



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010.
Centro de Convenções do SESC

Construção de modelos para a quantificação da biomassa microbiana do solo através de espectroscopia de refletância no infravermelho médio

Tatiana Maris Ferraresi⁽¹⁾; Enderson Petrônio de Brito Ferreira⁽²⁾; Beáta Emoke Madari⁽³⁾; Ladislau Martin-Neto⁽⁴⁾; Wilson Tadeu Lopes da Silva⁽⁵⁾

(1) Analista, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, Km 12, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP: 75375-000 tatiana@cnpaf.embrapa.br (apresentadora do trabalho); (2) Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, Km 12, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP: 75375-000, enderson@cnpaf.embrapa.br; (3) Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, Km 12, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP: 75375-000, madari@cnpaf.embrapa.br; (4) Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, 1452, Centro, São Carlos, SP, CEP: 13560-970, martin@cnpdia.embrapa.br; (5) Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, 1452, Centro, São Carlos, SP, CEP: 13560-970, wilson@cnpdia.embrapa.br.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi propor um novo método de determinação da biomassa microbiana, através do uso da espectroscopia no infravermelho. Amostras provenientes de fazendas experimentais da Embrapa foram utilizadas na calibração multivariada (PLS) e resultados satisfatórios foram obtidos para carbono e nitrogênio microbianos.

Palavras-chave: calibração multivariada, modelo preditivo, PLS.

INTRODUÇÃO – A biomassa microbiana do solo, definida por Jenkinson e Ladd (1981) como os organismos menores que $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ tem participação fundamental nos ciclos biogeoquímicos de interesse para a produtividade agrícola, atuando nos ciclos de C, N, P e S. Além da decomposição da matéria orgânica, estes microrganismos promovem a estabilização de agregados do solo através da liberação de substâncias cimentantes como polissacarídeos e outros produtos do seu metabolismo (CANELLAS et al, 2008; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em razão dessa participação em processos químicos, enzimáticos e físicos do solo, a biomassa microbiana tem sido utilizada, em conjunto com outros parâmetros, na avaliação da qualidade do solo e da sustentabilidade de sistemas produtivos, assim como no monitoramento do impacto e degradação de poluentes e xenobióticos (KASCHUK et al., 2010).

A respiração basal do solo também é atribuída, em grande parte, como resultado da atividade microbiana (BALOTA et al., 1998), sendo os coeficientes microbiano (qMIC) e metabólico

(qCO₂) muito úteis no estudo da eficiência dos fluxos de nutrientes e energia no solo (SEYBOLD et al., 1999). Além disso, o favorecimento de plantas e microrganismos, promovido pelo revolvimento mínimo do solo, pode ser confirmado por razões entre carbono microbiano e total (C_{MIC}/C_{TOT}) maiores do que um (KASCHUK et al., 2010).

O método fumigação-extração utilizado para a quantificação da biomassa, descrito por Vance et al. (1987), é um dos mais empregados no Brasil. Este método é indicado para solos ácidos, largamente presentes nas propriedades rurais brasileiras. Apresenta ainda outra vantagem, em relação à fumigação-incubação (FI) e à respiração induzida por substrato (SIR): a possibilidade de se quantificar diversos elementos da biomassa microbiana a partir do mesmo extrato.

Apesar dos avanços alcançados por Vance et al (1987), a grande demanda por esse tipo de análise do solo, tendo em vista a busca por manejos mais sustentáveis, trouxe a necessidade de métodos mais rápidos e precisos. Desse modo, a variabilidade da eficiência de extração e do rompimento das células na fumigação, somada ao grande número de etapas de preparo de amostra, foram apontados como fatores que reduzem a qualidade dos resultados. Tais fatores também acrescentam custo e tempo à análise, principalmente se o tratamento do resíduo for considerado nestes cálculos.

Por serem diretos, rápidos, não-destrutivos e de baixo custo, os métodos espectroscópicos têm sido indicados para análise de solos (VISCARRA-ROSSEL et al., 2006), em substituição aos métodos titulométricos tradicionais. A espectroscopia de

refletância no infravermelho médio (DRIFTS) proporciona uma ampla caracterização da matéria orgânica e tem sido estudada na análise quantitativa de componentes do solo desde 1995 (BEM-DOR; BANIN, 1995).

O desafio atual é construir modelos preditivos confiáveis para a quantificação de componentes do solo por DRIFTS, através de calibração multivariada, utilizando como referência resultados obtidos com métodos tradicionais. No presente estudo, o objetivo foi obter modelos para a quantificação de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, respiração basal do solo e quocientes microbiano e metabólico, e razão C/N microbianos; por meio do uso da espectroscopia no infravermelho (DRIFTS), utilizando como valores de referência, aqueles obtidos por métodos tradicionais de análise.

MATERIAL E MÉTODOS – Locais de coleta – Foram coletadas amostras superficiais (0-10 cm) em fazendas experimentais da Embrapa Arroz e Feijão (Fazenda Capivara) e da Embrapa Pecuária Sudeste (Fazenda Canchim), localizadas em Santo Antônio de Goiás-GO e em São Carlos-SP, respectivamente.

A Fazenda Capivara é constituída, em sua maior parte, de Latossolo Vermelho distrófico típico, de textura argilosa ou muito argilosa. Nesta fazenda experimental foram obtidas 114 amostras de solo, provenientes de diferentes experimentos com cultivo de arroz, feijão, café, banana e pastagens em sistemas de integração lavoura-pecuária, agricultura orgânica e irrigação por pivô central, acrescentadas de amostras de matas com predominância de vegetação nativa de Cerrado. A amostragem foi realizada nos meses de fevereiro, outubro e novembro de 2009.

Já na Fazenda Canchim, composta por uma grande diversidade de solos com texturas variando de muito argilosa a areia franca, a coleta incluiu solos sob pastagem, cana, alfafa e aveia, além de áreas com vegetação nativa de Cerrado e Mata Atlântica, somando 57 amostras deste local, perfazendo então 171 amostras no total. O período de coleta em São Carlos se estendeu de maio a agosto de 2009.

Métodos de referência – A biomassa microbiana foi quantificada pelo método descrito por Vance et al. (1987), após 7 dias de incubação do solo em temperatura ambiente com ausência de luz. O carbono orgânico total (COT) foi quantificado pelo método Walkley-Black modificado por Embrapa Solos (1997). O quociente metabólico (qCO_2) foi determinado pela relação $C-CO_2$ liberado/ C_{MIC} segundo metodologia proposta por Anderson e Domsch (1993), e o quociente microbiano ($qMIC$) foi calculado pela razão entre C_{MIC} e COT. Também foi calculada a razão C/N microbianos (C_{MIC}/N_{MIC}).

Espectroscopia - Para a obtenção dos espectros de solos, as amostras foram secas ao ar, trituradas em moinho de bolas, passadas em peneiras de 0,250 mm e analisadas em espectrômetro de infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}), com resolução de 16 cm^{-1} e acumulação de 32 varreduras por espectro.

Foram obtidos espectros de refletância transformados automaticamente para absorvância pelo *software* do equipamento. Todos os espectros foram centrados na média e submetidos ao cálculo da 1ª derivada com 5 pontos.

Calibrações - O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi aplicado em 80% das amostras e esta calibração foi validada com os 20% restantes das amostras (validação externa). Foram utilizados os espectros inteiros, sem seleção de bandas, construindo-se modelos de calibração com amostras de cada local, separadamente. Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos modelos foram: número de fatores necessários na calibração (NF), erro percentual relativo (Erro %), coeficiente de regressão linear entre os dados preditos e medidos (R), assim como inclinação e intercepto desta reta. Os modelos foram gerados pelo *software* Pirouette, versão 3.11.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – Os resultados de biomassa microbiana obtidos para todas as amostras estão resumidos nas Tab. 1 e 2.

Obtiveram-se amplas faixas de C_{MIC} e N_{MIC} em ambas as fazendas experimentais, sendo os valores máximos característicos de áreas de preservação permanente (KASCHUK et al., 2010). Com relação aos resultados obtidos para $qMIC$, os valores médios foram de $11,0\text{ mg g}^{-1}$ – para solos da Capivara – e $11,4\text{ mg g}^{-1}$ – para solos da Canchim – atribuindo a C_{MIC} uma participação de, em média, 1,25 % no carbono orgânico total e enquadrando-se dentro da faixa de 1 a 4%, proposta por Jenkinson e Ladd (1981). A faixa obtida neste trabalho, entretanto, foi bem mais ampla, variando de 0,1% a 7,6%.

Analisando-se os valores mínimos, máximos e médios encontrados para o quociente metabólico, percebe-se que foram amostrados solos com diferentes graus de equilíbrio entre a perda de carbono pela respiração e a sua incorporação na biomassa microbiana. Isto pode ser devido ao manejo realizado antes da coleta do solo. Os solos recentemente manejados podem ter contribuído para os altos valores de qCO_2 ao proporcionar a aceleração da decomposição de resíduos vegetais e alta taxa de mineralização de carbono.

Tabela 1. Dados quantificados pelos métodos de referência para amostras da Fazenda Canchim

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio*	CV**
${}^1C_{MIC}$	28,3	762,8	281,7	5,4	1,9
${}^1N_{MIC}$	23,7	385,3	114,5	13,7	12

² RB	0,5	2,8	1,4	0,02	1,4
³ qCO ₂	0,9	42,9	7,5	0,25	3,3
CN _{MIC}	0,9	13,1	2,9	0,4	13,9
⁴ qMIC	1,0	75,7	11,0	nd ⁷	nd ⁷

¹ mg Kg⁻¹ solo; ² mg C-CO₂ Kg⁻¹ h⁻¹; ³ μg C-CO₂ mg C⁻¹ h⁻¹; ⁴ mg g⁻¹; ⁶ coeficiente de variação (%); ⁷ nd = não determinado. *valores de desvio padrão e coeficiente de variação calculados para as triplicatas de volume obtidos na titulação.

Tabela 2. Dados quantificados pelos métodos de referência para amostras da Fazenda Capivara

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio*	CV ⁶ *
¹ C _{MIC}	45,4	984,9	314,0	12,6	4,0
¹ N _{MIC}	7,2	116,2	51,9	5,9	11,4
² RB	0,0	8,4	2,2	0,1	2,5
³ qCO ₂	0,0	42,9	7,0	0,5	6,5
CN _{MIC}	0,6	39,8	5,7	0,9	15,4
⁴ qMIC	1,6	26,9	11,4	nd ⁷	nd ⁷

¹ mg Kg⁻¹ solo; ² mg C-CO₂ Kg⁻¹ h⁻¹; ³ μg C-CO₂ mg C⁻¹ h⁻¹; ⁴ mg g⁻¹; ⁶ coeficiente de variação (%); ⁷ nd = não determinado. *valores de desvio padrão e coeficiente de variação calculados para as triplicatas de volume obtidos na titulação.

Essas diferenças entre solos de diversas origens e manejos, detectadas através dos resultados de análises tradicionais, também podem ser observadas nos espectros de infravermelho. Isto porque as variações nos teores de matéria orgânica e argilominerais interferem na frequência e na intensidade em que ocorrem as bandas de absorção.

Alguns dos espectros obtidos em DRIFTS são apresentados na Fig. 1. As bandas de absorção refletem os movimentos de vibração de grupos funcionais característicos. Mesmo sendo o solo uma matriz muito complexa, é possível detectar a presença de grupamentos como hidroxilas (νO-H em 3600-3500 e 3200 cm⁻¹), metilas e metilenos (νC-H em 2950-2800 cm⁻¹), aminas (νN-H em 3450-3200 cm⁻¹), amidas (δN-H em 1600 e 1500 cm⁻¹) e carbonilas (νC=O em 1780-1670 cm⁻¹).

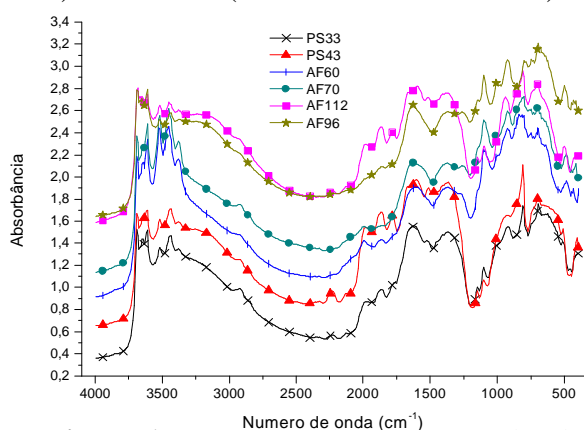


Figura 1. Espectros de amostras coletadas na Embrapa Arroz e Feijão (AF) e na Embrapa Pecuária Sudeste (PS).

É possível verificar diferenças espectrais até mesmo entre as amostras de mesma localidade, porém sob diferentes usos, como, por exemplo, entre as amostras PS33 (Mata Nativa) e PS43 (Pastagem), ou, entre AF112 (Pastagem) e AF96 (Integração

lavoura-pecuária). Entretanto, essas diferenças podem indicar, além de variações nos conteúdos de matéria orgânica, uma influência também dos minerais de origem dos solos sobre os perfis espectrais, pois alguns deles também absorvem no infravermelho, assim como os componentes orgânicos.

Apesar da interferência da matriz mineral dos solos nos resultados de absorbância, houve boa correlação destes com a biomassa microbiana do solo. Já a atividade microbiana, medida através da respiração basal, resultou em baixo coeficiente de regressão. Estes resultados são apresentados nas Tab. 3 e 4.

Tabela 3. Modelos construídos com amostras da Fazenda Canchim – 57 amostras

Modelo	NF	Intercepto	Inclinação	R	Erro (%)
C _{MIC}	5	113,8	0,7	0,82	75,6
N _{MIC}	6	25,2	0,8	0,73	52,5
RB	3	1,5	0,0	0,06	51,4
qCO ₂	2	7,7	0,1	0,58	93,5
C/N _{MIC}	1	3,7	-0,2	-0,40	79,6
qMIC	1	9,0	0,2	0,46	120,9

Tabela 4. Modelos construídos com amostras da Fazenda Capivara – 114 amostras

Modelo	NF	Intercepto	Inclinação	R	Erro (%)
C _{MIC}	6	202,2	0,5	0,50	53,7
N _{MIC}	9	13,8	0,9	0,75	33,7
RB	3	1,5	0,3	0,39	55,0
qCO ₂	2	6,2	0,4	0,48	59,5
C/N _{MIC}	3	6,5	0,1	0,10	45,3
qMIC	8	10,1	0,2	0,16	56,0

Os erros envolvidos na predição dos dados pela espectroscopia foram altos devido à imprecisão dos métodos de referência e, principalmente, das diferenças de matriz. Erros mais baixos foram alcançados com um número maior de amostras e maior homogeneidade de matriz (latossolos de textura argilosa) como mostra a Tab. 4.

Destacaram-se os modelos C_{MIC} (Canchim) e N_{MIC} (Capivara) com coeficientes de regressão (R) e inclinação mais próximos de um.

Devido à ampla faixa de valores de C_{MIC} e N_{MIC}, foram necessários entre 5-9 componentes principais (ou fatores) na construção desses modelos. O intercepto da reta de calibração reflete a interferência de argilominerais. Assim, observa-se que essa interferência é maior na predição de C_{MIC} do que de N_{MIC}, pois os sinais que envolvem ligações com carbono são mais abundantes, enquanto que as bandas resultantes de ligações aminas e aminas estão localizadas nas regiões de 3400 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹, onde podem ocorrer sobreposições somente com alguns minerais como smectita, caulinita e gibbsita (RUSSELL e FRASER, 1994).

Os gráficos dos valores medidos versus preditos por esses dois modelos são mostrados na Fig. 2. A

reta indica situação ideal, onde os valores preditos são iguais aos medidos.

A

B

Figura 2. Gráficos dos valores preditos versus medidos para as amostras de validação. (A) C_{MIC} para as amostras da Fazenda Canchim; (B) N_{MIC} para as amostras da Fazenda Capivara.

CONCLUSÕES – Os resultados desse estudo mostraram que a espectroscopia é uma ferramenta útil na determinação da biomassa microbiana do solo, superando limitações dos métodos tradicionais de análise, como tempo e custo. Resultados mais precisos poderão ser obtidos aprofundando-se o estudo do efeito da matriz do solo sobre os espectros e escolhendo-se grupos amostrais mais homogêneos para a calibração e para a validação.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environment conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 393-395, 1993.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 22, p. 641-649, 1998.
- BEN-DOR, E.; BANIN, A. Near-Infrared analysis as a rapid method to simultaneously evaluate several soil properties. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, p. 364-372, 1995.
- CANELLAS, L. P.; MENDONÇA, E. S.; DOBBSS, L. B.; BALDOTTO, M. A.; VELOSO A. C. X.; SANTOS, G. A.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. Reações da matéria orgânica. In: SANTOS, G.de A.; CAMARGO, F.A.de O. (Ed.) **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 45-61.
- EMBRAPA SOLOS. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 212p.
- JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A. ; LADD, J. N. **Soil Biochemistry**, 10 ed., v. 5, 1981. p. 415-473.
- KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUGRIA, M. Three decades of soil biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 1-13, 2010.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- RUSSELL, J. D.; FRASER, A. R. Infrared methods. In: WILSON, M. J. (Ed.) **Clay mineralogy: spectroscopy and chemical determinative methods**. London: Chapman e Hall, 1994. cap. 2.
- SEYBOLD, C.A., HERRICK, J.E., BREJDA, J.J., 1999. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. **Soil Science**, v. 164, p. 224-234.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 703-707, 1987a.
- VISCARRA-ROSSEL, R.A.; WALVOORT, T.D.J.J.; MCBRATNEY, A.B.; JANIK, L.J.; SKJEMSTAD, J.O. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. **Geoderma**, v. 131, p. 59-75, 2006.