo uma margem de segurança às análises.

A partir dos dados da Tabela 1 foram estabelecidas as curvas padrão para a concentração de C, em  $\text{mg mL}^{-1}$ , nos dois comprimentos de onda estudados (Figura 2).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados do teste de médias obtidos para cada solo, em cada profundidade, nos diferentes métodos utilizados neste trabalho, titrimetria e espectrofotometria (comprimentos de onda de 600 e 650 nm). No Latossolo Vermelho (LV) oriundo da EEA, nas duas profundidades avaliadas, houve diferença significativa entre os valores obtidos para o  $C_{\text{mic}}$  por titrimetria e espectrofotometria. Nesse caso, a espectrofotometria apresentou os maiores valores médios em relação à titulação.

Os valores obtidos por espectrofotometria não apresentaram diferença significativa entre os dois comprimentos de onda. Não houve diferença significativa entre as médias obtidas para as amostras não fumigadas, entretanto, as amostras fumigadas apresentaram diferença entre a titulação e espectrofotometria, resultando em diferença significativa entre os métodos na quantificação do  $C_{\text{mic}}$ . Mesmo não se objetivando a comparação dos teores de  $C_{\text{mic}}$  entre os solos, é possível notar nos valores obtidos tanto por titrimetria quanto nos dois comprimentos

**Tabela 1.** Valores de absorvância das leituras espectrofotométricas das soluções de biftalato de potássio, em triplicatas, correspondentes às curvas padrão para cada comprimento de onda

**Table 1.** Absorbance values from spectrophotometric determinations for solutions of potassium biphthalate, in triplicate, from which the standard curves for each wavelength were obtained

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

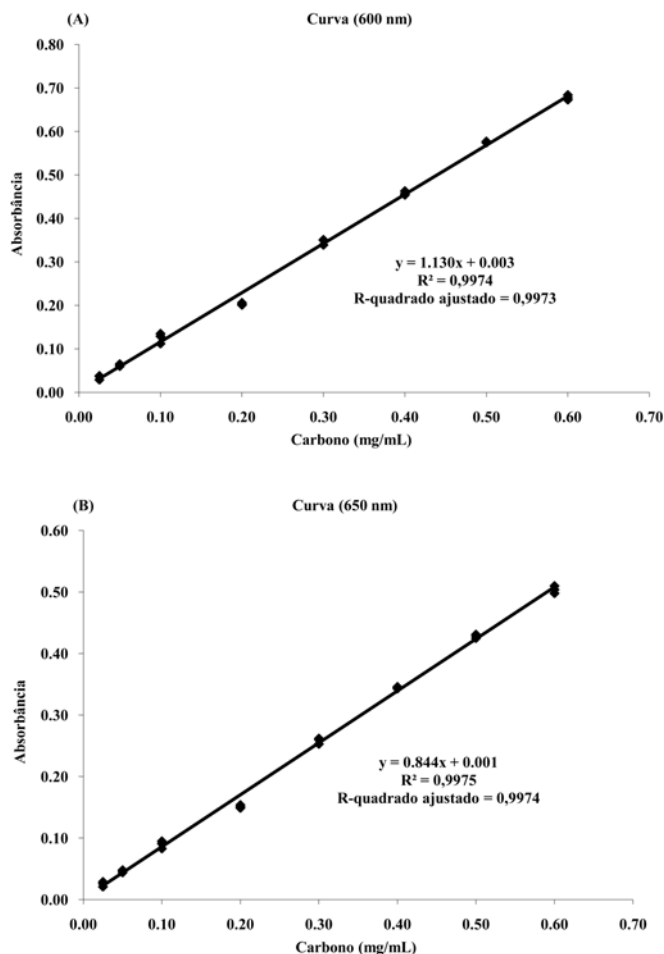


Figura 2. Curvas padrão de carbono em solução de biftalato de potássio. Absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda de 600 (A) e 650 nm (B)

Figure 2. Standard curves of carbon in solution of biphtalate potassium. Absorbances taken at wavelengths of 600 (A) and 650 nm (B)

de onda a diferença numérica em favor do solo de mata, como esperado, corroborando Ferreira et al. (2010).

O  $C_{mic}$  obtido por titrimetria, no Latossolo Vermelho proveniente da área de mata, apresentou-se significativamente maior em relação àqueles obtidos por espectrofotometria, nas duas profundidades. Novamente os valores obtidos por espectrofotometria não apresentaram diferença significativa entre os comprimentos de onda. Assim como no Latossolo da EEA, as diferenças encontradas entre os resultados do carbono da biomassa refletiam àquelas obtidas pelas amostras fumigadas.

De uma maneira geral, os valores médios obtidos das amostras não fumigadas apresentaram valores que não diferiram significativamente entre o procedimento titimétrico e espectrofotométrico (nos dois comprimentos de onda), salvo na profundidade de 10-20 cm para o NQ (Nova Xavantina) e o LV (Mata). Entretanto, para as amostras fumigadas, houve diferença entre o processo titimétrico e o espectrofotométrico nos dois comprimentos de onda, que por sua vez, não variaram entre si. Isso indica que para os Latossolos analisados houve

Tabela 2. Teores de carbono obtidos pelos métodos de titrimetria e espectrofotometria (600 e 650 nm) em duas profundidades, para cada solo analisado

Table 2. Carbon contents obtained by the titrimetry and spectrophotometry methods (600 and 650 nm) at two depths, for each analyzed soil

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

NQ - Neossolo Quartzarênico coletado em Nova Xavantina, Mato Grosso; LV = Latossolo Vermelho, coletados na Estação Experimental em Agroecologia e em área de mata, em Santo Antônio de Goiás, Goiás; CV = coeficiente de Variação;  $C_{mic}$  = carbono da biomassa microbiana. Médias seguidas de mesma letra na coluna, em cada profundidade, não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste Scott-Knott

diferença entre as metodologias, porém, essas diferenças não foram no mesmo sentido, ou seja, para o solo da EEA, houve quantificação maior pelo método espectrofotométrico, ocorrendo o oposto para Mata. Entre estes solos, fica mais pronunciada a diferenciação entre as metodologias, influenciada pelos valores obtidos das subamostras fumigadas. Feigl et al. (1995) já havia relatado que as características físicas de Latossolos com altos teores de argila interferem na homogeneidade da fumigação, indicando que, em trabalhos futuros, numa maior amostragem de solos diversificados, esses fatores deverão ser considerados.

Para verificar se as diferenças observadas tiveram influência das repetições, foram comparados os valores obtidos para a média das triplicatas de cada repetição nos diferentes solos em estudo. Nas amostras oriundas do NQ de Nova Xavantina, nos primeiros 10 cm, os métodos titimétrico e espectrofotométrico (nos dois comprimentos de onda) apresentaram uniformidade entre as triplicatas das subamostras fumigadas. No entanto, as não fumigadas

apresentaram, em cada forma de obtenção, pelo menos uma das repetições significativamente diferente das outras (Tabela 3). Entre os 10 e 20 cm do solo, para todos os métodos, nenhuma repetição diferiu significativamente. A boa reprodutibilidade nas três formas de obtenção (duas espectrofotométricas e uma titrimétrica), para esse solo, fornece indícios da boa aplicabilidade do método espectrofotométrico, já que apresentou os mesmos padrões nas triplicatas.

As amostragens feitas nos Latossolos Vermelhos (LVs) da EEA (Tabela 4) e da área de Mata (Tabela 5) apresentaram uniformidade entre as triplicatas das repetições para as amostras fumigadas. Nos dois solos as médias entre as repetições foram estatisticamente iguais, entretanto, para as amostras não fumigadas, tanto o LV da EEA quanto o da Mata apresentaram diferença entre as médias das triplicatas. No LV da EEA, as amostras não fumigadas apresentaram diferenças

**Tabela 3.** Comparação entre os valores médios das triplicatas de cada repetição, obtidos por titrimetria e espectrofotometria (600 e 650 nm), nas duas profundidades analisadas (Neossolo Quartzarênico, Nova Xavantina, MT)

**Table 3.** Comparison between the mean values of triplicates of each repetition, obtained by titrimetry and spectrophotometry (600 and 650 nm), in both analyzed depths (Quartzarenic Neosol, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brazil)

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

CV = coeficiente de Variação; C<sub>mic</sub> = carbono da biomassa microbiana. Valores seguidos de mesma letra na coluna, para cada profundidade, não diferem significativamente (p<0,05) pelo teste Scott-Knott

**Tabela 4.** Comparação entre os valores médios das triplicatas de cada repetição, obtidos por titrimetria e espectrofotometria (600 e 650 nm), nas duas profundidades analisadas (Latossolo Vermelho, EEA da Embrapa Arroz e Feijão)

**Table 4.** Comparison between the mean values of triplicates of each replication, obtained by titrimetry and spectrophotometry (600 and 650 nm), in both analyzed depths (Red Latosol, EEA of Embrapa, National Rice and Beans Research Center)

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

CV = coeficiente de Variação; C<sub>mic</sub> = carbono da biomassa microbiana. Valores seguidos de mesma letra na coluna, para cada profundidade, não diferem significativamente (p<0,05) pelo teste Scott-Knott

entre as repetições nas duas profundidades na titrimetria e na profundidade 10-20 na espectrofotometria, nos dois comprimentos de onda (Tabela 4).

No LV da Mata houve diferença entre as repetições das amostras não fumigadas na profundidade 0-10 pelo método titrimétrico e nas duas profundidades para o método espectrofotométrico a 600 nm. Com 650 nm não houve diferença entre as repetições não fumigadas (Tabela 5). A diferença observada entre as repetições não fumigadas, nos dois solos, teve influência nos resultados obtidos para o C-BMS. Entretanto, quando se obtém as médias finais, essa variação entre as médias das amostras de triplicatas perde seu efeito (Tabela 2).

De acordo com os resultados, a espectrofotometria pode ser uma ferramenta eficiente para avaliar o C<sub>mic</sub>, com potencial para substituição da titrimetria num prazo médio. Assim, com

a formulação proposta neste trabalho, a solução final, sulfocrômica digestora mais o extrato da subamostra, passaria a possuir um volume de 6 mL, contra os 25 mL do processo titrimétrico. Isso significa uma redução de até 10 vezes o volume final do resíduo gerado, já que para a titulação de 10 amostras, ou seja, 60 subamostras (média de um dia de trabalho), estima-se gastar 15 mL de sulfato ferroso amoniacal em cada uma, podendo haver uma produção de resíduo final com cromo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, sulfato ferroso e água destilada de cerca de 3900 mL, ou 65 mL por subamostra. Para a mesma quantidade de subamostras na nova formulação, há uma produção de resíduo final de cerca de 360 mL, ou 6 mL por subamostra.

Além da redução do volume final do resíduo gerado, foi reduzida a concentração de dicromato presente na solução inicial. A solução de dicromato convencional utilizada para a digestão possui uma concentração de 39,23 mg de dicromato por subamostra. Na formulação proposta neste trabalho, essa concentração é reduzida para 19,2 mg por subamostra (uma redução de 42,42%). Esta redução é significativa do ponto de vista da saúde humana, tendo em vista que o manipulador ficará menos exposto ao cromo VI que é potencialmente tóxico (Espinoza-Quiñones et al., 2009), carcinogênico (Stout et al., 2009) e mutagênico (O'Brien et al., 2009). Complementarmente, a realização de leitura espectrofotométrica diretamente nos tubos utilizados no processo de digestão permite uma redução no tempo da quantificação do  $C_{mic}$  em 20%, além de eliminar o uso de sulfato ferroso amoniacal nessa análise, gerando economia de resíduos e recursos.

A preparação prévia da solução digestora em grandes volumes e armazenada em frascos de vidro âmbar, tendo em vista que o cromo hexavalente pode ser reduzido sob influência da luz (Wang et al., 2009), pode tornar o processo de quantificação de carbono mais ágil, uma vez que não haveria a necessidade de construção de curvas padrão a cada análise, necessitando de nova curva apenas quando a solução necessitar ser refeita.

Além das reduções de volumes e concentrações já citadas, estima-se que com a adoção desta metodologia, ocorra uma redução de 20% no tempo gasto para analisar grandes números de amostras, como nas análises realizadas no laboratório de Biologia do Solo da Embrapa Arroz e Feijão, em que há uma demanda média de 100 amostras por ano por projeto de pesquisa.

## CONCLUSÕES

O uso da espectrofotometria apresenta eficiência equivalente à titrimetria na quantificação do carbono da biomassa microbiana.

A adoção da espectrofotometria reduz em até dez vezes o volume de resíduos produzidos na análise em comparação com a titrimetria.

A espectrofotometria torna-se uma opção atraente, pois a redução da concentração molar do dicromato utilizado e a menor produção de resíduos diminuem os riscos de contaminação do manipulador e do ambiente.

**Tabela 5.** Comparação entre os valores médios das triplicatas de cada repetição, obtidos por titrimetria e espectrofotometria (600 e 650 nm), nas duas profundidades analisadas (Latossolo Vermelho, Mata, Santo Antônio de Goiás-GO)

*Table 5.* Comparison between the mean values of triplicates of each replication, obtained by titrimetry and spectrophotometry (600 and 650 nm), in both analyzed depths (Red Latossol, Forest, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brazil)

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

CV = coeficiente de variação;  $C_{mic}$  = carbono da biomassa microbiana. Valores seguidos de mesma letra na coluna, para cada profundidade, não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste Scott-Knott

## LITERATURA CITADA

- American Society for Testing and Materials - ASTM. Standart test methods for chemical oxygen demand (dichromate oxygen demand) of water, D1252-95, ASTM Annual Book of Standards. Philadelphia, Pa: American Society Testing & Materials, 1995.
- Duda, G. P.; Monteiro, M. T.; Salviano, A. L.; Guerra, J. G. M. Comparação entre métodos colorimétrico e titrimétrico para determinação de carbono microbiano. Caatinga, v.18, n.1, p.51-57, 2005.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2006. 306p.
- Espinoza-Quiñones, F.R.; Szymanski, N.; Palácio, S.M.; Módenes, A.N.; Rizzutto, M.A.; Silva Jr, R.G.; Oliveira, A.P.;

- Oro, A.C.P.; Martin, N. Inhibition effect on the *Allium cepa* L. root growth when using hexavalente chromium-doped river waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.86, n.6, p.767-771, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-009-9682-z>
- Feigl, B.J.; Sparling, G.P.; Ross, D.J. Soil microbial in Amazonian soils: evaluation of methods and estimatives of pool sizes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.27, n.11, p.1467-1472, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00063-K](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(95)00063-K)
- Ferreira, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos. Anais. São Carlos: UFSCAR. p. 255-258.
- Ferreira, E.P.B.; Santos, H.P.; Costa, J.R.; De-Polli, H.; Rumjanek, N.G. Microbial soil quality indicators under different crop rotations and tillage management. *Revista Ciência Agronômica*, v.41, n.2, p.177-183, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902010000200002>
- Franzuebbers, A.J.; Haney, R.L.; Hons, F.M. Relationships of chloroform fumigation-incubation to soil organic matter pools. *Soil Biology & Biochemistry*, v.31, n.3, p.395-405, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00142-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00142-4)
- Graner, C.A.F.; Zuccari, M.L.; Pinho, S.Z. Determinação da demanda química de oxigênio em águas por espectrofotometria simultânea dos íons crômio (III) e dicromato. *Eclética Química*, v.23, p.31-44, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46701998000100003>
- Kotás, J.; Stasicka, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, v.107, n.3, p.263-283, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00168-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00168-2)
- Matsuoka, M.; Mendes, I.C.; Loureiro, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.27, n.3, p.425-433, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832003000300004>
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.S. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.
- O'Brien, T.J.; Witcher, P.; Brooks, B.; Patierno, S.R. DNA polimerase zeta is essential for hexavalent chromium-induced mutagenesis. *Mutation Research*, v.663, n.1-2, p.77-83, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.01.012>
- Scott, A.J.; Knott, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, v.30, n.3, p.507-512, 1974. <http://dx.doi.org/10.2307/2529204>
- Spedding, T.A.; Hamel, C.; Mehuys, G.R.; Madramootoo, C.A. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 36, n. 3, p.499-512, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.026>
- Stout, M.D.; Herbert, R.A.; Kissling, G.E.; Collins, B.J.; Travlos, G.S.; Witt, K.L.; Melnick, R.L.; Abdo, K.M.; Malarkey, D.E.; Hooth, M.J. Hexavalent chromium is carcinogenic to F344/N rats and B6C3F1 mice after chronic of oral exposure. *Environmental Health Perspectives*, v.117, n.5, p.716-722, 2008. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0800208>
- Tate, K.R.; Ross, D.J.; Feltham, C.W. A direct extraction method to estimative soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biology and Biochemistry*, v.20, n. 3, p.329-335, 1988. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90013-2](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(88)90013-2)
- Vance, E.D.; Brookes, P.C.; Jenkinson, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, n.6, p.703-707, 1987. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Wang, S.L.; Chen, C.C.; Tzou, Y.M.; Hsu, C.L.; Chen, J.H.; Lin, C.F. A mechanism study of light-induced Cr (VI) reduction in an acidic solution. *Journal of Hazardous Materials*, v.164, n.1, p.223-228, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.145>