

# ARTIGO DE REVISÃO

## MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO: FUNDAMENTOS, APLICABILIDADE E PERSPECTIVAS FUTURAS

MILTON ANTONIO SEGANFREDO<sup>1</sup>

**RESUMO** - A biomassa microbiana (BM) do solo é um componente fundamental para o entendimento da ciclagem da matéria orgânica, nutrientes e fluxo de energia no solo. Os métodos mais utilizados para a sua determinação são o da microscopia direta (biovolume), os químicos (ATP=trifosfato de adenosina e fumigação-extração=FE) e os fisiológicos (fumigação-incubação=FI e respiração induzida por substrato=RI). O do biovolume é considerado subjetivo e trabalhoso, enquanto que os químicos e fisiológicos possuem melhor precisão e maior abrangência quanto à diversidade de solos. Para solos alagados, os métodos testados têm sido os mesmos que para os solos bem drenados, sendo que o do ATP mostrou-se inadequado, o FE e variantes do FI e RI, aplicáveis. A terminologia predominante na literatura não se refere à biomassa microbiana total, mas a alguns dos seus componentes, como carbono, nitrogênio ou nitrogênio microbiano reativo à ninhidrina. As perspectivas indicam um uso mais intensivo, a curto prazo, dos métodos do ATP, IR, FI e FE, seguindo-se a popularização dos métodos para a determinação da biomassa de grupos específicos e em etapas subseqüentes, dos métodos de biologia molecular para a individualização dos componentes da biomassa microbiana.

*Palavras-chave:* Carbono, nitrogênio, ninhidrina, respiração microbiana, ATP microbiano.

### METHODS FOR SOIL MICROBIAL BIOMASS ASSESSMENT: THEIR PRINCIPLES, APPLICABILITY AND FUTURE TRENDS

**ABSTRACT** - The soil microbial biomass is of paramount importance for the understanding of the organic matter turnover, nutrient cycling and energy flux in the soil. The most widespread and correlated methods are direct microscopy for fluorescent stained microorganisms (Biovolume), the chemical methods (ATP=adenosine triphosphate and fumigation-extraction=FE), and the physiological methods (fumigation-incubation=FI and substrate induced respiration=SIR). The biovolume method is rather subjective and time consuming, while the chemical and physiological methods are of better reproducibility and applied to a wider range of soils. For lowland soils, the methods tested are basically the same as for upland soils. The data available show that the FE and modified versions of FI and SIR have a satisfactory performance, but the original ATP method seems to be unsuitable. The expression usually found in the literature does not refer to the total microbial biomass, but rather to specific components of the biomass like C, N and ninhydrin reactive nitrogen. For the forthcoming years, significant increase in research is expected involving ATP, SIR, FI and FE methods in organic matter turnover and energy cycling. The flourishing methods for biomass assessment of particular groups of microorganisms as well as the molecular techniques for the identification of individual components of the biomass are also expected to become more popular.

*Key words:* Carbon, nitrogen, ninhydrin, microbial respiration, microbial ATP.

## INTRODUÇÃO

A biomassa microbiana (BM) é um dos componentes essenciais para o entendimento da ciclagem de nutrientes, da matéria orgânica e do fluxo de energia no solo. Conceitualmente, a BM é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo, excetuando-se os fragmentos de raízes e

animais maiores do que 5000  $\mu\text{m}^3$ , sendo o agente das transformações bioquímicas no solo (JENKINSON e LADD, 1981; WARDLE, 1994). No ciclo natural da vida do solo, a biomassa dos organismos mortos constitui-se em fonte de nutrientes prontamente disponíveis para as plantas, pois os mesmos estarão em formas mais facilmente recicláveis do que aqueles contidos na matéria

1. Eng. Agr., M.Sc. - Pesquisador, Ciência do Solo, CNPSA/EMBRAPA, Caixa Postal 21, 89700-000 Concórdia, SC.

E-mail: [milton@cnpsa.embrapa.br](mailto:milton@cnpsa.embrapa.br)

Recebido para publicação em 15/09/1997.

orgânica estabilizada (JENKINSON, 1988).

Na pesquisa de métodos para a determinação da BM, um dos maiores avanços ocorreu com o desenvolvimento do método da fumigação-incubação (FI) por JENKINSON e POWLSON (1976). Este método foi posteriormente aperfeiçoado por outros pesquisadores, como VORONEY e PAUL (1984); PARKINSON e PAUL (1982); VANCE et al. (1987a); JOERGENSEN e BROOKES (1990); WU et al. (1990). Além do FI, outros métodos estão disponíveis e são considerados úteis para a avaliação das condições biológicas do solo, especialmente para aqueles bem drenados, para os quais foram desenvolvidos. Para solos alagados ou sujeitos a ciclos de alagamento e secagem, entretanto, a bibliografia disponível ainda é escassa.

Neste trabalho serão abordados os princípios, limitações e a aplicabilidade de alguns métodos para determinação da BM para solos bem drenados e solos sujeitos ao alagamento, por períodos curtos ou prolongados, e as perspectivas futuras de sua utilização.

## OS PRINCIPAIS MÉTODOS CORRELACIONADOS ENTRE SI

Em função, principalmente, de limitações metodológicas, significado ecológico e dificuldade de interpretação dos resultados, diversos métodos precursores, como a clássica contagem em placas de Petri, não serão abordados neste trabalho. Este será concentrado em métodos mais precisos correlacionados entre si, como os químicos, os fisiológicos e o de microscopia direta (HORWATH e PAUL, 1994).

### Método da microscopia direta (Biovolume)

Este método é baseado na concepção de que a observação, ao microscópio, de microrganismos preparados com corantes específicos é a maneira mais direta de medir seu número e tamanho e, posteriormente, converter o biovolume para BM. Os dados sobre a aplicabilidade deste método para solos alagados são escassos, mas, numa versão modificada, já se mostrou igualmente funcional (INUBUSHI et al., 1984). Para solos bem drenados, este método é freqüentemente utilizado como padrão, sendo a expectativa geral de que todos os demais métodos apresentem boa correlação com o mesmo (SCHMIDT e PAUL, 1982). O

método é, entretanto, de alto custo, muito trabalhoso e possui diversas dificuldades técnicas de execução, as quais limitam sua aplicabilidade e, freqüentemente, geram incertezas quanto aos resultados obtidos (JENKINSON, 1988; MARTENS, 1995).

## Métodos fisiológicos

**Respiração induzida por substrato (RI)** - Este método segue o princípio de que os solos apresentam taxa de respiração diferenciada e própria de suas características, quando um substrato, prontamente disponível e em concentração adequada, é adicionado aos mesmos. Esta taxa, medida através do CO<sub>2</sub> liberado antes do aumento da população microbiana, pode ser tomada como um índice da biomassa de carbono, desde que o mesmo seja calibrado com um método padrão para a determinação da BM (ANDERSON e DOMSCH, 1978).

Usando a glicose como substrato e calibrando este método com o da fumigação-incubação a 22° C, ANDERSON e DOMSCH (1978), obtiveram a seguinte equação:  $Y = 40X + 0,37$ , onde Y = mg de biomassa de carbono (biomassa de C)/100 g solo, e X = taxa de respiração ml/100 g solo a 22° C. Para se calcular a biomassa microbiana, deve-se dividir o valor de biomassa de C pelo fator 0,475, o qual representa a proporção de carbono em relação ao peso da biomassa microbiana desidratada. Geralmente, no entanto, os valores são expressos em biomassa de C, ou seja, um dos componentes da biomassa microbiana total e não esta, propriamente dita. O cálculo da biomassa de N pode ser feito dividindo-se o valor da biomassa de C pelo fator 6,7, que é obtido da relação C/N média dos microrganismos do solo. O método RI foi desenvolvido para solos agrícolas bem drenados e, na sua versão original, não foi proposto para solos alagados (ANDERSON, 1990). No entanto, existem diversos relatos de sua utilização bem sucedida em versões modificadas, para solos sujeitos ao alagamento e incubações anaeróbias. WEST e SPARLING (1986) solucionaram o problema, representado pelo excesso de umidade de amostras de solos da Nova Zelândia, sujeitos a ciclos de umedecimento e secagem, mediante o emprego de incubações anaeróbias de suspensões líquidas de glicose. Utilizando solos da Escócia, RITZ e WHEATLEY (1989) também demonstraram que o fator umidade antecedente não interfere nas

determinações de BM, quando se procede a incubação em condições anaeróbias com as amostras mantidas em agitação contínua. OCIO e BROOKES (1990) usaram um procedimento similar e concluíram que a equação originalmente proposta por ANDERSON e DOMSCH (1978) não necessitava de alterações em função da modificação efetuada. Incubações anaeróbias foram também utilizadas por HASSINK (1993) e HARDEN et al.

(1993). Uma das grandes desvantagens deste método é a necessidade de equipamentos sofisticados para a detecção de gases, o que o torna muito caro. O método é, no entanto, bastante vantajoso para estudos da biomassa ativa e de suas flutuações causadas por distúrbios antropogênicos.

Resultados de biomassa de C obtidos por este método são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Biomassa de C, determinada pelo método respiração induzida (RI)

Tipo de solo	Condição ecológica	Biomassa <sup>1</sup>	
		Biomassa de C ug/g de solo	Referência
Argiloso	aveia	793	ANDERSON e DOMSCH (1978)
Franco-arenoso	—	302	GRISI e GRAY (1986)
Arenoso	trigo	350	OCIO e BROOKES (1990)
Argiloso	trigo	700	OCIO e BROOKES (1990)
Aluvial	rotação	301	HARDEN et al. (1993)
Aluvial	pastagem	726	HARDEN et al. (1993)
Argiloso	rotação	45	INSAM et al. (1991)
Areno-argiloso	rotação	171	INSAM et al. (1991)
Franco-arenoso	rotação	229	INSAM et al. (1991)
Aluvial	rotação	231	ANDERSON e DOMSCH (1986)
Arenoso	floresta	1760	ANDERSON e DOMSCH (1986)

1. Biomassa de C =  $40X + 0,37$ . X = taxa de respiração microbiana em ml/100g solo

**Fumigação - incubação** - Este método segue o princípio que depois da fumigação, dissipação dos resíduos do fumigante e reinoculação, uma amostra de um determinado solo apresentará, após algumas horas, uma taxa de respiração superior a de outra amostra não fumigada do mesmo solo. A diferença entre as taxas de liberação de CO<sub>2</sub>, da amostra fumigada para a não fumigada, resulta no denominado pico de liberação de CO<sub>2</sub>, que é proporcional ao tamanho da população microbiana originalmente presente no solo. Na essência, esse pico é resultante da atividade bioquímica da população recolonizadora, atuando na decomposição das células microbianas mortas pelo fumigante.

A utilização deste método envolve algumas pressuposições que são resumidas por JENKINSON e LADD (1981): o carbono e o nitrogênio dos microrganismos mortos são mineralizados mais rapidamente do que o carbono e o nitrogênio dos microrganismos vivos; a fumigação mata completamente os microrganismos; os microrganismos mortos nos solos não fumigados um fator negligível em relação àqueles do solo fumigado; o único efeito da fumigação é o de matar

os microrganismos; a fração do carbono e nitrogênio mineralizados, proveniente da BM morta num determinado período, não é diferente para solos diferentes; o solo não deve ser seco por qualquer processo, pois isso pode provocar a liberação de carbono não microbiano e matar parte da população existente.

Usando o método FI, é possível calcular tanto a biomassa de C quanto a biomassa de N. Para a biomassa de C, os cálculos são feitos através da equação: biomassa de C = F/Kc, onde biomassa de C = biomassa de carbono microbiano, F = diferença entre o carbono liberado do solo fumigado e solo não fumigado, Kc = fração de carbono da BM mineralizado durante a incubação. O fator Kc foi estabelecido em 0,50, para incubações a 25° C, por JENKINSON e POWLSON (1976) e, após, em 0,411 por ANDERSON e DOMSCH (1978), para incubações a 22° C, e 0,41 por VORONEY e PAUL (1984), em condições de campo. O fator mais empregado é, no entanto, o de 0,45 apresentado por JENKINSON (1988). Para biomassa de N, utiliza-se a equação: biomassa de N = F/Kn, onde biomassa de N = biomassa de N, F =

diferença entre o nitrogênio liberado do solo fumigado e solo não fumigado,  $K_n$  = fração de nitrogênio da biomassa, mineralizado durante a incubação. O  $K_n$  foi estabelecido em 0,68 por SHEN et al. (1984), para incubações a 25° C, e redefinido para 0,54 por BROOKES et al. (1985b) e 0,57 por JENKINSON (1988). As variações nos fatores  $K_c$  e  $K_n$  devem-se à metodologia de sua determinação, a partir de estudos com  $N_{15}$ , a campo, ou de culturas *in vitro* dos grupos considerados (fungos, bactérias, actinomicetos etc., ou populações mistas), e do tipo de substrato predominante ou adicionado no ambiente de referência (ANDERSON e DOMSCH, 1978; VORONEY e PAUL, 1984; JENKINSON, 1988). Para o cálculo da biomassa microbiana, partindo-se das análises do carbono orgânico, divide-se o valor da biomassa de C pelo fator médio de 0,475. Quando se parte das análises de nitrogênio, converte-se, primeiramente, os valores de biomassa de N para biomassa de C através da multiplicação pelo fator 6,7 (relação C/N média dos microrganismos do solo) e, após isso, converte-se o valor de biomassa de C para biomassa microbiana, mediante a divisão pelo fator 0,475. Destaca-se que, também, para este método, os valores geralmente expressos na literatura referem-se a um dos componentes da biomassa e não à biomassa microbiana total.

Quanto à aplicabilidade do método FI para solos bem drenados, os resultados obtidos tanto para carbono, quanto para nitrogênio, têm apresentado boa correlação com o do biovolume, do trifosfato de adenosina (ATP) e do RI (SHEN et al., 1984). No entanto, o método original mostra-se limitado para solos muito ácidos (pH < 4,2), solos calcários, solos com altos teores ou com adições recentes de matéria orgânica, e para solos com alta concentração de alumínio (VANACE et al., 1987b; JENKINSON, 1976).

Embora existam algumas alternativas para minimizar as citadas restrições e assim possibilitar a utilização do método naqueles tipos de solos (CERRI e JENKINSON, 1981; VORONEY e PAUL, 1984; LYNCH e PANTING, 1981), muitas vezes as estimativas, principalmente de biomassa de N, tornam-se apenas uma aproximação do valor real da população original do solo (JENKINSON, 1988). O método FI padrão tampouco não é adequado para solos alagados. Porém, mediante algumas adaptações conforme o sugerido por INUBUSHI et al. (1984), pode ser usado, também, para os solos sob estas condições.

Estimativas de biomassa de C e biomassa de N, pelo FI, são apresentadas na Tabela 2.

**TABELA 2 - Biomassa de C e biomassa de N, determinadas pelo método fumigação-incubação (FI)**

Tipo de solo	Condição ecológica	Biomassa (ug/g solo)	Referência
<b>Biomassa de C</b>			
Muito argiloso	floresta	314	GERALDES et al. (1995)
Muito argiloso	pastagem 4 anos	488	GERALDES et al. (1995)
Muito argiloso	pastagem 15 anos	316	GERALDES et al. (1995)
Grey/várzea	frutíferas	154	PFENNEING et al. (1992)
Argiloso	plântio direto	383	CATTELAN et al. (1997a)
Argiloso	plântio convenc.	242	CATTELAN et al. (1997a)
Argiloso	soja/trigo	532	CATTELAN et al. (1997b)
Arenoso	incubação em laborat.	331	MINHONI et al. (1996)
Areno-argiloso (1976)	trigo	470	JENKINSON e POWLSON
Areno-argiloso (1976)	trigo	220	JENKINSON e POWLSON
Franco-argiloso	pastagem	369	CATTELAN (1989)
Franco-argiloso	rotação	244	CATTELAN (1989)
Argiloso	pastagem alagada	500	ROSS et al. (1985)
Franco-siltoso	pastagem várzea	729	WEST et al. (1986)
Franco-siltoso	pastagem várzea	782	WEST et al. (1986)
<b>Biomassa de N</b>			
Franco-siltoso	pastagem várzea	209	WEST et al. (1986)
Franco-siltoso	pastagem várzea	212	WEST et al. (1986)
Franco-siltoso	pastagem	60	BROOKES et al. (1985)

TABELA 2 - Continuação

Silt.-argiloso	pastagem nativa	239	BROOKES et al. (1985)
Argiloso	pastagem nativa	280	ROSS et. al. (1985)

1. Biomassa de C =  $(F - NF)/k$ . F = carbono orgânico da amostra fumigada; NF = carbono orgânico da amostra não fumigada; k = fração do carbono mineralizado durante a incubação

### Métodos químicos

Esses métodos são baseados na extração, por produtos químicos, de algum composto ou conjunto de compostos presentes em todos os indivíduos da população microbiana e ausente nos demais constituintes do solo, exceto para o método da fumigação-extração (FE). O método FE utiliza um processo único de extração envolvendo, simultaneamente, todos os grupos de microrganismos, enquanto que os outros métodos envolvem, em geral, a extração de compostos específicos para a determinação de BM de grupos pré definidos de microrganismos.

Entre os principais compostos já testados para a determinação de BM estão o ácido murâmico, para biomassa de procarióticos, fósfo-lipídeos, para biomassa de bactérias, ácido teicóico, para biomassa de microrganismos Gram-positivos, ácido 3-hidroximerístico, para microrganismos Gram-negativos, quitina e ergosterol, para biomassa fúngica, o trifosfato de adenosina (ATP) e os ácidos nucleicos RNA e DNA. Dentre os compostos citados, aquele de metodologia mais prática e operacional tem sido o trifosfato de adenosina (ATP) (JENKINSON e LADD, 1981).

**Método do trifosfato de adenosina (ATP).** O método está fundamentado no princípio de que o ATP está presente em todas as células vivas e pode ser quantificado através do sistema enzimático luciferina-luciferase (OADES e JENKINSON, 1979). Após a extração do ATP das células, pode-se calcular a biomassa de C, multiplicando-se o conteúdo de ATP por um fator resultante da taxa constante existente entre o conteúdo de ATP e o

de carbono orgânico da BM. Para solos cultivados, este fator médio é de 171 (TATE e JENKINSON, 1982). A média calculada para este fator, por JENKINSON (1988), a partir de dados de literatura abordando exclusivamente extrações ácidas e de solos pré-incubados, foi de 169. Assim, a biomassa microbiana total, utilizando-se o método do ATP, poderá ser calculada através da equação: biomassa de C = (conteúdo de ATP x 169) e a BM total, através da equação  $BM\ total = (conteúdo\ de\ ATP\ x\ 169) / 0,475$ . Igualmente ao mencionado para o método anterior, os resultados geralmente são expressos como biomassa de ATP ou o equivalente em biomassa de C, e não como biomassa microbiana total.

Para solos bem drenados o método tem demonstrado boa correlação com o do biovolume, respiração induzida (RI), fumigação - incubação (FI) e fumigação - extração (FE) (GRISI e GRAY, 1986; OCIO e BROOKES, 1990; HORWATH e PAUL, 1994). Um dos pontos críticos do método é o processamento do solo, pois a temperatura e o tempo de armazenamento podem interferir de tal maneira nos resultados, que os teores de ATP determinados em laboratório podem não refletir adequadamente os teores existentes em condições de campo (JENKINSON e LADD, 1981). Para solos alagados, o método, originalmente proposto por OADES e JENKINSON (1979), mostrou-se inadequado, por subestimar, muito, os resultados nestas condições, o que está relacionado ao estado de baixa energia no qual operam os microrganismos anaeróbios (INUBUSHI et al. 1989a).

Alguns resultados de biomassa de ATP são apresentados na Tabela 3.

TABELA-3. Resultados de biomassa de ATP

Tipo de solo	Condição ecológica	Biomassa de ATP ug/g de solo	Referência
Argiloso	pastagem alagada	8,04	ROSS et al. (1985)
Franco-siltoso	pastagem	4,08	ROSS et al. (1980)
Franco-arenoso	pastagem	2,20	ROSS et al. (1980)

TABELA 3 - Continuação

Franco-siltoso	pastagem várzea	5,12	WEST et al. (1986)
Franco-siltoso	pastagem várzea	7,72	WEST et al. (1986)
Franco-siltoso	pastagem várzea	3,67	WEST et al. (1986)
Franco-siltoso	pastagem várzea	4,86	WEST et al. (1986)
Franco-arenoso	rotação de culturas	1,26	OCIO e BROOKES, (1990)
Franco-arenoso	solo+palha de trigo	3,16	OCIO e BROOKES, (1990)
Argiloso	rotação de culturas	6,60	OCIO e BROOKES, (1990)
Argiloso	solo+palha de trigo	7,90	OCIO e BROOKES, (1990)
Areno-siltoso	pomar com mulch	1,70	AHMED et al. (1982)
Argiloso	trigo/pousio	2,10	AHMED et al. (1982)
Argiloso	pastagem	5,80	AHMED et al. (1982)

Obs. - A biomassa de C pode ser calculada através da equação: biomassa de C = ATP\*169

**Fumigação - extração (FE)** - Este método segue o princípio que a fumigação aumenta os teores totais de C, N e nitrogênio reativos à ninhidrina (NRN), extraíveis, geralmente, por  $K_2SO_4$  ou KCl. Os teores assim extraídos estão diretamente relacionados com os teores de C e N liberados dos microrganismos mortos em solos fumigados e incubados pelo método FI. Desta forma, a biomassa de C, N, P ou S pode ser determinada logo após concluída a fumigação, que dura 24h, realizando-se, a partir daí, os mesmos procedimentos analíticos do método FI (BROOKES et al., 1985a,b; JENKINSON, 1988; AMATO e LADD, 1988; BROOKES et al., 1982; VANCE et al., 1987a; SAGGAR et al., 1981).

As evidências de que o C, que se torna extraível após a fumigação, é proveniente da BM foram apresentadas por VANCE et al. (1987a). A partir da relação encontrada entre a BM, pelo método FI, e o C extraível ( $E_c$ ), os autores estabeleceram a equação: biomassa de C =  $(2,64 \pm 0,060) * E_c$ , o que resulta num fator  $KE_c$  de 0,38 (1/2,64).

Calculando o fator  $KE_c$ , a partir de dados publicados em revistas especializadas, JENKINSON (1988) obteve um valor de 0,45. Para solos da América do Norte, HORWATH e PAUL (1994) sugerem 0,35, enquanto que para solos da Oceania o valor sugerido é de 0,33 a 0,35 (ROSS, 1990; SPARLING et al., 1990). Na Europa, porém, o fator mais utilizado ainda é o de 0,45 (JOERGENSEN et al., 1994), sugerido por JENKINSON (1988). O desenvolvimento do processo de oxidação do carbono orgânico, mediante o uso do persulfato de potássio em sistemas automatizados, demonstrou que o fator  $KE_c$  mais adequado é 0,45 (WU et al., 1990), porque no caso da utilização do dicromato de potássio (VANCE et al., 1987,a) via úmida, a oxidação é incompleta.

Para biomassa de N, BROOKES et al. (1985b)

propuseram a seguinte equação: biomassa de N =  $1,85E_n$ , resultando num fator  $Kn = 0,54$  (1/1,85) que, também, mais tarde, foi reconsiderado para 0,45 (JENKINSON, 1988).

Usando KCl como extrator, AMATO e LADD, (1988) demonstraram que o pico de liberação de  $CO_2$  de 25 solos, determinado pelo método FI, esteve estreitamente relacionado com o nitrogênio reativo à ninhidrina (NRN) extraído dos mesmos solos após a fumigação com clorofórmio por 10 dias. Este método foi, posteriormente, considerado muito sensível, pela relação linear existente entre a biomassa de C, biomassa de N e biomassa de NRN com o método ATP em solos com adições recentes de matéria orgânica facilmente decomponível (OCIO e BROOKES, 1990). Posteriormente, WITTER et al. (1993) observaram que o método da BNRN correlaciona-se melhor com o do ATP do que com o da FI. Após a proposição de JOERGENSEN e BROOKES (1990), a biomassa de NRN pode ser calculada, também, a partir de extratos feitos com  $K_2SO_4$  e sem necessidade da incubação por 10 dias. O procedimento sugerido apresentou correlação linear com a biomassa de C e biomassa de N. A equação para o cálculo da biomassa de NRN é:  $(NRNF - NRNNF)$  onde,  $NRNR$  = nitrogênio reativo à ninhidrina da amostra fumigada e  $NRNNF$  = nitrogênio reativo à ninhidrina da amostra não fumigada.

A partir da biomassa de NRN podem ser calculadas; também, a biomassa de C e a biomassa de N, através das seguintes equações: biomassa de C =  $21 * \text{biomassa de NRN}$  e biomassa de N =  $3,1 * \text{biomassa de NRN}$ ; (AMATO e LADD, 1988), para solos da Austrália, e biomassa de C =  $21 * \text{biomassa de NRN}$  e biomassa de N =  $4,95 * \text{biomassa de NRN}$ , para solos da Europa

(OCIO e BROOKES, 1990). Entretanto, em estudos posteriores, envolvendo nove solos da Austrália, SPARLING et al., (1993) observaram que a liberação de NRN, em 24 h de fumigação, foi de apenas 55 % daquele liberado em 10 dias de incubação. Com isso, os fatores seriam de 38,2, para estimar biomassa de C, e 5,64, para biomassa de N; maiores, portanto, do que aqueles observados por AMATO e LADD (1988).

A grande vantagem dos métodos de extração direta para biomassa de C, biomassa de N e biomassa de NRN é a de que eles são adequados em situações onde o método FI não se aplica (BROOKES et al., 1990). Podem, inclusive, contornar a interferência de condições ecológicas diferentes, quando da comparação entre o solo fumigado e o não fumigado (HORWATH e PAUL, 1994).

O método FE, para biomassa de C, biomassa de N e biomassa de NRN já tem confirmada a sua aplicabilidade para uma ampla variação de solos cultivados e situações ecológicas (BROOKES et al., 1985a,b; VANCE et al., 1987a,b; OCIO e BROOKES, 1990; AMATO e LADD, 1988; POWLSON 1994). Devido às dificuldades

operacionais e problemas ligados à repetibilidade dos resultados, as opções para determinação de biomassa de fósforo (biomassa de P) e biomassa de enxofre (biomassa de S) não serão discutidas neste trabalho. Maiores detalhes, para biomassa de P e de S, podem ser obtidos em BROOKES et al. (1982); SAGGAR et al. (1981); GRISI (1996); WU et al. (1994).

Para solos alagados são ainda restritos os relatos, porém, as três opções do FE, já comprovadamente aplicáveis a solos bem drenados, biomassa de C, biomassa de N e biomassa de BNRN, parecem ser igualmente funcionais e aplicáveis para estes tipos de solos (INUBUSHI et al., 1991).

A biomassa microbiana total pode ser calculada aplicando-se o fator 0,475 aos resultados de carbono microbiano. Entretanto, da mesma forma que para os métodos anteriores, os dados da literatura são expressos na forma de biomassa de C, N ou NRN, ou seja, de componentes da biomassa e não à biomassa microbiana total.

Estimativas de biomassa de C, biomassa de N e biomassa de NRN pelo FE são apresentadas na Tabela 4.

**TABELA 4 - Biomassa de C, biomassa de N e biomassa de NRN microbiana, determinadas pelo método fumigação-extração (FE)**

Tipo de solo	Condição ecológica	Biomassa ug/g de solo	Referência
<b>Biomassa de C<sup>1</sup></b>			
Argiloso	milho	282	SEGANFREDO (1997)
Argiloso	incubação em laborat.	523	SEGANFREDI (1997)
Gley/várzea	frutíferas	219	PFENNING et al. (1992)
Muito argiloso	floresta	745	GERALDES et. al (1996)
Muito argiloso	pastagem 4 anos	538	GERALDES et. al (1996)
Muito argiloso	pastagem 15 anos	301	GERALDES et al. (1996)
Franco-arenoso	floresta	580	VANCE et al. (1987 a)
Arenoso	pastagem	671	VANCE et al. (1987 a)
Argiloso	rotação	644	OCIO e BROOKES (1990)
-----	alagado	475	INUBUSHI et al. (1991)
-----	alagado	752	INUBUSHI et al. (1991)
<b>Biomassa de N<sup>2</sup></b>			
Muito argiloso	floresta	144	GERALDES et al. (1996)
Muito argiloso	pastagem 4 anos	89	GERALDES et al. (1996)
Muito argiloso	pastagem 15 anos	121	GERALDES et al. (1996)
Arenoso	rotação	20	OCIO e BROOKES (1990)
Argiloso	rotação	70	OCIO e BROOKES (1990)
-----	alagado	35	INUBUSHI et al. (1991)
-----	alagado	52	INUBUSHI et al. (1991)

TABELA 4 - Continuação

		Biomassa de NRN <sup>3</sup>	
Argiloso	milho	61	SEGANFREDO (1997)
Argiloso	incubação laborat.	113	SEGANFREDO (1997)
Arenoso	rotação	5	OCIO e BROOKES (1990)
Argiloso	rotação	20	OCIO e BROOKES (1990)
Argiloso	rotação	12	JOERGENSEN e
BROOKES (1990)			
-----	alagado	10	INUBUSHI et al. (1991)
-----	alagado	13	INUBUSHI et al. (1991)
Arenoso	pastagem	12	AMATO e LADD (1988)

1. Biomassa de C = (F-NF)\*2,64, para titulações e biomassa de C = (F-NF)\*2,25, para auto-analisadores de C; F = carbono orgânico da amostra fumigada; NF = carbono orgânico da amostra não fumigada

2. Biomassa de N = (F-NF)\*2,64; F = nitrogênio total da amostra fumigada; NF = nitrogênio total da amostra não fumigada

3. Biomassa de N reativo à ninhidrina = (F-NF). F = nitrogênio reativo à ninhidrina da amostra fumigada; NF = nitrogênio reativo à ninhidrina da amostra não fumigada

### A escolha do método

Qualquer um dos métodos abordados, desde que criteriosamente executado, pode fornecer resultados válidos de BM. No entanto, nenhum deles é suficientemente abrangente para ser recomendado como um índice único das condições biológicas do solo. Além disso, em função das variações entre solos e da necessidade de padronização dos procedimentos para cada solo, torna-se importante a utilização de mais de um método para a sua determinação (MARTENS, 1995; WARDLE, 1994). Por outro lado, embora não esteja conceitualmente correto dizer-se biomassa microbiana para valores de biomassa de ATP, de C, de N ou de NRN, se considerarmos o princípio da exatidão dos métodos, é mais apropriado expressar os resultados na forma de componentes específicos da biomassa, do que na de biomassa microbiana total propriamente dita.

O FI e o FE são muito úteis, especialmente para os estudos de ciclagem de nutrientes e energia, de dinâmica da matéria orgânica e dos efeitos de sistemas de manejo do solo. O RI, por sua vez, é uma importante alternativa, não apenas para a determinação da BM, mas também da atividade microbiana do solo (WARDLE, 1994).

O método do ATP, apesar da variação entre o seu conteúdo e o do C da BM, ou seja, relação ATP/C, tem possibilitado resultados tão válidos quanto aqueles dos demais métodos enfocados neste trabalho, desde que cuidadosamente executado.

Além da escolha de mais de um método, outra alternativa, para facilitar a interpretação dos resultados obtidos, é a utilização de índices

complementares, como o quociente respiratório e as proporções da biomassa de C ou de N em relação, respectivamente, ao C e N do solo.

Considerando-se como condição obrigatória o controle do erro experimental, em todas as etapas do trabalho, a questão fundamental nos estudos da BM é a interpretação dos resultados, uma vez que os seus padrões, freqüentemente, mostram-se pouco evidentes. Não se pode esperar, no entanto, que os métodos de análises biológicas sejam tão precisos e exatos quanto os métodos de análises químicas do solo (POWLSON, 1994).

### Perspectivas futuras

O desenvolvimento de métodos para a determinação da BM como uma forma de representar, quantitativamente, todos os grupos microbianos do solo, foi um dos principais fatores responsáveis pelo aumento de pesquisadores em Ciência do Solo interessados em avaliar as condições biológicas do solo, mesmo para aqueles não especialistas nesse ramo. Com a demanda advinda do aumento dos usuários, não só os métodos desenvolvidos, especialmente entre 1966 e 1976 foram aperfeiçoados, como, também, outros métodos foram propostos.

Para o futuro, as tendências apontam para a intensificação nos estudos envolvendo o fator Kc e Kn, para o método FI e KEc, e KEn, para o método FE, e a aplicação, especialmente do método FE, para um melhor entendimento da ciclagem da matéria orgânica e fluxo de energia no solo em ambientes ecológicos diversificados. O RI, pela sua

utilidade na avaliação de distúrbios antropogênicos e de sistemas de manejo do solo, dentro das concepções de agricultura sustentável (HORWATT e PAUL, 1994), apresenta-se como uma referência muito útil para a tomada de decisões sobre o tipo de agricultura a desenvolver.

Grandes avanços são ainda esperados no entendimento da diversidade biológica, através da utilização, numa primeira etapa, de técnicas seletivas com inibidores ou estimulantes, para a determinação da biomassa de grupos microbianos, principalmente fungos, bactérias e actinomicetos. Numa etapa posterior, espera-se que as informações quantitativas fornecidas pelos métodos de determinação de biomassa microbiana sejam complementadas por aquelas qualitativas referentes à diversidade e funcionamento da microbiota do solo. As informações de natureza qualitativa já começam a surgir na literatura especializada internacional, a partir do aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular aplicadas ao solo. As expectativas em relação a essas técnicas são que elas permitirão individualizar os componentes microbianos do solo. Com isso, espera-se que seja possível esclarecer, entre outras questões, quais os componentes da BM que estão sendo beneficiados ou prejudicados pelas atividades antropogênicas.

### CONCLUSÕES

Os métodos disponíveis e em uso para a determinação da BM do solo incluem, basicamente, quatro grupos: o método da contagem em placas de Petri, o método da microscopia direta (Biovolume), os métodos químicos (ATP e FE) e os métodos fisiológicos (FI e RI). O do biovolume é considerado subjetivo e trabalhoso, enquanto os químicos e fisiológicos, possuem melhor precisão e maior abrangência quanto à diversidade de solos. Para solos alagados, os métodos para determinação da BM testados são, na essência, os mesmos desenvolvidos para solos bem drenados. A versão modificada do método FI apresentou resultados satisfatórios, o método do ATP mostrou-se inadequado, o RI apesar de não ter sido proposto para tal condição, também tem sido usado para solos sujeitos ao alagamento e incubações anaeróbias, enquanto o método FE já apresentou resultados coerentes com o método FI modificado para solos alagados. As perspectivas indicam um uso mais intensivo, a curto prazo, dos métodos do ATP, IR, FI e FE nos estudos de

alterações antropogênicas e da ciclagem da matéria orgânica e energia no solo, seguindo-se os métodos para a determinação da biomassa de grupos específicos e, em etapas subsequentes, dos métodos de biologia molecular para a individualização dos componentes da BM.

### BIBLIOGRAFIA CITADA

- AHMED, M.; OADES, J.M.; LADD, J.N. Determination of ATP in soils: effect of soil treatments. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.14, p.273-279, 1982.
- AMATO, M.; LADD, J.N. Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.20, p.107-114, 1988.
- ANDERSON, J.P.M.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.10, p.207-213, 1978.
- ANDERSON, T-H. Carta enviada ao autor, por Traute-Heidi Anderson, do Department of Soil Biology/Federal Research Centre of Agriculture, 3300 Braunschweig Alemanha. (Carta, 10/12/90).
- ANDERSON, T-H.; DOMSCH, K.H. Carbon assimilation and microbial activity in soil. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung Bodenkunde*, v.149, p.457-468, 1986.
- BROOKES, P.C.; KRAGT, J.F.; POWLSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: the effects of fumigation time and temperature. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.17, p.831-835, 1985a.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.17, p.837-842, 1985b.
- BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.14, p.319-329, 1982.
- BROOKES, P.C.; OCIO, J.A.; WU, J. The soil microbial biomass: its measurement, properties and role in soil nitrogen and carbon dynamics following substrate incorporation. *Soil Microorganisms*, v.35, p.39-51, 1990.
- CATTELAN, A.J. *Sistemas de culturas e os microrganismos do solo*. Porto Alegre: UFRGS, 1989. 152p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Microbiologia do Solo, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1989.
- CATTELAN, A.J.; TORRES, E.; SPOLADORI, C.L. Sistemas de preparo com a sucessão trigo/soja e os microrganismos do solo, em Londrina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.21, n.2, p.303-311, 1997a.

- CATTELAN, A.J.; GAUDÊNCIO, C.A.; SILVA, T.A. Sistemas de rotação de culturas em plantio direto e os microrganismos do solo, em Londrina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.21, n.2, p.293-301, 1997b.
- CERRI, C.C.; JENKINSON, D.S. Formation of microbial biomass during the decomposition of <sup>14</sup>C-labelled ryegrass in soil. **Journal of Soil Science**, London, v.32, p.619-626, 1981.
- GERALDES, A.P.A.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Biomassa microbiana de solo sob pastagens na Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.19, n.1, p.55-60, 1995.
- GRISI, B.M. Participação da microbiota na ciclagem de nutrientes. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., 1996, Águas de Lindóia. **Anais...**, Águas de Lindóia: USP-SLCS-SBCS-CEA-SBM, 1996. (CD ROM).
- GRISI, B.M.; GRAY, T.R.G. Comparação dos métodos de fumigação taxa de respiração em resposta a adição de glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana dos solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, p.109-115, 1986.
- HARDEN, T.; JOERGENSEN, R.G.; MEYER, B.; WOLTERS, V. Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.6, p. 679-683, 1993.
- HASSINK, J. Relationship between the amount and the activity of the microbial biomass in Dutch grassland soils: comparison of the fumigation-incubation method and the substrate-induced respiration method. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.5, p.533-538, 1993.
- HORWATH, W.R.; PAUL, E.A. Microbial biomass. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. **Methods of soil analysis: Part 2 - microbiological and biochemical properties**. Madison: SSSA, 1994. p.753-773.
- IMSAM, H.; MITCHELL, C.C.; DORMAAR, J.F. Relationship of soil microbial biomass with fertilization practice and crop yield of three ultisols. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.5, p.459-464, 1991.
- INUBUSHI, K.; TAKAY, Y.; WADA, H. Determination of microbial biomass nitrogen in submerged soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.30, p.455-459, 1984.
- INUBUSHI, K.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Adenosine 5-triphosphate and adenylate energy charge in waterlogged soil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.21, p.725-727, 1989a.
- INUBUSHI, K.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. A comparison of the fumigation extraction, fumigation incubation and ATP methods for measuring microbial biomass in waterlogged soils. In: FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 1989, Kyoto, Japan; **Annals...**, Kyoto, 1989b. p.69.
- INUBUSHI, K.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Soil microbial biomass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extraction method. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.23, p.737-741, 1991.
- JENKINSON, D.S. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.8, p.203-208, 1976.
- JENKINSON, D.S. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In: WILSON, J.R. (Ed.), **Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems**. Wallingford: C.A.B., 1988. p.368-386.
- JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. (Eds.), **Soil Biochemistry**, Marcel Dekker, 1981. p. 425-471.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effect of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.8, p.209-213, 1976.
- JOERGENSEN, R.G.; BROOKES, P.C. Ninhydrin-reactive measurements of microbial biomass in 0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soil extracts. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.22, p.1023-1027, 1990.
- JOERGENSEN, R.G.; MEYER, B.; MUELLER, T. Time-course of the soil microbial biomass under wheat: a one year field study. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.26, n.8, p.987-994, 1994.
- LYNCH J.M.; PANTING, L.M. Measurement of the microbial biomass in intact cores of soil. **Microbial Ecology**, New York, v.7, p.229-234, 1981.
- MARTENS, R. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potential and limitations. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.19, p.117-125, 1995.
- MINHONI, M.T.A.; EIRA, A.F.; BULL, L.T. Biomassa microbiana, liberação de CO<sub>2</sub>, fósforo disponível e pH em solo que recebeu glicose e fosfato de rocha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.20, n.3, p. 387-392, 1996.
- OADES, J.M.; JENKINSON, D.S. Adenosine triphosphate content of the soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.11, p. 201-204, 1979.
- OCIO, J.A.; BROOKES, P.C. An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.11, p.149-194, 1990.
- PARKINSON, D.; PAUL, E.A. Microbial biomass. In: PAGE, A.L. (Ed.), **Methods of soil analysis: Part 2 - chemical and microbiological properties**. 2.ed. Madison: ASA-SSSA, 1982. p.803-814.
- PFENNING, L.; EDUARDO, B. de P.; CERRI, C.C. Os métodos da fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa microbiana de

- solos da Amazônia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.16, n.1, p.31-37, 1992.
- POWLSON, D.S. The soil microbial biomass: before, beyond and back. In: RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E. (Eds.), *Beyond the biomass: compositional and functional analysis of soil microbial communities*. Chichester: John Willey, 1994. p.3-28.
- RITZ, K.; WHEATLEY, R.E. Effects of water amendment on basal and substrate-induced respiration rates of mineral soils. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.8, p.242-246, 1989.
- ROSS, D.J.; SPEIR, T.W.; TATE, K.R. Effects of sieving on estimations of microbial biomass, and carbon and nitrogen mineralization, in soil under pasture. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.23, p.319-324, 1985.
- ROSS, D.J.; TATE, K.R.; CAIRNS, A. Influence of storage on soil microbial biomass estimated by three biochemical procedures. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.12, p.369-374, 1980.
- SAGGAR, S.; BETTANY, J.R.; STEWART, J.W.B. Measurement of microbial sulphur in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.13, p.493-498, 1981.
- SCHMIDT, E.L.; PAUL, E.A. Microscopic methods for soil microorganisms. In: PAGE, A.L. (Ed.), *Method of soil analysis: Part 2 - chemical and microbiological properties*. 2.ed., Madison: ASA-SSSA, 1982. p.803-814.
- SEGANFREDO, M.A. Efeito de dejetos de suínos utilizados como fertilizante orgânico, sobre as condições do solo. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 44p. 1997. (Projeto em andamento)
- SHEN, S.M.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Mineralization and immobilization of nitrogen in fumigated soil and the measurement of microbial biomass nitrogen. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.16, p.437-444, 1984.
- SPARLING, G.P.; FELTHAM, C. W.; REYNOLDS, J.; WEST, A. W.; SINGLETON, P. Estimation of soil microbial biomass C by fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the K<sub>ec</sub>-factor. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.22, n.3, p.301-307, 1990.
- SPARLING, G.P.; GUPTA, V.V.S.R.; ZHU, C. Release of ninhydrin-reactive compounds during fumigation of soil to estimate microbial C and N. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.12, p.1803-1805, 1993.
- TATE, K.R.; JENKINSON, D.S. Adenosine triphosphate (ATP) and microbial biomass in soil: effects of storage at different temperatures and at different moisture levels. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.13, p.899-908, 1982.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.19, p.703-707, 1987a.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Microbial biomass measurements in forest soils: the use of the chloroform fumigation-incubation method in strongly acid soils. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.19, p.697-702, 1987b.
- VORONEY, R.P.; PAUL, E.A. Determination of K<sub>c</sub> and K<sub>n</sub> in situ for the calibration of the chloroform fumigation incubation method. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.16, p.9-14, 1984.
- WARDLE, D.A. Metodologia para a quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Eds.), *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.419-436. (EMBRAPA-CNPAC, Documentos, 46)
- WEST, A.W.; ROSS, D.S.; COWLING, J.C. Changes in microbial C, N, P and ATP contents, numbers and respiration on storage of Soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.18, n.2, p.141-148, 1986.
- WEST, A.W.; SPARLING, G.P. Modifications to the substrate induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v.5, p.177-189, 1986.
- WITTER, E.; MARTENSSON, M.A.; GARCIA, F.V. Size of the microbial biomass in long term field experiment as affected by different N-fertilizers and organic manures. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.6, p.659-669, 1993.
- WU, J.; JOERSENSEN, R.G.; POMMERENING, B., et al. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction-an automated procedure. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.22, p.1167-1169, 1990.
- WU, J.; O'DONNELL, A. G.; HE, Z. L.; SYERS, J. K. Fumigation-extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.26, n.1, p.117-125, 1994.