

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA EM DOIS SOLOS⁽¹⁾

M. M. ANDRÉA⁽²⁾ & M. J. MORENO HOLLWEG⁽³⁾

RESUMO

O potencial de medidas de biomassa microbiana do solo como indicadoras da bioatividade e das interferências nesse ambiente pode ser verificado pela quantidade de trabalhos publicados a esse respeito. Entretanto, a comparação entre dados de diferentes autores, localidades e solos só é possível quando o método de determinação é o mesmo. No entanto, há numerosos trabalhos que propõem diferentes métodos e cálculos. Este trabalho avaliou resultados de determinação de C microbiano obtidos por diferentes métodos de extração e digestão de amostras de dois solos e cálculos de biomassa; além de diferentes cálculos para transformação indireta de CO₂ produzido por respiração basal e induzida em C microbiano, nos dois diferentes solos. Os resultados variaram bastante entre métodos e cálculos e concluiu-se que o método de Vance et al. (1987), mais freqüentemente citado na literatura, deve ser a opção para boa comparação da quantidade de C microbiano entre solos e dados da literatura.

Termos de indexação: carbono microbiano, extração, digestão, respiração.

SUMMARY: *COMPARISON OF METHODS FOR DETERMINING MICROBIAL BIOMASS IN TWO SOILS*

The potential of soil microbial biomass measurements as indicators of soil bioactivity and interferences in this environment can be verified by the amount of published papers on the subject. Nevertheless, a comparison among data from different authors, regions, and soils is only possible when the methodology employed in the determinations is the same. Several papers, however, propose different methodologies and calculations. This study evaluated the results of microbial carbon determination by different extraction and digestion

⁽¹⁾ Trabalho parcialmente apresentado no XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (julho/2003). Recebido para publicação em agosto de 2003 e aprovado em outubro de 2004.

⁽²⁾ Pesquisador Científico, Instituto Biológico, Centro de Proteção Ambiental, Lab. de Ecologia de Agroquímicos, Caixa Postal 12898, CEP 04010-970 São Paulo (SP). E.mail: andrea@biologico.sp.gov.br

⁽³⁾ Graduanda do Instituto de Biociências, USP. Rua do Matão, Travessa 14, nº 321, CEP 05508-900 São Paulo (SP) E-mail: mariaju@hotmail.com

methodologies in two distinct soils. It was also performed biomass calculations, besides calculations for indirect transformation of CO₂ from basal and induced respiration into microbial carbon in the two soils. Results varied greatly among methods and calculations, and the conclusion was drawn that the most frequently used methodology (Vance et al., 1987) should be adopted for a valid comparison of the amount of microbial carbon among soils and literature data.

Index terms: microbial carbon, extraction, digestion, respiration.

INTRODUÇÃO

Práticas agrícolas, tais como: tipo de manejo do solo, aração, rotação de culturas e aplicação de agrotóxicos, interferem na microbiota do solo. É amplamente conhecida a importância dos organismos edáficos na ciclagem de nutrientes necessários para crescimento de plantas e animais, além da sua atuação na manutenção das condições físico-químicas e fertilidade deste ambiente (Pagga, 1997). Sabe-se também que a microbiota é o principal agente na biodegradação tanto da biomassa disponível, quanto de xenobióticos que atingem ou são aplicados no solo (Suett et al., 1996; Pagga, 1997).

As variações nos números de indivíduos ou na dinâmica bioquímica natural da comunidade de microrganismos do solo, que podem ocorrer em consequência da ação antropogênica ou das variações sazonais naturais, podem ser medidas pela variação da biomassa microbiana e por variações de diferentes processos enzimáticos que podem servir como bioindicadores (Nielsen & Winding, 2002).

Para avaliar o efeito de interferências nesse ambiente, há necessidade de utilização de métodos sensíveis que detectem pequenas mudanças. O isolamento de linhagens de organismos envolvidos nos processos de interesse de cada solo pode não representar situação generalizável porque, de modo geral, consegue-se isolamento de somente 1 a 3 % dos microrganismos do solo (Lin & Brookes, 1999), e as populações variam naturalmente de acordo com as características pedogênicas e variações climáticas locais (Berry, 1994; Suett et al., 1996). Por esse motivo, pesquisas sobre bioindicadores têm utilizado medidas de propriedades mais genéricas, tais como medidas da respiração microbiana, mineralização de algumas substâncias e atividades de diferentes enzimas, que traduzem as reações não só de populações individuais, mas também de comunidades e consórcios (Moorman, 1994), além de apresentarem melhor reprodutibilidade (Schinner et al., 1996).

Além disso, a determinação da biomassa microbiana, por determinação do peso do C microbiano por unidade de peso do solo também tem sido utilizada como bioindicador e propriedade ecológica (Nielsen & Winding, 2002). O primeiro trabalho a esse respeito foi feito por Jenkinson & Powlson (1976) e descreve o método de extração de C após fumigação de amostras de solo com vapor de

clorofórmio e comparação com a quantidade de C extraído de amostras não fumigadas. O cálculo de transformação do C do solo para C microbiano foi descrito e adaptado por Vance et al. (1987). Entretanto, muitos pesquisadores propuseram mudanças no processo de fumigação e nos de extração e digestão dos extratos, assim como nos cálculos de C microbiano.

A biomassa microbiana do solo também pode ser medida indiretamente por meio da respiração do solo (Nielsen & Winding, 2002). Medidas de respiração microbiana refletem diretamente a atividade de microrganismos heterótrofos e informam quanto à bioatividade do solo (Paul & Clark, 1996). O método de determinação de respiração basal e induzida (SIR), originalmente proposto por Anderson & Domsch (1978), permite converter dados de respiração em C de biomassa, por aplicação de um fator de conversão aos resultados obtidos na respiração. O método baseia-se em medidas da respiração basal, que é a respiração real do solo, e da induzida, que é a respiração potencial, a partir da adição de um substrato de fácil metabolização, como a glicose, geralmente adicionada na proporção de 4 mg g⁻¹ de glicose no solo (Lin & Brookes, 1999). Vale ressaltar que os cálculos de transformação dos dados de respiração em C microbiano também foram modificados por outros autores.

Com o intuito de obter medida de biomassa microbiana que possa permitir comparação entre diferentes solos e com resultados de diferentes localidades e de diferentes autores, este trabalho comparou vários métodos propostos, em dois tipos de solos.

MATERIAL E MÉTODOS

Processo de fumigação e extração de Jenkinson & Powlson (1976)

A extração do C microbiano (C-mic) foi feita após fumigação (F) de amostras de solo previamente umedecidas a 50 % da Capacidade Máxima de Retenção de Água, com vapor de CHCl₃ livre de etanol, durante 24 h. A retirada de etanol do CHCl₃ foi feita, conforme Frighetto (2000). Após 24 h, o vapor do fumigante foi retirado e o C do solo (C-solo) foi extraído com K₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. Como controle,

foram usadas amostras de solo não fumigadas (NF). A seguir, os extratos F e NF foram digeridos a 100 °C, após adição de $K_2Cr_2O_7$ 0,0667 mol L⁻¹, HgO e mistura de H_2SO_4 e H_3PO_4 (2:1 v/v).

O C-solo foi determinado por titulação dos extratos digeridos, após adição de indicador ferroína, com $[(NH_4)_2 Fe(SO_4)_2 \times 6 H_2O]$ 0,0333 mol L⁻¹ diluído em H_2SO_4 0,4 mol L⁻¹ e padronizado previamente por adição de ferroína e titulação com $K_2Cr_2O_7$ 0,0667 mol L⁻¹, água destilada e H_2SO_4 concentrado.

Mudanças propostas por diferentes autores nos processos de extração e digestão:

- Islam & Weil (1998) empregaram irradiação com microondas em substituição à fumigação com $CHCl_3$, e também para digestão dos extratos em substituição ao aquecimento. A determinação do C-mic foi feita por espectrometria na região da luz visível, em 590 nm, e comparada com curva-padrão de sacarose, para comparação com quantidades conhecidas de C.
- Pascual et al. (2000): substituíram a mistura H_2SO_4 e H_3PO_4 (2:1 v/v) utilizada para digestão dos extratos, por apenas H_2SO_4 .
- Frighetto (2000) não adicionou HgO para a digestão dos extratos.
- Oliveira et al. (2001) utilizaram $K_2Cr_2O_7$ 0,4 mol L⁻¹ em vez de 0,0667 mol L⁻¹ proposto por Jenkinson & Powlson (1976); proporção 1:2 (v/v) da mistura de ácidos H_2SO_4 : H_3PO_4 e preparação da solução de $[(NH_4)_2 Fe(SO_4)_2 \times 6 H_2O]$ por diluição em H_2SO_4 concentrado.
- D'Andréa et al. (2002) utilizaram proporção 1:2 (v/v) da mistura de ácidos H_2SO_4 : H_3PO_4 .

Nenhum dos autores citados explica a razão de suas propostas de mudanças.

Cálculos de C-mic do solo, conforme Vance et al. (1987):

O C-mic foi calculado pela diferença do C-extraído do solo fumigado (C-solo F) com o do solo não fumigado (C-solo NF), como C-extraível do solo em μg de C mL⁻¹ de extrato. Os cálculos realizados levaram em conta: os volumes de consumo de solução de titulação das amostras de solo fumigado e controle não fumigado; os volumes de consumo de solução de titulação dos controles de reagentes também submetidos aos processos de digestão e dos controles de reagentes não digeridos; a molaridade e o volume de $K_2Cr_2O_7$ adicionado no processo de digestão; o volume de extrato de solo; o fator de conversão de redução Cr^{6+} para Cr^{3+} que ocorre durante a oxidação da matéria orgânica, para quantificação estequiométrica do dicromato remanescente nas titulações, e, finalmente, o fator de correção da padronização do $[(NH_4)_2 Fe(SO_4)_2 \times 6 H_2O]$ 0,0333 mol L⁻¹, para expressar sua molaridade real.

Os valores obtidos foram transformados em C-solo (em μg de C g⁻¹ de solo), levando em conta o volume do extrator (K_2SO_4 0,5 mol L⁻¹), o peso das amostras e a percentagem de umidade do solo. Vance et al. (1987) chamaram de Ec essa diferença de C-solo F menos o C-solo NF e calcularam o C-mic para vários solos com pH na faixa de 3,3 a 7,2, tendo encontrado uma relação linear entre o C-mic e Ec que permitiu a elaboração de equação de regressão, de tal forma que os valores de C-mic foram calculados segundo a seguinte fórmula:

$$C\text{-mic } (\mu g \text{ C g}^{-1} \text{ solo}) = 2,64 \times Ec, \text{ ou:} \\ 2,64 \times (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF})$$

Mudanças propostas por diferentes autores nos cálculos de C-mic:

- De acordo com Harden et al. (1993): $C\text{-mic} = (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF}) \times 2,22$.
- De acordo com Islam & Weil (1998): $C\text{-mic} = (C\text{-solo irradiado} - C\text{-solo não irradiado}) / 0,213$. Os autores explicaram que 0,213 foi a fração de C da biomassa microbiana extraída por K_2SO_4 0,5 mol L⁻¹.
- De acordo com Hu et al. (1999) e Ferreira et al. (1999): $C\text{-mic} = (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF}) / 0,33$.
- De acordo com Frighetto (2000): $C\text{-mic} = (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF}) / 0,38$.
- De acordo com Croft et al. (2001): $C\text{-mic} = (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF}) / 0,45$.
- De acordo com Ghani & Wardle (2001): $C\text{-mic} = (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF}) / 0,40$.
- De acordo com D'Andréa et al. (2002): $C\text{-mic} = (C\text{-solo F} - C\text{-solo NF}) / 0,30$.

A mudança dos valores nos denominadores das fórmulas de cálculo não foi explicada nos trabalhos citados.

O método original de Jenkinson & Powlson (1976) e os cálculos de Vance et al. (1987), baseados no método dos primeiros, bem como todas as modificações descritas, foram testados em pelo menos três repetições de cada um dos dois tipos de solos estudados, cujos pesos das amostras variaram conforme o método.

Método de respiração basal e induzida (SIR)

O método empregado para verificação da respiração do solo baseou-se na produção de CO_2 coletado periodicamente em KOH 0,01 mol L⁻¹, conforme descrito em Andréa & Pettinelli Jr. (2000). Anderson & Domsch (1978) acharam correlação significativa entre as taxas de CO_2 produzido e as de biomassa de vários solos, a qual permitiu calcular o C-mic dos solos por meio da transformação da taxa máxima de respiração inicial após adição de glicose, em C-mic, utilizando a seguinte fórmula:

$$C\text{-mic } (mg \text{ de C-mic g}^{-1} \text{ de solo}) = 40,04 y + 0,37$$

em que y = taxa máxima de respiração inicial (mL de CO_2 g^{-1} de solo h^{-1}).

Mudanças propostas nos cálculos de C-mic a partir de respostas respiratórias:

- Segundo Sparling et al. (1990): C-mic (μg de C g^{-1} de solo) = (μL de CO_2 g^{-1} de solo h^{-1}) \times 50.
- Segundo Harden et al. (1993): C-mic (μg de C g^{-1} de solo) = (μL de CO_2 g^{-1} de solo h^{-1}) \times 30.

A conversão dos dados coletados de mg CO_2 em μL CO_2 foi feita por cálculos, sabendo-se que: 1 mol de CO_2 = 22,4 L de CO_2 e 1 mol de CO_2 = 44 g de CO_2 (em CNTP).

As amostras dos solos submetidos aos testes foram coletadas de 0 a 15 cm do perfil dos solos de áreas agrícolas das regiões de Campinas e Barra Bonita, ambas no estado de São Paulo. As principais características do solo argilo-arenoso de Campinas foram: 65 % de areia, 15 % de silte, 20 % de argila, 31 g dm^{-3} de matéria orgânica e pH (CaCl_2) 5,4, de acordo com análise feita pelo Laboratório Lagro (Campinas, SP). As características do solo muito argiloso de Barra Bonita foram: 10,3 % de areia, 28,1 % de silte, 61,6 % de argila, 25 g dm^{-3} de matéria orgânica e pH (CaCl_2) 5,0, de acordo com análise feita pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP/Botucatu (SP).

Os resultados foram submetidos à análise de variância do teste t ($p < 0,05$) entre os diferentes métodos de digestão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de C-solo e, portanto, a de C-mic não foram possíveis pelo método de Oliveira et al. (2001) porque não se conseguiu titular os extratos com até 100 mL do sulfato ferroso amoniacal, razão por que não foi usada a fórmula de cálculo proposta por estes autores. Em relação aos demais (Quadro 1), observou-se que, independentemente do tipo de solo, os valores obtidos para um mesmo processo de digestão foram próximos e, com exceção dos cálculos propostos por Islam & Weil (1998), independentes do tipo de cálculo. Por outro lado, diferentes processos de digestão determinaram grandes variações, isto é, de aproximadamente 7 a 90 $\mu\text{g g}^{-1}$ de C-mic de solo de Campinas e de 6 a 54 $\mu\text{g g}^{-1}$ de C-mic de solo de Barra Bonita (Quadro 1). Verificou-se que, assumindo ser o método padrão mais consagrado na literatura (Vance et al., 1987), apenas os cálculos efetuados conforme Frighetto (2000) se aproximaram dele, enquanto os outros métodos de cálculos diferiram bastante. As maiores diferenças foram observadas com o método de Islam & Weil (1988), que utilizou microondas em substituição à fumigação e na digestão das amostras.

Quadro 1. Carbono da biomassa microbiana (C-mic) determinado por diferentes processos de digestão e extração de amostras do solo de Campinas e de Barra Bonita

Digestão	Cálculo							
	Vance et al. (1987)	Harden et al. (1993)	Islam & Weil (1998)	Hu et al. (1999) Ferreira et al. (1999)	Frighetto (2000)	Croft et al. (2001)	Ghani & Wardle (2001)	D'Andréa et al. (2002)
mg g^{-1} C-mic de solo								
Campinas								
Vance et al. (1987)	71,47	60,10	20,66	82,04	71,24	60,16	67,68	90,24
Islam & Weil (1998)	11,62	9,77	20,66	13,33	11,58	9,78	11,00	14,67
Frighetto (2000)	22,11	18,59	39,31	25,37	22,04	18,61	20,93	27,91
Pascual et al. (2000)	15,53	13,06	27,62	17,83	15,48	13,07	14,71	19,61
Ghani & Wardle (2001)	38,23	32,15	67,99	43,88	38,11	32,18	36,20	48,27
D'Andréa et al. (2002)	8,19	6,88	14,56	9,40	8,16	6,89	7,75	10,34
Barra Bonita								
Vance et al. (1987)	29,41	24,73	52,30	33,76	29,32	24,76	27,85	37,13
Islam & Weil (1998)	2,59	2,18	4,60	2,97	2,58	2,18	2,45	3,27
Frighetto (2000)	10,91	9,17	19,39	12,52	10,87	9,18	10,33	13,77
Pascual et al. (2000)	7,12	5,99	12,67	8,18	7,10	6,00	6,75	9,00
Ghani & Wardle (2001)	30,24	25,43	53,79	34,72	30,15	25,46	28,64	38,19
D'Andréa et al. (2002)	24,00	20,58	43,52	28,09	24,39	20,60	23,17	30,90

Os resultados dos métodos de digestão diferiram significativamente dos de Vance et al. (1987) para todos os métodos utilizados com o solo de Campinas, com valores de p variando de 0,0001 (D'Andréa et al., 2002) a, no máximo, 0,0157 (Ghani & Wardle, 2001). Com o solo de Barra Bonita, só os resultados dos métodos de D'Andréa et al. (2002) e de Ghani & Wardle (2001) não diferiram significativamente dos de Vance et al. (1987), com $p = 0,1337$ e $0,7822$, respectivamente.

Verificou-se que todos os métodos subestimaram a quantidade de biomassa microbiana, quando comparados com os resultados obtidos por meio do método de Vance et al. (1987), tanto em relação à digestão, quanto em relação aos cálculos (Quadro 1). Notou-se que, embora a única diferença entre os métodos de digestão de Frighetto (2000) e de Vance et al. (1987) tenha sido a adição de HgO pelos últimos, este reagente determinou diferenças bastante grandes na biomassa das amostras dos solos estudados. Enquanto o método de Vance et al. (1987) determinou aproximadamente $71,5$ e $29,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de C-mic de solo, respectivamente, nos solos de Campinas e de Barra Bonita, o de Frighetto (2000) determinou, respectivamente, $22,1$ e $10,9 \mu\text{g g}^{-1}$ de C-mic de solo.

Quanto aos resultados de biomassa microbiana obtidos a partir de método de conversão de CO_2 produzido por respiração basal e induzida, verificaram-se grandes diferenças nas quantidades obtidas, tanto em relação aos resultados de todos os demais métodos de digestão quanto em relação ao tipo de cálculo (Quadro 2). Este método, apesar de ser sensível e bastante usado como bioindicador em estudos de dinâmica de agrotóxicos em solos (Harden et al., 1993; Andréa et al., 2000; Andréa & Pettinelli Jr., 2000; Andréa et al., 2003), não deve ser usado para cálculo de biomassa, já que os resultados também diferiram em relação aos obtidos pelo método de Vance et al. (1987).

Quadro 2. Carbono da biomassa microbiana (C-mic) determinado por diferentes cálculos a partir de medidas de respiração basal e induzida em amostras do solo de Campinas e de Barra Bonita (mg C-mic g^{-1} solo)

Solo	Anderson & Domsch (1978)	Sparling et al. (1990)	Harden et al. (1993)
Campinas	730	445	267
Barra Bonita	749	469	281

CONCLUSÃO

O método de Vance et al. é o método de escolha para boa comparação entre os solos e os dados da literatura.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, J.P.E. & DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10:215-221, 1978.
- ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B. & MATALLO, M.B. Effect of the herbicide haloxyfop-methyl on some soil biological parameters. In: INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 3., Foz do Iguaçu, 2000. Proceedings. Foz do Iguaçu, International Weed Science, 2000. CD-ROM
- ANDRÉA, M.M. & PETTINELLI Jr., A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arq. Inst. Biol.*, 67:223-228, 2000.
- ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B.; LUCHINI, L.C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M.B. & SAVOY, V.L.T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38:1329-1335, 2003.
- BERRY, E.C. Earthworms and other fauna in the soil. In: HATFIELD, J.L. & STEWART, B.A., eds., *Soil biology. Effects on soil quality*. Boca Raton, CRC Press, 1994. p.61-83.
- CROFT, M.; ROCHEFORT, L. & BEAUCHAMP, C.J. Vacuum-extraction of peatlands disturbs bacterial population and microbial biomass carbon. *Appl. Soil Ecol.*, 18:1-12, 2001.
- D'ANDRÉA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & CARNEIRO, M.A.C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do Estado de Goiás. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:913-923, 2002.
- FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O. & VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:991-996, 1999.
- FRIGHETTO, R.T.S. Análise da biomassa microbiana em carbono: método de fumigação-extração. In: FRIGHETTO, R.T.S. & VALARINI, P.J., coords. *Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo*. Jaguariúna, EMBRAPA, 2000. p.157-166.
- GHANI, A. & WARDLE, D.A. Fate of ^{14}C from glucose and the herbicide metsulfuron-methyl in a plant-soil microcosm system. *Soil Biol. Biochem.*, 33:777-785, 2001.
- 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 Biol. Biochem.*, 25:679-683, 1993.
- HU, S.J.; van BRUGGEN, A.H.C. & GRÜNWARD, N.J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Appl. Soil Ecol.*, 13:21-30, 1999.
- ISLAM, K.R. & WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biol. Fertil. Soils*, 27:408-416, 1998.
- JENKINSON, D.S. & POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biol. Biochem.*, 8:167-177, 1976.

- LIN, Q. & BROOKES, P.C. Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1999-2114, 1999.
- MOORMAN, T.B. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological, and management effects. In: HATFIELD, J.L. & STEWART, B.A., eds. *Soil biology. Effects on soil quality*. Boca Raton, CRC Press, 1994. p.121-169.
- NIELSEN, M.N. & WINDING, A. Microorganisms as indicators of soil health. Denmark, National Environmental Research Institute, 2002. 84p. (Technical Report, 388).
- OLIVEIRA, J.R.A.; MENDES, L.C. & VIVALDI, L. Carbono da biomassa microbiana em solos de cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo: avaliação dos métodos de fumigação-incubação e fumigação-extração. *R. Bras. Ci. Solo*, 25:863-871, 2001.
- PAGGA, U. Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere*, 35:2953-2972, 1997.
- PASCUAL, J.A.; GARCIA, C.; HERNADEZ, T.; MORENO, J.L. & ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1877-1883, 2000.
- PAUL, E.A. & CLARK, F.E. *Soil microbiology and biochemistry*. 2.ed. London, Academic Press, 1996. p.109-127.
- SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. & MARGESIN, R., eds. Indirect estimation of microbial biomass. In: *Methods in soil biology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1996. p.47-75.
- SPARLING, G.P.; FELTHAM, C.W.; REYNOLDS, J.; WEST, A.W. & SINGLETON, P. Estimation of soil microbial C by fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and reassessment of the k_{ec} -factor. *Soil Biol. Biochem.*, 22:301-307, 1990.
- SUETT, D.L.; FOURNIER, J.C.; MOURKIDOU, E.P.; PUSSEMIER, L. & SMELT, J. Accelerated degradation: the European dimension. *Soil Biol. Biochem.*, 28:1741-1748, 1996.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C. & JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 19:703-707, 1987.