



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Brasil

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; VIDOR, C.

UTILIZAÇÃO DE MICROONDAS NA AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 23, núm. 4, 1999, pp. 991-996

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180218348027>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

NOTA

UTILIZAÇÃO DE MICROONDAS NA AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO⁽¹⁾

A. S. FERREIRA⁽²⁾, F. A. O. CAMARGO^(3,4) & C. VIDOR⁽³⁾

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo determinar o carbono e o nitrogênio presentes na biomassa microbiana, usando a irradiação do forno de microondas em substituição ao clorofórmio nos métodos fumigação-incubação e fumigação-extracção. Foram utilizadas duas amostras de um Podzólico Vermelho-Escuro, submetidas aos procedimentos de incubação e de extração, após serem fumigadas com clorofórmio e irradiadas com microondas por diferentes períodos (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 min). Observou-se que a irradiação durante 2 min foi suficiente para estimar o C e o N presentes na biomassa microbiana nos procedimentos de incubação e extração, com valores semelhantes aos verificados pela fumigação com clorofórmio. A irradiação com microondas reduziu os coeficientes de variação nas amostras de solo submetidas ao procedimento de extração, comprovando ser o método irradiação-extracção o mais adequado para a estimativa do C e do N microbianos.

Termos de indexação: C e N microbianos, incubação, extração, método.

SUMMARY: USE OF MICROWAVE RADIATION TO EVALUATE SOIL MICROBIAL BIOMASS

The objective of this work was to determine carbon and nitrogen content in the soil microbial biomass by comparing microwave radiation and chloroform fumigation using the extraction and incubation methods. Two soil samples (Dark-Red Podzolic) were submitted to incubation and extraction after chloroform fumigation and microwave radiation during different periods (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50 min). Two minutes under microwave radiation were sufficient to determine C and N content in the soil biomass using incubation and extraction procedures. These values were similar to those obtained by chloroform fumigation. The coefficients of variation in the soil samples submitted to microwave radiation extraction were reduced. Thus, this was considered the most adequate procedure for carbon and nitrogen quantification in soil biomass.

Index terms: microbial C and N, incubation, extraction, method.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em junho de 1998 e aprovado em junho de 1999.

⁽²⁾ Engenheiro-Agrônomo do Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Caixa Postal 776, CEP 90001-970 Porto Alegre (RS).

⁽³⁾ Professor Adjunto do Departamento de Solos, UFRGS.

⁽⁴⁾ Bolsista do CNPq. Email: fcamargo@ufrgs.br.

INTRODUÇÃO

Um dos métodos mais utilizados na determinação da biomassa do solo está baseado na sua fumigação com clorofórmio. Entretanto, esse reagente não é eficiente como biocida para alguns microrganismos (Jenkinson & Powlson, 1976; Kassin et al., 1981), além de difícil obtenção comercial. Desse modo, torna-se necessário um método que aproveite melhor os recursos existentes nos laboratórios de microbiologia. Destaca-se, neste caso, o uso do forno de microondas como uma alternativa para a substituição do clorofórmio na eliminação dos microrganismos do solo, princípio este utilizado na determinação da biomassa microbiana do solo (Jenkinson & Powlson, 1976).

A atuação do forno de microondas na eliminação de microrganismos é resultado da quantidade de irradiação eletromagnética a ser administrada, visto que os níveis têm efeito na transferência de energia e na temperatura, rompendo a parede celular e, consequentemente, liberando o material citoplasmático para a solução do solo. Em termos de sensibilidade, a população de fungos, em razão da sua constituição e do tamanho das hifas, é mais exposta e, com isto, mais afetada pelas microondas do que a população de bactérias (Vance et al., 1987). Neste caso, é necessária a avaliação da quantidade de energia atuante sobre a biomassa ou, especificamente, sobre os grupos microbianos. Além da quantidade de energia irradiada, deve ser considerado o tempo de exposição das amostras à radiação, pois este pode afetar o material orgânico não proveniente dos microrganismos e, com isto, superestimar os valores de biomassa microbiana (Zagal, 1989; Puri & Barraclough, 1993).

Com base nessas considerações, o presente trabalho teve como objetivo estimar o carbono e nitrogênio presentes na biomassa microbiana do solo, utilizando o forno de microondas em substituição ao clorofórmio nos métodos fumigação-extracção e fumigação-incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

Duas amostras de Podzólico Vermelho-Escuro, provenientes de campo nativo e de solo cultivado, foram coletadas na Estação Experimental Agronômica da UFRGS na profundidade de 0-5 cm. As amostras foram peneiradas (2 mm), mantidas com a umidade do momento da coleta e colocadas sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o momento de suas análises. Utilizaram-se duas amostras: a primeira, para realizar testes preliminares com o objetivo de selecionar o tempo de irradiação, e a segunda, para definir o método e o procedimento mais adequado para estimar o C e o N microbianos a partir do tempo selecionado.

Retiraram-se subamostras em triplicatas da primeira amostra para o teste preliminar, composto dos seguintes tratamentos: (a) solo sem fumigação e sem irradiação; (b) solo fumigado com clorofórmio; e (c) solo irradiado com microondas. Nesta fase, os tempos de irradiação utilizados foram de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 min. No segundo teste, utilizaram-se subamostras (em quadruplicatas) submetidas aos tempos de 2, 5, 10 e 15 min. Em todas as fases, foi determinada a umidade das amostras pela diferença de peso antes e depois da irradiação com microondas.

Utilizou-se o forno de microondas da marca Sanyo Prosdócimo, modelo EM 9003 B, tensão de alimentação 120 V (60 Hz), freqüência de microondas de 2.450 MHz e concentração de energia 1,35 KW. Essas informações foram utilizadas para calcular a quantidade de energia emitida em função do tempo de irradiação (J). Este valor foi obtido por meio da fórmula $T = P \Delta t$, em que T = trabalho, energia; ou: P = potência = $W = J \text{ s}^{-1}$; t = tempo; logo $T = J \text{ s}^{-1} \Delta t$ (s) = J. Então, com a potência de 1350 w e um tempo de 120 s, obteve-se $1,62 \cdot 10^5$ J. Na ausência de dados de potência, pode-se utilizar a fórmula $P = U^2 R^{-1}$, em que U = voltagem do aparelho (120 ou 220 V) e R = resistência (W). Este cálculo foi feito para padronizar o método e possibilitar a utilização de qualquer aparelho que disponha das informações acima descritas.

Porções de 40 g de solo foram colocadas em frascos (100 mL) para serem submetidas à fumigação com clorofórmio e à irradiação. Para a fumigação, adicionaram-se 4 mL de CHCl_3 (isento de etanol) aos frascos que permaneceram fechados sob fumigação em sala de incubação mantida no escuro, com temperatura controlada a 28°C , sendo o CHCl_3 removido por aspirações sucessivas após 24 h de incubação. As demais porções de solo foram colocadas em placas de Petri e esterilizadas no forno de microondas, sendo determinada nestas amostras a umidade pela diferença de peso antes e depois da esterilização. O tratamento-controle diferenciou-se dos demais por não submeter as porções de solo à fumigação ou à irradiação. Deste procedimento resultaram o método fumigação-extracção (FE) e o método irradiação-extracção (IE).

Adicionaram-se aos frascos 50 mL de K_2SO_4 0,5 mol L⁻¹, utilizando uma relação solo:extrator 1:1,25 (Vance et al., 1987), seguido de agitação por meia hora e de filtragem em filtro médio. Da solução filtrada, retirou-se uma alíquota de 25 mL do extrato para a determinação do carbono orgânico (Tedesco et al., 1995). O nitrogênio da biomassa foi extraído com o mesmo extrator a partir da relação solo:extrator 1:1,25 e 1:2 para os procedimentos de extração e de incubação, respectivamente, utilizando uma alíquota de 5 mL da solução filtrada para determinação do nitrogênio total (Tedesco et al., 1995).

Para o método fumigação-incubação (FI) e o irradiação-incubação (II) foram realizados os mesmos procedimentos supradescritos, diferindo pela inoculação de 2 g de solo nas amostras fumigadas e nas irradiadas. Em seguida, procedeu-se à incubação, durante 10 dias, nas mesmas condições do procedimento de extração. Cada amostra foi incubada em frascos de 1 L, hermeticamente fechados, providos de recipientes com 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ para captação do CO₂ liberado. O controle diferenciou-se dos demais por não submeter as amostras de solo à fumigação e à irradiação. Após a incubação, os recipientes com NaOH foram retirados e receberam 5 mL de BaCl₂ 1 mol L⁻¹ e algumas gotas de fenolftaleína para titulação com HCl 1 mol L⁻¹ padronizado. A liberação do CO₂ foi calculada pela fórmula (Stotzky, 1965):

$$\text{mg CO}_2 = (B - V) \cdot M \cdot E$$

em que B = volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da prova em branco; V = volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da amostra; M = molaridade do HCl 1 mol L⁻¹; E = peso equivalente do carbono.

Os valores do carbono presente na biomassa microbiana foram calculados pela equação descrita a seguir:

$$C_{\text{mic}} = (C_{\text{FI}} - C_{\text{NFI}}) / K_C = \mu\text{g g}^{-1} \text{ de C no solo}$$

em que C_{mic} = carbono presente na biomassa microbiana do solo; C_{FI} = carbono presente na amostra fumigada ou irradiada; C_{NFI} = carbono presente na amostra não fumigada ou não irradiada; K_C = fator de conversão de 0,33 (Sparling & West, 1988), para o método FE ou IE, e de 0,45, para o método FI ou II (De-Polli & Guerra, 1996).

O cálculo do nitrogênio presente na biomassa ($\mu\text{g g}^{-1}$ de N no solo) foi efetuado seguindo o mesmo princípio descrito na equação anterior, diferindo apenas pelo uso de K_N de 0,54 (Brookes et al., 1985), para os métodos fumigação-extração (FE), irradiação-extração (IE), fumigação-incubação (FI) e irradiação-incubação (II).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso e os resultados foram submetidos à análise de variância, à comparação de médias, às análises de correlação e de regressão descontínua e à determinação dos intervalos de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O carbono da biomassa apresentou, no ensaio preliminar, valores crescentes com o tempo de irradiação até 15 min (Quadro 1), a partir do qual os valores não aumentaram significativamente. Além disso, 15 min foi o tempo determinado através de

regressão descontínua como suficiente para o tratamento das amostras com irradiação de microondas para avaliação da biomassa pelos métodos de extração ($R^2 = 0,89$) ou incubação ($R^2 = 0,87$). Observou-se que, a partir deste tempo, a solução extraída apresentava uma coloração amarelo-esverdeada, produzida provavelmente, pela alteração do carbono orgânico não-microbiano do solo. Observou-se, ainda, que o coeficiente de variação obtido pelo método fumigação-extração foi menor em comparação com o da incubação, demonstrando maior precisão nos valores determinados.

O carbono microbiano estimado pelo método irradiação-extração foi superior ao observado pelo método irradiação-incubação (Quadro 1), verificando-se o contrário para o método utilizando clorofórmio, resultados esses concordantes com os obtidos por Lovell et al. (1995). Entretanto, segundo vários autores, o clorofórmio reduz apenas parte da população microbiana responsável pela mineralização da matéria orgânica (Shields et al., 1974; Jenkinson & Powlson, 1976; Kassin et al., 1981), principalmente a população de fungos (Kassin et al., 1981). Deste modo, os valores observados para o C microbiano no método fumigação-incubação podem ter sido produzidos pela atividade bacteriana sobre a degradação da biomassa fúngica, uma vez que estes foram eliminados mais eficientemente pelo clorofórmio. Não obstante, o período de incubação de 10 dias favorece o estabelecimento dos grupos bacterianos, pois estes possuem maiores taxas de crescimento comparadas às dos demais grupos microbianos do solo.

Quadro 1. Carbono e nitrogênio microbianos do solo determinados pelos métodos de irradiação e de fumigação, utilizando os procedimentos de extração e de incubação

Tratamento	Carbono		Nitrogênio	
	Extração	Incubação	Extração	Incubação
min	$\mu\text{g g}^{-1}$ de C no solo			
			Irradiação	
5	488 c	282 b	74 c	24 d
10	954 bc	525 ab	98 bc	48 cd
15	1327 ab	807 a	122 ab	60 cd
20	1354 ab	888 a	138 ab	85 c
30	1539 a	706 ab	153 a	167 ab
40	1493 a	707 ab	160 a	194 a
50	1454 a	646 ab	140 ab	132 b
	Fumigação			
Fumigado	238	403	122	52
C.V. (%)	12,9	20,4	13,4	13,9

Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre tratamentos, pelo teste de Tukey a 5%.

Os valores de nitrogênio estimados pela extração, tanto no método de fumigação como no de irradiação, foram, em média, 3,1 e 2,3 vezes superiores aos do procedimento de incubação, respectivamente (Quadro 1). A correlação observada entre o carbono e o nitrogênio microbiano estimado pelo método irradiação-extração foi significativamente superior ($r = 0,95$; $p < 0,05$) ao estimado pelo método irradiação-incubação ($r = 0,43$; $p < 0,05$).

Os valores da biomassa microbiana do solo (expressos em C), avaliados no segundo ensaio e obtidos após irradiação com microondas, situaram-se entre 249 e 650 $\mu\text{g g}^{-1}$ de C no solo, quando se procedeu à extração, e 151 a 699 $\mu\text{g g}^{-1}$ de C no solo para o procedimento de incubação (Quadro 2). Verificou-se que os coeficientes de variação (C.V.) encontravam-se em níveis aceitáveis, quando foi utilizado o método irradiação-extração, ao passo que se mostraram elevados, quando utilizado o método irradiação-incubação.

A correlação positiva ($r = 0,90$; $p < 0,05$) verificada entre o carbono microbiano estimado pelo método irradiação-incubação e o carbono extraído pelo método irradiação-extração demonstra que os dois métodos estimam comportamentos de carbono semelhantes no solo. Observou-se, ainda, que os valores obtidos pelo método irradiação-extração superaram os de irradiação-incubação, em média de 37 $\mu\text{g g}^{-1}$ de C no solo.

Os resultados apresentados no quadro 2 demonstram que os valores de biomassa microbiana determinados após 2 min de irradiação com microondas foram semelhantes aos da fumigação com clorofórmio, tanto no procedimento de incubação como no de extração. Nesse período de exposição (2 min), observou-se que o método irradiação-extração apresentou os menores coeficientes de variação e intervalos de confiança, quando comparado aos obtidos com o método fumigação-extração, demonstrando, assim, por este método, maior grau de precisão e confiabilidade nos valores estimados de carbono microbiano.

Outro aspecto a ser abordado seria em relação ao número de subamostras de solo utilizado na quantificação da biomassa microbiana do solo. Os resultados demonstram que não haveria necessidade de mais do que três subamostras, quando se utiliza o método irradiação-extração, para se obter bom grau de precisão, considerando as semelhanças entre os coeficientes de variação e o intervalo de confiança (Quadro 2). Por outro lado, para o método irradiação-incubação, seria aconselhável maior número de subamostras para se atingir amplitude dos valores de biomassa microbiana, uma vez que esse aumento não se refletiu em diminuição do coeficiente de variação, que se manteve alto, independentemente do número de subamostras. Os baixos coeficientes de variação verificados nas amostras não fumigadas e não irradiadas (Quadro 2) indicam ser conveniente

diminuir o número de subamostras para não mais do que duas, proporcionando, desse modo, maior praticidade nas análises dos experimentos que envolvam a estimativa da biomassa microbiana.

A intensidade de energia a que o solo irradiado pelas microondas foi exposto no presente trabalho foi, aos 2 min, de $1,62 \cdot 10^5$ J. Este valor é preponderante na eficiência da análise, pois os grupos microbianos são afetados de forma diferenciada pela quantidade de irradiação a que são submetidos. Em geral, os níveis de $2,0 \cdot 10^4$ J a $1,2 \cdot 10^5$ J reduzem significativamente a população de fungos, chegando, em níveis mais elevados, à eliminação total desse grupo microbiano (Zagal, 1989). No entanto, as bactérias apresentam maior resistência às microondas, necessitando de quantidades mais elevadas de energia para que haja redução significativa (Vela et al., 1976; Wainwright et al., 1980). Esses mesmos autores observaram que a exposição a $1,2 \cdot 10^5$ J reduz grande parte da população bacteriana, mas a $4,8 \cdot 10^5$ J, foram ainda detectadas algumas células viáveis no solo.

Quadro 2. Carbono presente na biomassa microbiana, com os respectivos intervalos de confiança (95%), determinado pelos métodos de fumigação e de irradiação, utilizando os procedimentos de extração e de incubação

	Extração			Incubação		
	n ⁽¹⁾	C.V.% ⁽²⁾	Média	n	C.V.%	Média
$\mu\text{g g}^{-1}$ de C no solo						
Fumigação						
Não fumigado ⁽³⁾	4	2,19	77 ± 2,1	4	7,69	321 ± 24
C microbiano	4	25,78	247 ± 62	4	29,68	238 ± 69
	3	19,08	220 ± 47	3	36,36	238 ± 98
	2	22,93	205 ± 46	2	21,75	281 ± 85
Irradiação						
Não irradiado ⁽³⁾	4	2,19	77 ± 2,1	4	7,69	321 ± 24
2 minutos	4	6,18	269 ± 16	4	50,32	216 ± 170
	3	6,41	264 ± 19	3	63,20	209 ± 150
	2	3,07	255 ± 11	2	80,80	151 ± 107
5 minutos	4	14,08	374 ± 52	4	28,39	497 ± 138
	3	16,14	383 ± 70	3	17,99	555 ± 113
	2	8,97	249 ± 43	2	20,95	584 ± 169
10 minutos	4	12,56	650 ± 80	4	18,24	627 ± 162
	3	13,36	628 ± 94	3	14,28	699 ± 113
	2	8,08	583 ± 65	2	26,41	671 ± 162
15 minutos	4	20,16	544 ± 107	4	38,08	541 ± 201
	3	18,77	505 ± 107	3	39,19	584 ± 259
	2	26,13	510 ± 185	2	49,18	497 ± 339

⁽¹⁾ n = Número de amostras avaliadas. ⁽²⁾C.V. = Coeficiente de variação. ⁽³⁾Carbono presente na amostra não fumigada ou não irradiada.

A energia de $4,8 \cdot 10^5$ J foi aproximadamente a irradiação a que os solos foram expostos aos 5 min ($4,05 \cdot 10^5$ J), ao passo que, aos 10 min, este valor aumentou em 100% ($8,1 \cdot 10^5$ J). Entretanto, níveis elevados de energia, como os verificados aos 10 min de exposição, podem superestimar os valores de C microbiano (Quadros 1 e 2), pois estariam incluindo outra fonte de carbono que não a microbiana.

A limitação do uso de microondas para a determinação do C e N microbianos estaria relacionada com as possíveis quebras de ligações com carbono e nitrogênio presentes na matéria orgânica do solo, sendo a quebra promovida pela exposição a maiores quantidades de energia, superestimando, dessa forma, os valores da biomassa microbiana.

Monz et al. (1991) demonstraram que o tempo de 2 min ($6,8 \cdot 10^4$ J) não provocou a destruição da fração orgânica do solo, tendo Hendricks & Pascoe (1988) recomendado tempo inferior a 5 min e energia menor que $2,1 \cdot 10^5$ J para que não ocorram possíveis quebras das ligações orgânicas do solo. Segundo Roberts & Caserio (1965), os valores de $3,04 \cdot 10^5$ J, $3,16 \cdot 10^5$ J e $3,58 \cdot 10^5$ J seriam os níveis máximos para não-ocorrência de quebras das ligações simples de C-N, C-C e C-O, respectivamente. Portanto, devem ser utilizados níveis próximos da faixa de $3,04 \cdot 10^5$ J para eliminação mais eficiente das populações bacterianas do solo, uma vez que as bactérias têm importante contribuição no equilíbrio dinâmico dos nutrientes do solo e contribuem com 20 a 30% da biomassa microbiana do solo (Alexander, 1977).

Pelos resultados obtidos, exposição por 2 min a microondas poderá ser utilizada em substituição aos métodos tradicionais de fumigação-extracção e, ou, fumigação-incubação. Contudo, ensaios deverão ser efetuados para verificar as margens de aplicabilidade do método apresentado para solos com características químicas e físicas distintas e sob diferentes condições de manejo.

CONCLUSÕES

1. A exposição das amostras de solo a microondas, durante 2 min, a $1,62 \cdot 10^5$ J, pode ser utilizada para estimar os valores de C e N microbianos de forma semelhante aos obtidos pela fumigação com clorofórmio para os procedimentos de extração e de incubação.

2. A irradiação reduziu os coeficientes de variação nas amostras de solo submetidas ao procedimento de extração, indicando ser o método irradiação-extracção, em termos operacionais, o mais adequado para estimar o C e o N microbiano no solo.

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1977. 467p.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G. & JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen. A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 17:837-842, 1985.
- DE-POLLI, H. & GUERRA, J.G.M. Biomassa microbiana: perspectivas para o uso e manejo do solo. In: ALVAREZ V., H.V.; FONTES, L.E.F. & FONTES, M.P. O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. p.552-564.
- HENDRICKS, C.W. & PASCOE, N. Soil microbial biomass estimates using 2.450 MHz microwave irradiation. *Plant Soil*, 110:39-47, 1988.
- JENKINSON, D.S. & POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. Method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8:209:213, 1976.
- KASSIN, G.; MARTIN, J.P. & HAIDER, K. Incorporation of a wide variety of organic substrate carbons into soil biomass as estimated by the fumigation procedure. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45:1106-1112, 1981.
- LOVELL, R.D.; JARVIS, S.C. & BARDGETT, R.D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: effects of management changes. *Soil Biol. Biochem.*, 27:969-975, 1995.
- MONZ, C.A.; REUSS, D.E. & ELLIOTT, E.T. Soil microbial biomass and nitrogen estimates using 2.450 MHZ microwave irradiation or chloroform fumigation followed by direct extraction. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 34:55-63, 1991.
- PURI, G. & BARRACLOUGH, D. Comparison of 2.450 MHz microwave radiation and chloroform fumigation-extraction to estimate soil microbial biomass nitrogen using ^{15}N -labelling. *Soil Biol. Biochem.*, 25:521-522, 1993.
- ROBERTS, J.D. & CASERIO, C.M. Basic principles of organic chemistry. New York, Benjamin Cummings, 1965. 1315p.
- SHIELDS, J.A.; PAUL, E.A. & LOVE, W.E. Factors influencing the stability of labelled microbial materials in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 6:31-37, 1974.
- SPARLING, G.P. & WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ^{14}C labelled cells. *Soil Biol. Biochem.*, 20:337-343, 1988.
- STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A., eds. Methods of soil analysis. Part 2. Madison, American Society of Agronomy, 1965. p.1550-1572.
- TEDESCO, M.J.; BOHNEM, H.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5)

- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C. & JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19:703-707, 1987.
- VELA, G.R.; WU, J.F. & SMITH, D. Effect of 2450 MHz microwave radiation on some soil microorganisms *in situ*. *Soil Sci.*, 121:44-51, 1976.
- ZAGAL, E. Effects of microwave radiation on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 21:603-605, 1989.
- WAINWRIGHT, M.; KILLHAM, K. & DIPROSE, M.F. Effects of 2.450 MHz microwave radiation on nitrification and S-oxidation in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 12:489-493, 1980.