

AVALIAÇÃO DA MICORRIZAÇÃO E ATIVIDADE MICROBIANA DE UM SOLO CULTIVADO COM PLANTAS FITOTERÁPICAS

Everton Merlin¹; Elisangela Melato¹; Caroline Zanella Cagnini¹; Ivana Cintra Reinisz¹; Cristine Bonacina¹; Patrícia Motta Novello¹ e Odair Alberton²

¹Universidade Paranaense – UNIPAR, Discente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agricultura, Praça Mascarenha de Moraes 4282, CEP 87502-210, Umuarama – PR. E-mail:evertonmerlin@hotmail.com; elisangelamelato@hotmail.com; carolcagnini@hotmail.com; ivanakcr@hotmail.com; cristinebonacina@hotmail.com; patriciamottanovello@yahoo.com

²Universidade Paranaense – UNIPAR, Docente do programa em Biotecnologia Aplicada a Agricultura, Praça Mascarenha de Moraes 4282, CEP 87502-210, Umuarama – PR. E-mail:odair@unipar.br

*RESUMO: Devido a excedente procura, as plantas medicinais têm ganhando grande espaço no mercado. A microbiota do solo contendo fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem contribuir na produção destas por promoverem associação simbiótica mutualística. O objetivo deste trabalho foi avaliar a micorrização e a atividade microbiana do solo com o cultivo das plantas de hortelã (*Mentha crispa* L.), camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e mil folhas (*Achillea millefolium* L.) coletadas no Horto de Plantas Mediciniais da Universidade Paranaense, Campus II, Umuarama – PR. Foram realizadas análises de colonização radicular e densidade de esporos de FMAs, do carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo, da respiração basal (RBS) e quociente metabólico (qCO_2). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan ($p \leq 0,05$). A planta mil-folhas apresentou um decréscimo na colonização radicular e densidade de esporos de FMAs e no CBM ($p \leq 0,05$) comparado com o solo cultivado com hortelã. Porém, a RBS e o qCO_2 mostraram resultados significativamente maiores ($p \leq 0,05$) na planta mil-folhas comparado com o solo cultivado com camomila. A colonização radicular por FMAs foram altas na camomila (65,9%) e na hortelã (52%) e baixa na mil-folhas (25,6%). Conclui que o cultivo de mil folhas nas condições estudadas diminuiu a colonização radicular e densidade de esporos de FMAs e o CBM.*

PALAVRAS-CHAVE: esporos, colonização radicular, atividade microbiana do solo.

AVALIATION OF MYCORRHIZAL COLONIZATION AND MICROBIAL ACTIVITY IN SOIL CULTIVATED WITH MEDICAL PLANTS

*ABSTRACT: Due to excess demand, medicinal plants are gaining great market space. The soil microbiota containing mycorrhizal fungi (AMF) can contribute to the production of these for promoting mutualistic symbiotic association. The objective of this study was to evaluate mycorrhization and soil microbial activity in mint plant (*Mentha crispa* L.), chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and yarrow (*Achillea millefolium* L.) collected in the Garden Medicinal Plants of the Paranaense University, Campus II, Umuarama - PR. It was conducted analysis of AMF root colonization and spore density, of microbial biomass carbon (MBC) soil, of basal respiration (RBS) and metabolic quotient (qCO_2). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test ($p \leq 0.05$). The yarrow plant had low AMF root colonization and spore density and MBC ($p \leq 0.05$) then in soil cultivated with mint. However, the RBS and qCO_2 showed significantly decreased then in chamomile plant. The AMF root colonization was high on chamomile (65.9%) and mint (52.6%) and low in yarrow (25.6%). In conclusion, yarrow plant cultivated in these local conditions decreased AMF root colonization and spore density, and MBC in soil.*

KEY-WORDS: spores, root colonization, soil microbial activity.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais, condimentares e aromáticas são utilizadas pela medicina em substituição ou associação aos medicamentos sintéticos. Estas possuem ainda óleos essenciais utilizados nas indústrias de cosméticos e perfumarias e são utilizadas no preparo de diferentes tipos de alimentos (Russomanno et al., 2008). Os produtos derivados de plantas medicinais representam um mercado que movimenta bilhões de dólares (Skelly, 1996). Em 1996 estimou-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento da indústria farmacêutica brasileira foram decorrentes de medicamentos derivados de plantas (Simões e Schenkel, 2002). Considera-se também que as vendas nesse setor crescem 10% ao ano, com estimativa de terem alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (Knapp, 2001).

A camomila (*Matricaria chamomilla* L.) possui efeito sedativo, antiespasmódico, anti-inflamatório, entre outros (Kedzia, 2001; Carvalho, et al., 2014; Vieira et al., 2009). Para a hortelã (*Mentha crispa* L.) tem sido descrita efeito analgésico, acelera o trânsito intestinal, antiespasmódica, relachante da musculatura lisa (Grisi et al., 2006). Já a planta mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) têm excelente ação em problemas estomacais, infecções urinárias, espasmos musculares, hemostasia, etc. (Jonsdottir, 2011).

O cultivo dessas plantas requer práticas agronômicas que dispensem a aplicação de produtos químicos, potencialmente tóxicos, pois essas plantas podem ser consumidas diretamente na alimentação ou processadas para compor medicamentos (Knapp, 2001). Nesse aspecto, a microbiota do solo como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem contribuir para o crescimento e sustentabilidade da produção de plantas medicinais.

Os FMAs formam uma associação simbiótica mutualística produzindo hifas intra e extra-radiculares, capazes de absorver elementos minerais do solo e transferi-los para a planta. Nessa simbiose mutualística a planta supre o fungo com energia para crescimento e manutenção via produtos fotossintéticos; já o fungo provê a planta com nutrientes como P e água. A simbiose promove ainda o aumento do volume e da longevidade das raízes; a resistência à patógenos e metais pesados e ainda a maior tolerância ao estresse hídrico (Smith e Read, 2008). Também existem evidências de que FMAs colaboram no aumento do dreno de C da atmosfera, variável importante e pouco estudada diante dos processos de mudanças climáticas (Leake et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade de esporos e a colonização radicular por FMAs de plantas de hortelã, camomila e mil folhas, bem como a atividade microbiana do solo, medida através da respiração basal do solo (RBS), do carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico microbiano do solo (qCO_2) em amostras provenientes do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense, Campus II, Umuarama – PR.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e amostragem

As amostras de solo e raízes das plantas camomila, hortelã e mil-folhas cultivadas em cultivo orgânico foram coletadas no horto medicinal da Universidade Paranaense – UNIPAR, Câmpus II – Umuarama, PR; na latitude de 23°45'59" S, longitude de 53°19'30" W e altitude de 442 m, em Agosto de 2015. O solo tem a formação arenito Caiuá, pertencente à classe LVd19 – LATOSSOLO VERMELHO distrófico.

Foram coletados cerca de 500 g de solo em três pontos do canteiro (2 m x 7,5 m) na profundidade de 0-10 cm, além das raízes das plantas. O solo e a raízes foram acondicionados em sacos plásticos e mantido a 4 °C, até o momento das análises. A análise de uma amostra composta do solo foi realizada pelo laboratório Solo Fértil estabelecido na cidade de Umuarama – PR seguindo os padrões preconizados pela comissão estadual de laboratórios de análises agronômicas (CELA/PR).

Avaliação da colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares

As raízes foram cortadas, com auxílio de estilete, em fragmentos de ± 2 cm. Após foram lavadas em água corrente e mantidas em solução de KOH (10% m/v) a 90 °C por 30 min. O excesso de KOH foi removido e o material vegetal foi imerso em HCl (5% v/v) a 90 °C por 30 min. O ácido foi então removido e as raízes foram coradas com azul de tripano (0,05% m/v) sob banho maria (90 °C; 30 min.), e preservadas em lactoglicerol (Phillips e Hayman, 1970). A percentagem de segmentos radiculares colonizados foi medida sob microscópio óptico (100X) em 100 segmentos dispostos em lâminas (Giovanetti e Mosse, 1980). A colonização radicular total por FMAs foi transformada pela equação $Col._i = (\text{ArcSen} \sqrt{Col. (\%)/100}) \cdot (180/\pi)$ para normalização dos dados.

Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares

O solo (10 g) foi submetido ao peneiramento úmido nas malhas de 0,710 mm e de 0,053 mm (Gerdermann e Nicolson, 1963). Em seguida o retido na malha de 0,053 mm foi centrifugado (3000 rpm, 1512 G, por 3 min). O precipitado foi suspenso em 40 mL de solução aquosa de sacarose 50% (m/v) e novamente centrifugado (2000 rpm, 658 G, por 2 min.). O sobrenadante foi transferido para placas de Petri para a contagem e identificação sob microscópio estereoscópio (40X).

Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo

A determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (CBM) foi feita segundo o método fumigação- extração proposto por Vance et al. (1987) e Tate et al. (1988). Para a fumigação das amostras, pesaram-se 10 g de amostra de solo e adicionou-se 1 mL de clorofórmio isento de etanol em todos os frascos destinados à fumigação, os quais foram fechados e armazenados em local isento de luminosidade por 24 horas, com temperatura em torno de 25 a 28 °C. Após esse período, retirou-se a tampa dos frascos em capela de exaustão, deixando-se evaporar todo o clorofórmio, como proposto por Brookes et al. (1982) e Witt et al. (2000).

Para as amostras não fumigadas foi feita a pesagem de 10 g da amostra de solo. Tanto as amostras fumigadas quanto as não fumigadas de cada tratamento foram repetidas duas vezes, das quais foi utilizada a média. Após isso, realizou-se a extração do C das amostras fumigadas e não fumigadas, conforme descrito por Hungria et al. (2009). Foi estimado o CBM nos extratos usando-se a fórmula: $CBM = (C_f - C_{nf}) / K_c$, onde C_f e C_{nf} representam o C extraído do solo fumigado e não fumigado e K_c é uma constante usada em todas as amostras, segundo Hungria et al. (2009). O K_c utilizado foi de 0,4, conforme sugerido por Kaschuk et al. (2010).

Determinação da respiração basal e quociente metabólico do solo

A respiração basal do solo (RBS) foi determinada de 30 g de solo, que foram acondicionadas juntamente com um frasco de 30 mL com 10 mL de NaOH 1 M dentro de frascos de vidro tipo conserva de 500 mL. Os frascos foram fechados hermeticamente e armazenados no escuro em temperatura ambiente. Após oito dias de incubação, os frascos com NaOH foram acrescidos de 2 mL de BaCl₂ a 10% e três gotas de fenolftaleína (solução alcoólica a 3%) para titulação com HCl 0,5 N conforme Silva et al. (2007).

O quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$) é a razão entre a RBS e a unidade de CBM do solo (Hungria et al., 2009).

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas por meio do teste de Duncan ($p \leq 0,05$) no programa SPSS v.16.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH do solo analisado está com o pH baixo (4,34), baixa capacidade de troca catiônica (3,96) e saturação por bases (48,69%), mostrado nas análises químicas (Tabela 1). O pH foi menor ($p \leq 0,05$) para os solos cultivados com hortelã e mil-folhas (Tabela 2).

Tabela 1. Características química do solo amostrado no Horto Medicinal da Universidade Paranaense - UNIPAR*. Valores do pH do solo em CaCl_2 (pH), fósforo (P), carbono (C), alumínio (Al^{3+}), acidez potencial ($\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+), soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por bases (V)

pH	P (mg dm^{-3})	C (g dm^{-3})	Al^{3+}	$\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	SB	CTC	V (%)
			----- (Cmol _c dm ⁻³) -----							
4,34	13,3	9,12	0,00	3,03	1,38	0,50	0,15	1,93	3,96	48,69

*Análises realizadas a partir de uma amostra composta do solo coletadas no Horto Medicinal da Universidade Paranaense (UNIPAR).

Para Novais et al., (2007) os solos ácidos se caracterizam pela presença de alumínio (Al) livre que é prejudicial para as plantas, influenciando no desenvolvimento do sistema radicular. Entretanto, a partir do pH 5,5 não existe mais Al livre devido à sua precipitação na forma de óxido de Al. Nos solos ácidos verifica-se a fixação do fósforo (P) pelo ferro (Fe) e pelo Al formando compostos insolúveis não aproveitáveis para as plantas.

O cultivo da mil-folhas apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) baixa densidade de esporos e colonização radicular por FMAs (Tabela 2).

O CBM foi significativamente menor com o cultivo da mil-folhas. Porém, a RBS e o $q\text{CO}_2$ foram significativamente maiores (Tabela 2).

Tabela 2. Colonização radicular e densidade de esporos de fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) (número g^{-1} de solo seco), pH do solo em CaCl_2 , carbono da biomassa microbiana (CBM) (mg C kg^{-1} solo), respiração basal do solo (RBS) ($\text{mg C-CO}_2 \text{ kg solo}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) e quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$) ($\text{mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CBM h}^{-1}$)

Tratamentos	pH	Esporos	Colonização	CBM	RBS	$q\text{CO}_2$
Camomila	4,4±0,1a	1,9±0,2ab	65,9±3,6a	145,2±9,4ab	0,8±0,1b	5,6±0,1b
Hortelã	4,0±0,1b	2,5±0,7a	52,6±1,7a	184,6±7,3a	1,3±0,1ab	7,3±0,1b
Mil-folhas	4,0±0,1b	0,6±0,1b	25,6±8,7b	105,5±20,5b	1,5±0,01a	14,3±1,5a
Significância	<0,001	0,046	0,006	0,019	0,047	0,002

Médias (\pm erro padrão, $n = 3$). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Os parâmetros microbiológicos de qualidade do solo são sensíveis às alterações do mesmo como: a presença, o tipo e a diversidade da vegetação (Giller et al., 1997; Zangaro et al., 2012). No presente estudo observamos alta colonização radicular por FMAs nas plantas camomila (65,9) e hortelã (52,6) (Tabela 2). Já a mil-folhas apresentou reduzida colonização (25,6). Carrenho et al. (2007), ressalta que em mil-folhas, as raízes, em geral, não possuem estruturas micorrízicas e colonização periférica pouco frequente o que corrobora com os resultado do presente estudo.

Fatores bióticos e abióticos podem dificultar a sobrevivência dos FMAs (Souza, et al., 2003). Peres et al (2009) verificou que a mil-folhas possui atividade antimicrobiana contendo compostos antracênicos, heterosídeos cardiotônicos, naftoquinonas e antraquinonas. Estes compostos dificultam o crescimento de micro-organismos e são produzidos como defesa da planta, contra vírus, bactérias e fungos (Havsteen, 2002). Desta forma, a ação antimicrobiana desta planta pode dificultar a colonização das raízes com FMAs, o que corrobora com os resultados descritos no presente estudo.

Desta forma, a baixa presença de estruturas micorrízicas e a menor fixação de C no solo, observada para mil-folhas torna o seu cultivo um desafio. Esta associação contribui para o crescimento das plantas, através do aumento da absorção de nutrientes do solo (Smith e Read, 2008). Para a produção de mil-folhas indica-se desta forma: o preparo do solo com aumento da quantidade de C através da matéria orgânica do solo (MOS) e N; a rotação de cultura são pré-requisitos para se obter uma produção satisfatória de mil-folhas.

CONCLUSÃO

A colonização radicular e densidade de esporos de FMAs, e o carbono da biomassa microbiana (CBM) foi menor em mil-folhas em relação à camomila e hortelã. A mil-folhas não é indicada para recuperação de solos degradados devido à baixa resposta micorrízica. Ademais, para o cultivo desta planta sugere-se que seja realizado em solo com alta fertilidade do solo, principalmente em relação MOS, N e P.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Paranaense – UNIPAR pelo apoio à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 319-329, 1982.
- CARVALHO, A. F.; SILVA, D. M.; SILVA, T. R. C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, n.3, p.521-526, 2014.
- CARRENHO, R.; MARINS, J. F.; LIPPERT, M. A. M.; STIVANIM, S. C. Micorrizas arbuscular em plantas medicinais cultivadas na Universidade Estadual de Maringá. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 561-563, 2007.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, p. 235-246, 1963.
- GILLER, K. E.; BEARE, M. H.; LAVELLE, P.; IZAC, A. M. N.; SWIFT, M. J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 3-16, 1997.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GRISI, M. C. M.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; GRACINDO, L. A. M. B.; VIEIRA, R. F. Avaliação de genótipos de *Mentha* spp. nas condições do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.4, p.33-39, 2006.
- JONSDOTTIR, G.; OMARSDOTTIR, S.; VIKINGSSON A.; HARDARDOTTIR I.; FREYSDOTTIR, J. Aqueous extracts from *Menyanthes trifoliata* and *Achillea millefolium*

affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4+ T cells in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 88-93, 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R. A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 288-296, 2009.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1-13, 2010.

KEDZIA, B. Antimicrobial activity of chamomile oil and its components. **Herba Polonica**, v. 37, p.29-38, 2001.

KNAPP, L. **Fitoterapia abre novos campos de pesquisa**. Gazeta Mercantil, São Paulo, 18 set. 2001. Caderno 1, p. 6.

LEAKE, J. R.; JOHNSON, D.; DONNELLY, D. P.; MUCKLE, G. E.; BODDY, L.; READ, D. J. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 1016-1045, 2004.

NOVAIS, R. F; ALVAREZ, V. H; BARROS, N. F; FONTES, R. L; CANTARUTTI, R. B; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Viçosa, 2007.

PERES, R. L.; MORAES, S. C. S.; CARVALHO, C. A.; NASCIMENTO, P. C.; CARVALHO, L. M.; SILVA, M. B.; RAMPELOTTO, P. H.; ROSA, M. B. *Achillea Millefolium* – Asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 81-93, 2009.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 55, p. 157-160, 1970.

RUSSOMANNO, O. M. R.; KRUPPA, P. C.; MINHONI, M. T. A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de plantas de alecrim e manjerição. **Arquivos do Instituto Biológico** v. 75, p. 37-43, 2008.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO_2)**. Seropédica: Embrapa, (Comunicado Técnico 99), 2007, p. 4.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

- SKELLY, A. The Blooming of Botanicals. **The Nutrition**, [S.l.], p. 13, Summer, 1996.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd Edition. New York. 2008.
- SOUZA, R. G., MAIA, L. C., SALES, M. F., TRUFEM, S. F. B. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração no estado da Bahia. Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 49-60, 2003.
- TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 329-335, 1988.
- 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, 1987.
- VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; SANCHES, M. A. S.; BENDASSOLLI, M. C. N. F. Doses de nitrogênio e de cama-de-frango na produção da camomila 'Mandirituba'. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 31, p. 79-85, 2009.
- ZANGARO, W.; ALVES, R. A.; LESCANO, L. E.; ANSANELO, A. P. Investment in fine roots and arbuscular mycorrhizal fungi decrease during succession in three Brazilian ecosystems. **Biotropica**, Lawrence, v. 44, p. 141- 150, 2012.
- WITT, C.; GAUNT, J. L.; GALICIA, C. C.; OTTOW, J. C. G.; NEUE, H. U. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 510-519, 2000.