

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA LOPES GUALDI

**UTILIZAÇÃO DO MÉTODO *TEA BAG INDEX* NA BIODEGRADAÇÃO EM SOLOS
SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE USO EM CAMPO MOURÃO, PARANÁ.**

CAMPO MOURÃO

2019

BRUNA LOPES GUALDI

Utilização do Método *Tea Bag Index* na Biodegradação em solos submetidos a diferentes tipos de uso em Campo Mourão, Paraná.

Projeto de pesquisa apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC 2), do curso de Engenharia Ambiental, do Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB), do Câmpus Campo Mourão, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção de nota.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel de Oliveira Bueno,
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno.

CAMPO MOURÃO

2019

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO INTITULADO
BIODEGRADAÇÃO EM SOLOS SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE USO EM CAMPO MOURÃO,
PARANÁ.

DA DISCENTE
BRUNA LOPES GUALDI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no dia 06 de Dezembro de 2019 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão. A discente foi arguida pela Comissão Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a comissão considerou o trabalho _____(aprovado, aprovado com alterações ou reprovado).

Prof.

Avaliador(a) 1
UTFPR

Prof.

Avaliador(a) 2
UTFPR

Prof.

Co-Orientador(a)
UTFPR

Prof.

Orientador(a)
UTFPR

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a todas as forças do universo que dentre tantas possibilidades me encaminharam para essa cidade e esse campus onde tive a oportunidade de crescer intelectualmente, internamente, espiritualmente, em todos os níveis imagináveis e inimagináveis. Agradeço aos meus pais e irmã que em meio a tantas dificuldades sempre fizeram de tudo para que eu conseguisse chegar até aqui. Agradeço a todos os professores com quem tive a honra de somar conhecimentos, principalmente aos meus orientadores por todo o apoio e parceria.

Agradeço com muito amor a todas as pessoas que conheci, aos amigos que fiz, a Bateria Infernal, às lições que aprendi, a todos os momentos de felicidade e também os de tristeza, pois me fizeram forte e me tornaram quem eu sou hoje com muito orgulho.

RESUMO

A crescente demanda por matéria-prima e a ocupação do solo sem planejamento fez com que mudanças radicais na cobertura vegetal natural acontecessem nas mais diferentes unidades fitogeográficas, alterando significativamente o seu equilíbrio. O presente trabalho teve como objetivo monitorar a biodegradação de matéria orgânica vegetal por meio da aplicabilidade do método *Tea Bag Index* em solos com diferentes tipos de uso e avaliar sua utilização como bioindicador de qualidade do solo. O estudo foi realizado em três áreas com usos de solo distintos. As áreas escolhidas foram mata nativa, área de solo descoberto e área de plantio de monocultura, todas localizadas no município de Campo Mourão – PR. Foram plantados saquinhos de chá verde e vermelho, que possuem diferentes características de degradação, nos períodos de 15, 30 e 60 dias. Também foi realizada coleta de solo para a análise microbiológica para determinação das unidades formadoras de colônias de bactérias aeróbias totais, bactérias produtoras de celulase e fungos totais presente nos ambientes em questão. As médias de perda de biomassa do chá verde foram superiores ao do chá vermelho em quase todos os períodos e áreas de análise. Na área de plantio os tipos de chá não diferiram. Houve maior degradação na Unidade de Conservação, e menor na UTFPR. Assim como a área da Unidade de Conservação apresentou maiores UFC's e a área da UTFPR as menores.

Palavras-chave: Solo. Biodegradação. *Tea bag index*. Microbiologia do Solo.

ABSTRACT

The increasing demand for raw materials and unplanned soil use have led to radical changes in natural vegetation cover in the most diverse phytogeographic units, altering performance or balance. The present work aimed to monitor the biodegradation of organic materials by applying the Tea Bag Index method in soils with different types of use and to evaluate their use as a soil quality bioindicator. The study was conducted in three areas using different soil. The chosen areas were native forest, uncovered soil area and monoculture plant area, all located in Campo Mourão - PR. Green and red tea bags, which have different degradation characteristics, were planted at 15, 30 and 60 days. Soil collection was also performed for microbiological analysis to determine the colony forming units of total aerobic bacteria, cellulase producing bacteria and total fungi present in the environments in question. Because green tea biomass loss media were superior to red tea in almost all periods and areas of analysis. In the planting area the types of tea did not differ. There was greater degradation in the Conservation Unit, and less in UTFPR. As well as the Conservation Unit area presented the largest CFUs and the UTFPR area the smallest.

Keywords: Soil. Biodegradation. Tea bag index. Soil Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas de Coletas de Dados. Sendo: A: mata nativa, B: solo descoberto e, C: plantio convencional, Campo Mourão – Paraná.....	10
Figura 2. Tipo de saquinho confeccionado e utilizado para medir a perda de biomassa através do método <i>Tea Bag Index</i>	11
Figura 3. Representação esquemática da distribuição das três subamostras de cada sítio amostral.....	12
Figura 4. Representação esquemática da metodologia utilizada para estabilização de umidade em estufa, agitação do solo em solução salina, diluição e plaqueamento.....	13
Figura 5. Colônias após a estabilização do crescimento de Bactérias Aeróbias Totais (A), Fungos Totais (B), Bactérias Produtoras de Celulase imersas em solução de Vermelho Congo (1 mg mL^{-1}) (C) e Bactérias Produtoras de Celulase (D).	14
Figura 6. Biodegradação dos chás verde e vermelho para cada período estudado nas áreas do PELA (A), Plantio(B) e UTF(C).	18
Figura 7. Descrição da biodegradação dos chás verde (A) e vermelho (B) para as áreas do PELA, UTFPR e plantio nos períodos de 15, 30 e 60 dias.....	20
Figura 8. Descrição dos dados de UFC/g de solo de Bactérias Aeróbias Totais (A), Bactérias Produtoras de Celulase (B) e Fungos Totais (C) para as áreas do PELA, UTF e Plantio.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios padrão da perda de peso (em gramas) dos chás após diferentes períodos de degradação em três áreas com diferentes usos de solo, Campo Mourão, Paraná.	18
Tabela 2. Médias e desvios padrão de UFC (unidades formadoras de colônias) em solo de três áreas com diferentes usos de solo, Campo Mourão, Paraná. BAT= Bactérias Aeróbias Totais; BPC= Bactérias Produtoras de Celulase; FT= Fungos Totais.....	21

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivo Geral	4
1.1.2 Objetivos Específicos.....	4
1.2 Justificativa	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Área de Estudo	9
3.2 Técnica Tea Bag Index	10
3.3 Análise Microbiológica	11
3.4 Análise Estatística	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Biodegradação do Solo	16
4.2 Microbiologia do Solo	20
5 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O método denominado *Tea Bag Index*, ou seja, o “índice dos saquinhos de chá”, trata-se de uma estratégia europeia inovadora, econômica e padronizada para coletar dados sobre a taxa de biodegradação do solo utilizando-se saquinhos de chá disponíveis comercialmente. Com o uso de dois tipos de chás com tempo de degradação diferente é possível construir uma curva de decomposição usando uma única medida no tempo. O método foi testado avaliando-se sua sensibilidade em biomas contrastantes, confirmando ser suficiente para diferenciá-los. Dentro de um ecossistema, o *Tea Bag Index* responde a diferenças em circunstâncias abióticas, como temperatura do solo e teor de umidade (KEUSKAMP et al., 2013).

Os chás selecionados originalmente são dos tipos verde e de rooibos, no Brasil, de forma similar, são encontrados os chás verde e vermelho provenientes da planta *Camelia sinensis*, originária do sudeste asiático. A primeira colheita das folhas e caules para o preparo dos chás é feita entre três e cinco anos após sua plantação, quando a árvore chega aos vinte anos é atingida sua máxima produtividade e qualidade. Em relação ao preparo dos chás, o chá verde é totalmente não fermentado e composto por folhas jovens enquanto que o chá vermelho é 80% fermentado e composto pelas partes do caule e raízes. Inicialmente os dois tipos passam pelo processo de eliminação das enzimas, onde são expostas a vapor d’água e submetidas a altas temperaturas sendo secas em seguida, isto é o suficiente para o chá verde, para finalizar o chá vermelho, após esse processo é realizado a fermentação, onde o chá adquire a sua coloração característica (FLORIEN, 2019).

A decomposição de matéria orgânica é um processo que envolve uma enorme variedade de microrganismos do solo, bactérias e fungos que são importantes participantes dos grandes ciclos da natureza, como os ciclos do nitrogênio, do fósforo, do enxofre e do carbono, e pode ser determinada diretamente pela perda de peso ou por técnicas que demonstrem a liberação de carbono, formação de nova biomassa e metabolitos através da decomposição de resíduos orgânicos (TAUK, 1990; FERREIRA, 2019). Durante a decomposição cerca de 20% do carbono contido nos

resíduos orgânicos é liberado para atmosfera como gás carbônico (CO₂) enquanto o restante passa a compor a matéria orgânica do solo. Os efeitos do teor e da qualidade da matéria orgânica do solo sobre os microrganismos são medidos pela biomassa microbiana, ou o total de organismos presentes numa amostra de solo e a atividade microbiana, medidas que representam a integração dos efeitos da matéria orgânica sobre as condições biológicas do solo (HERNANI, 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Monitorar a biodegradação de matéria orgânica vegetal por meio da aplicabilidade do método TBI em solos com diferentes tipos de uso e avaliar sua utilização como bioindicador de qualidade do solo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Medir a degradação de chás de diferentes tipos através da técnica *Tea Bag Index*;
- Comparar solos com diferentes usos quanto à velocidade de degradação.
- Comparar a composição microbiológica dos solos;

1.2 Justificativa

Apesar do progresso alcançado na determinação de potenciais fatores de liberação de carbono por meio de experimentos de decomposição em larga escala, as previsões climáticas ainda são prejudicadas pela limitação de dados em escala global devido à complexidade das análises e alto custo dos estudos comparativos de degradação de material vegetal. Levando-se em consideração que as alterações no equilíbrio entre armazenamento e liberação de carbono no solo podem ampliar ou

atenuar significativamente o aquecimento global, o *Tea Bag Index* tem dois objetivos principais. Primeiramente, é uma maneira viável de aumentar a resolução das medidas mundiais de decomposição e em segundo lugar, o método é útil, juntamente com os estudos de decomposição, para separar os aspectos da qualidade da serapilheira do conjunto completo de condições ambientais que constituem a matriz de decomposição, além do mais, seu uso facilita a comparação de dados entre biomas, ecossistemas e tipos do solo (KEUSKAMP et al., 2013).

A qualidade do solo é uma propriedade determinante para a regularização da produtividade e sustentabilidade das culturas, influenciando também a saúde das plantas, animais e conseqüentemente os seres humanos (FAGERIA, 2002). A fração biológica existente no solo exerce grande influência nos demais componentes que o compõem, é constituída por diversos microrganismos que atuam sobre a matéria orgânica do solo, no desenvolvimento de processos de síntese e de análise de compostos orgânicos, o que torna o solo uma entidade biológica dinâmica (GALLI,1964).

A atividade microbiana representa a fração viva da biomassa microbiana e sua sensibilidade às mudanças provocadas por sistemas de manejo, estas são consideradas bom indicadores da qualidade ou da degradação do solo. Nos solos tropicais, os organismos vivos do solo atuam como reservatório de nutrientes, que após sua morte e decomposição são liberados no solo e absorvidos de forma direta pelas plantas (HERNANI, 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A crescente demanda por matéria-prima e a ocupação do solo sem planejamento fez com que mudanças radicais na cobertura vegetal natural acontecessem nas mais diferentes unidades fitogeográficas, alterando significativamente o seu equilíbrio (CURCIO; BONNET, 2013). Entende-se que a atividade econômica, a qualidade de vida e a coesão das sociedades humanas são inevitavelmente dependentes dos serviços gerados pelo ecossistemas, sendo iminente o estudo da dinâmica dos serviços ecossistêmicos e suas interações com as variáveis humanas (ANDRADE; ROMEIRO, 2009). Dentre os serviços ecossistêmicos, o solo apresenta grande importância na participação para manter as interações em equilíbrio além de ser um fundamental reservatório de carbono, que se encontra nele retido em forma de biomassa viva e matéria orgânica em decomposição (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2000).

Existem muitas tentativas de definir a qualidade do solo descrita na literatura, bem como sugestões de métodos e estratégias para sua caracterização devido sua importância (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2000). Uma boa sugestão foi feita por Doran e Parkin em 1994, onde qualidade do solo ficou definida como “a capacidade, de um dado solo, em funcionar no ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde do animal e da planta”.

A pedosfera atua como “alicerces” da vida em ecossistemas terrestres, sendo o solo um medidor solo principalmente dos fluxos de água entre a hidrosfera, litosfera, biosfera e atmosfera. Juntamente com o substrato rochoso, é influenciador da qualidade da água que usamos, é utilizado para várias atividades humanas, influencia na qualidade do ar e com raras exceções, pode-se afirmar que as plantas clorofiladas só podem adquirir água e nutrientes através dele (LEPSCH, 2002). Em relação aos nutrientes, as plantas retiram do solo quinze elementos essenciais à vida que estão associados a dois grupos sendo eles os macro e micronutrientes. Sua atuação como

o principal meio para sustentar plantas é o que representa a diferença entre a sobrevivência e a extinção da maior parte da vida terrestre (LEPSCH, 2002).

O solo é um fator chave para a saúde do ambiente e o principal componente responsável pela fertilidade de solos tropicais é a matéria orgânica, pois integra todos os aspectos de química, física e biologia deste recurso. As mudanças nos teores dessa matéria orgânica levam anos para serem detectadas, porém, qualquer alteração que aconteça com ela também afeta os microrganismos presentes nesse meio. Os efeitos na comunidade microbiana podem ser detectados com mais rapidez o que os torna importantes bioindicadores da saúde do solo e da mesma forma, da saúde do ambiente (LOBATTO, 2015).

Constituída por fungos, bactérias e actinomicetos, que atuam em processos de decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação do solo, entre outros, a biomassa microbiana é a parte viva mais ativa da matéria orgânica presente no solo. Dessa forma, a biomassa microbiana é um elemento que regula a decomposição e acúmulo de matéria orgânica e transformações de nutrientes, logo, a observação de suas propriedades como a quantidade, atividade, composição e diversidade das comunidades é um importante bioindicador de qualidade do solo (JENKINSON; LADD, 1981; JUNIOR; MENDES, 2007; SINGH et al., 1989). A decomposição da matéria orgânica depende de uma sequência de condições que podem ser listadas em ordem decrescente: macroclima, microclima (lugar), qualidade do substrato e comunidade de organismos decompositores (DENICH; BRANDINO; BLUM, 1986). Além do mais, a ciclagem de nutrientes em ecossistemas tem sido amplamente estudada não apenas para o entendimento do funcionamento dos ecossistemas, com a obtenção de um maior conhecimento sobre a sua dinâmica pode-se estabelecer práticas de manejo florestal para recuperação de áreas degradadas e manutenção da produtividade de sítios degradados em recuperação (SOUZA; DAVIDE, 2001).

A simplicidade da avaliação, baixo custo e possibilidade de pronta relação com algum atributo importante para a manutenção da sustentabilidade de um dado ecossistema, natural ou agrícola, são características desejáveis de um indicador. Sob

esse aspecto, indicadores microbiológicos permitem inferir sobre o funcionamento dos ciclos biogeoquímicos do carbono e nutrientes, importantes para a manutenção da comunidade vegetal, seja nativa, seja implantada (NOGUEIRA; CUNHA, 2013). A ideia de usar chás como indicador de biodegradação do solo surgiu da necessidade de se obter dados globais sobre as emissões de carbono de ecossistemas (KEUSKAMP et al., 2013). Essa nova abordagem tem como componente chave o uso de saquinhos de chá disponíveis comercialmente como padrão representativo de “plantas mortas”. Esse método permite a geração de dados globais com a participação de voluntários em todo o mundo. Os dados coletados são usados para calcular um *Tea Bag Index*, que pode ser definido como “Índice de Saco de Chá”, que fornece informações locais, regionais e globais. Determina-se o *Tea Bag Index* através de um experimento simplificado que envolve o enterro de sacos de chá verde e vermelho, seguido pela medição de perda de massa após um período de tempo. (KEUSKAMP et al., 2013; WIDER; LANG, 1982). Apenas alguns estudos que testaram a decomposição em escala global utilizando a serrapilheira mostram que a combinação de temperatura e umidade pode explicar de 50 a 70% da variação na decomposição. Porém, estes estudos não abrangem uma grande gama de locais e biomas (BERG et al. 1993; TROFYMOWA et al. 2002; PARTON et al. 2007). Existe uma forte necessidade de medições a nível global para aumentar o poder preditivo de tais modelos.

Como os tipos de chá são compostos de materiais diferentes, sua decomposição é indicativa para um modelo de decomposição de duas fases, com uma fase inicial rápida e uma segunda fase mais lenta quando a perda de peso é baixa. O chá vermelho apresenta uma taxa de decomposição mais lenta em comparação com o chá verde, tornando-se fácil a conferência e padronização dos resultados em locais distintos (KEUSKAMP et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em três áreas com usos de solo distintos. As áreas escolhidas foram mata nativa, área de solo descoberto e área de plantio de monocultura, todas localizadas no município de Campo Mourão – PR. A escolha das áreas levou em consideração o nível de tratamento em que o solo se encontrava, sendo a área de mata nativa e considerada ausente de intervenção humana, a área de solo descoberto exposta e sofre ação antrópica como passagem de pessoas, e a área de cultivo que é tratada pelo método convencional de plantio.

A área de mata nativa se encontra dentro do Parque Estadual Lago Azul (PELA), possui 1.749,01 ha e está inserido nos municípios de Campo Mourão e Luiziania. Faz limite com terras particulares e o Rio Mourão, sendo formada por Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Mista e elementos de Cerrado (PARANÁ, 2005) (Figura 1A). A área de solo descoberto está situada dentro do câmpus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e está posicionada entre uma horta experimental e um bosque em formação (Figura 1B). E a área de plantio está em uma propriedade localizada adjacente ao câmpus da UTFPR – CM, na qual é feito anualmente o plantio de soja (Figura 1C).

O município está situado em uma área com predominância de latossolo vermelho distroférico, caracterizado por baixa fertilidade e altos teores de ferro, são húmicos, ou seja, com uma camada superficial rica em matéria orgânica, são profundos e porosos, apresentam um desenvolvimento radicular em profundidade, são susceptíveis à compactação, com pH entre 4 e 5,5 (SANTOS; ZARONI; CLEMENTE, 2019; MOREIRA et al., 2012).

Figura 1 - Áreas de Coletas de Dados. Sendo: A: mata nativa, B: solo descoberto e, C: plantio convencional, Campo Mourão – Paraná.



Fonte: Adaptado do Google Earth. Autoria própria.

3.2 Técnica Tea Bag Index

A degradação da matéria orgânica no solo foi medida utilizando dois tipos de chás com diferentes taxas de degradação. A diferença na taxa de degradação está ligada as partes da planta utilizadas para o preparo de cada chá, uma vez que o chá verde é composto por folhas e possui taxa de decomposição superior ao chá vermelho, que é composto por raízes e estas possuem mais lignina (composto menos solúvel) o que dificulta sua decomposição (FREIRE et al., 2010).

O experimento foi adaptado de Keuskamp (2013), onde foram produzidos saquinhos de chá com tecido *voil* semelhante aos saquinhos de chá comerciais, a escolha do tecido é referente ao tamanho de seus poros, pois a microfauna não deve fazer parte da análise (Figura 2). Dentro de cada saquinho foi adicionado um grama de chá, do tipo verde e vermelho, separadamente. Esses saquinhos foram plantados em cada uma das três áreas de estudo na quantidade de 5 saquinhos de cada tipo de chá por área, ou seja, 10 saquinhos de chá por área. Os saquinhos foram plantados no solo a uma profundidade de aproximadamente 10 cm. O material vegetal permaneceu enterrado durante períodos de 15, 30 e 60 dias entre os meses de junho e novembro, e foram feitas três repetições para cada período. Ou seja, assim que os saquinhos eram retirados, em local ao lado, eram plantados outros.

Figura 2. Tipo de saquinho confeccionado e utilizado para medir a perda de biomassa através do método *Tea Bag Index*.



Fonte: Autoria Própria

Após serem coletados, os chás passaram por uma etapa de estabilização para perda de água em uma estufa de secagem e esterilização a temperatura de 37°C. A partir da estabilização do material, os chás foram pesados para obtenção do peso final e análise da perda de biomassa.

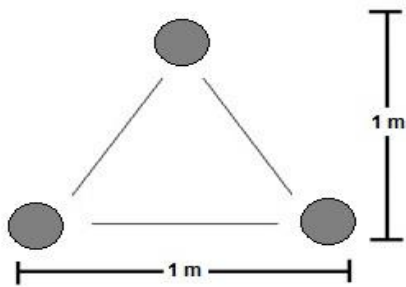
3.3 Análise Microbiológica

Com a finalidade de complementar o estudo sobre o *Tea Bag Index* optou-se por realizar a análise da composição microbiológica existente em cada área em que ocorreram as coletas, onde é esperado que nos locais com maior degradação haja maior incidência de unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos. Os microrganismos analisados foram as bactérias produtoras de celulase, bactérias aeróbias totais e fungos totais devido a suas características biodegradantes, em um

intervalo de tempo de quinze dias para as três primeiras coletas e um intervalo maior entre estas e a última, de aproximadamente três meses.

A técnica consistiu em retirar uma amostra de solo homogeneizado de cada área, onde anterior à homogeneização foram feitos três buracos no chão de aproximadamente dez centímetros de profundidade, que juntos formavam um triângulo que englobava a área em que os saquinhos de chá foram plantados e destes buracos foram retirados a porção de solo a ser analisada (Figura 3). Posteriormente, em laboratório, foi feita a estabilização da umidade, utilizando 100 g de solo de cada amostra coletada, armazenados em estufa de secagem e esterilização em temperatura constante de 30 °C.

Figura 3. Representação esquemática da distribuição das três subamostras de cada sítio amostral.



Fonte: Freitas (2017).

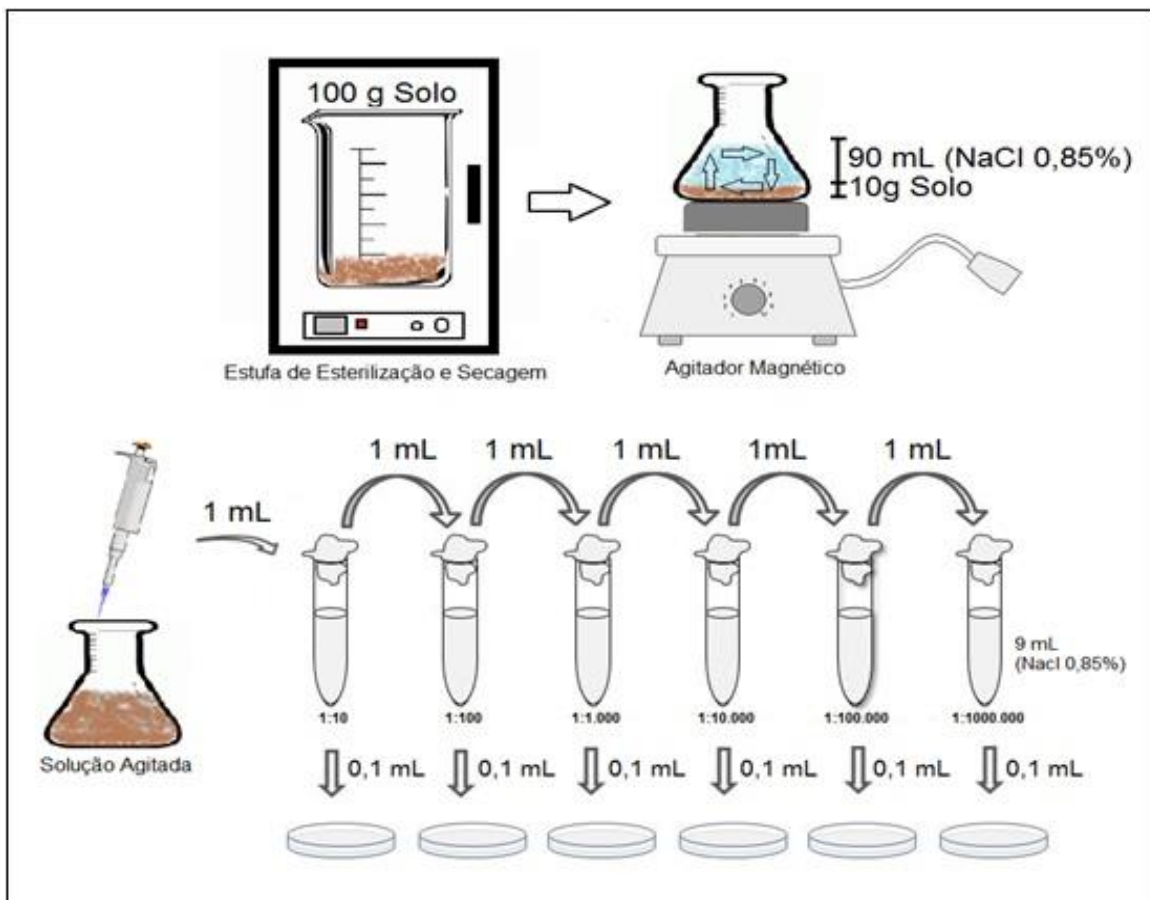
Com as amostras estabilizadas, foi feita a sua diluição, onde diluiu-se 10 g de solo em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) estéril, e manteve-se o material diluído sob agitação em agitador magnético com rotação rápida durante 40 minutos. Em sequência, fez-se a diluição seriada para cada amostra, diluindo 1 mL da solução obtida em 9 mL de solução salina estéril, sendo esta diluição realizada até obter-se a concentração 10^{-8} . Após esse processo de preparação das concentrações, foi feito o plaqueamento do material, onde foi utilizado as concentrações 10^{-4} até a 10^{-6} para determinação de fungos totais, e as concentrações 10^{-6} até a 10^{-8} para bactérias aeróbias totais e bactérias produtoras de celulase, que permaneceram na estufa por

48h até que fosse possível fazer a contagem das unidades de colônias formadas (Figura 4). Por meio da metodologia proposta por Mendes e Junior (2012), o cálculo das unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC g⁻¹) foi executado após a quantificação dos microrganismos por meio da equação:

$$1:\text{UFC g}^{-1} = \text{número médio de colônias} \times \text{diluição da amostra} \times 10$$

(onde o fator 10 refere-se ao fato de se plaquear apenas 100 µL de suspensão).

Figura 4. Representação esquemática da metodologia utilizada para estabilização de umidade em estufa, agitação do solo em solução salina, diluição e plaqueamento.

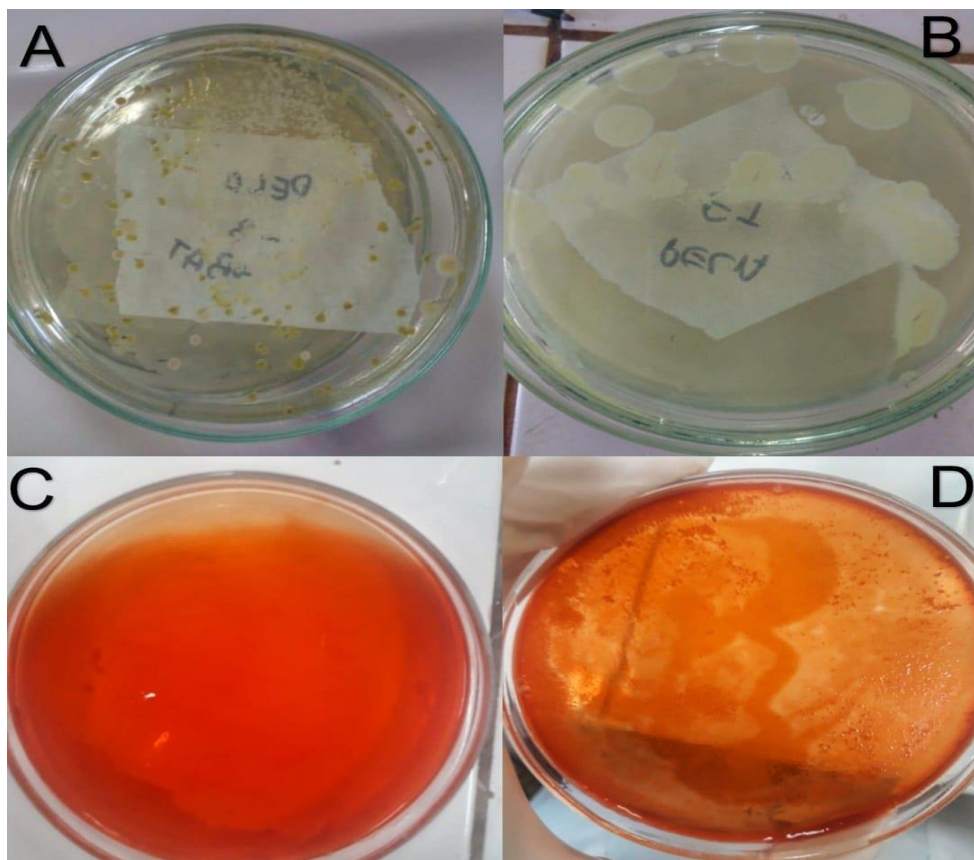


Fonte: Freitas (2017).

O plaqueamento para análise do crescimento de bactérias aeróbias totais (Figura 5A) e bactérias produtoras de celulase (Figura 5D) foi feito com o meio de cultura Luria Bertani adicionado 0,2% de carboximetilcelulose. Após a estabilização

do crescimento, as placas de bactérias produtoras de celulase foram imersas em solução de vermelho congo (1 mg mL^{-1}) (Figura 5C) e lavadas com solução NaCl 1M (Sambrook; Russel, 2001). Para a contagem do crescimento de fungos totais utilizou-se o meio Martin's-Bengala Agar (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2011) (Figura 5B).

Figura 5. Colônias após a estabilização do crescimento de Bactérias Aeróbias Totais (A), Fungos Totais (B), Bactérias Produtoras de Celulase imersas em solução de Vermelho Congo (1 mg mL^{-1}) (C) e Bactérias Produtoras de Celulase (D).



Fonte: Autoria Própria

3.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos pela técnica TBI e a análise microbiológica passaram por análise de variância (Anova) de um critério e posteriormente pelo teste tukey, quando houve diferença para comparar a composição das comunidades microbiológicas e da perda de biomassa nas áreas com diferentes tipos de uso do solo. Assim como a comparação da velocidade com que a biodegradação aconteceu entre as diferentes áreas também passou por estes testes. Foi utilizada a média dos valores de UFC para aplicar o teste. Para a comparação dos chás dentro da mesma área, foi aplicado o teste t.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biodegradação do Solo

A média de perda de peso do chá verde foi numericamente superior a do chá vermelho na maioria dos períodos analisados (Tabela 1). Não houve diferença entre os dois tipos de chá no PELA no período de 15 dias ($t=-1,1432$, $GL=22,41$ e $p=0,13$) nem para o período de 60 dias ($t=1,4923$, $GL=18$ e $p=0,08$), entretanto, para o período de 30 dias a degradação foi diferente entre os tipos de chá ($t=2,6981$, $GL=18,24$ e $p=0,0073$) com o chá verde apresentando maior média de degradação em relação ao vermelho (Figura 6A). Na área de plantio, não houve diferença entre os dois tipos de chá na comparação entre o mesmo período (para 15 dias $t=-0,399$, $GL=28$ e $p=0,34$, para 30 dias $t=0,5568$, $GL=19,01$ e $p=0,29$ e para 60 dias $t=0,7332$, $GL=18$ e $p=0,23$)(Figura 6B). Na área da UTFPR não houve diferença entre os dois tipos de chá no período de 15 dias ($t=0,916$, $GL=28$ e $p=0,18$), entretanto, a degradação entre os tipos de chá foram diferentes para a comparação entre os mesmos períodos, de 30 e 60 dias ($t=2,3156$, $GL=28$ e $p=0,014$ e $t=2,3924$, $GL=18$ e $p=0,0139$, respectivamente) sendo a degradação do chá verde superior a do chá vermelho (Figura 6C).

Esperava-se que o chá verde apresentasse uma taxa de biodegradabilidade relativamente maior em relação ao chá vermelho devido às diferenças em suas composições, onde o chá vermelho possui propriedades mais resistentes a decomposição. Quando houve diferença, o chá verde corroborou com essa indagação, espera-se uma decomposição inicial mais rápida deste chá devido à sua maior fração de compostos solúveis em água em contraste com o baixo conteúdo de compostos solúveis no chá vermelho (DIDION et al., 2016). O experimento foi realizado numa escala de tempo em que a decomposição da serrapilheira pode ser considerada em estágio inicial (perda de massa de 0 a 40%) sendo caracterizada pela lixiviação de compostos solúveis e facilidade de decompor compostos não lignificados (DJUKIC et al., 2018), o que pode explicar a maior degradação registrada no chá verde. O estágio tardio (perda de massa de 40 a 100%) abrange a degradação do

tecido lignificado (DJUKIC et al., 2018), que é o caso da composição do chá vermelho. Existe a possibilidade dos resultados serem diferentes em experimentos mais longos, devido a essa característica. Neste estudo, o maior período de incubação foi de 3 meses, incluso no estágio inicial.

Além disso, Keuskamp et al. (2013) fizeram para verificar a diferença de degradação entre os tipos de chá, experimento em laboratório para acompanhar a velocidade com que cada tipo de chá degradava ao longo do tempo. A decomposição do material lábil no chá vermelho continua depois que todo o material lábil do chá verde já foi consumido, logo, a degradação inicial do chá verde foi muito rápida, estabilizando-se a partir de 40 a 60 dias, enquanto que o chá vermelho ainda estava com a degradação ativa. A duração da incubação foi fixada em 90 dias, tempo suficiente para o chá verde, mas considerado curto para o estágio inicial de estabilização do chá vermelho sob uma ampla gama de condições ambientais.

Entretanto, não houve diferença de degradação entre os dois chás analisados na área de cultivo em períodos distintos. Segundo Gavazov (2010), o solo do plantio convencional apresenta C mais recalcitrante, é mais humificado (substâncias húmicas dizem respeito a estabilidade e a ciclagem de matéria orgânica, definindo-as em lábil ou recalcitrante) e mais resistente ao ataque de microrganismos. Essas características podem explicar porque não houve diferença entre os chás, uma vez que a degradação geral é mais dificultada neste tipo de tratamento do solo. Além do mais, sistemas de plantio recebem grande aporte de matéria orgânica. Com isso, são proporcionadas mudanças benéficas, tais como, o aumento da biomassa e da atividade de microrganismos e na dinâmica de nutrientes (HERNANI, 2019).

Os fatores ambientais que mais influenciam na biodegradação do solo são a temperatura e a precipitação (GAVAZO, 2010; KEUSKAMP et al., 2013). Importa também a condição do solo, clima, umidade, cobertura vegetal correlacionados com o carbono, onde espera-se que a degradação aumente ou diminua com o potencial de sequestro de carbono do solo terrestre. Em solos cobertos por vegetação é encontrado maior estoque de carbono devido aos serviços ecossistêmicos providos

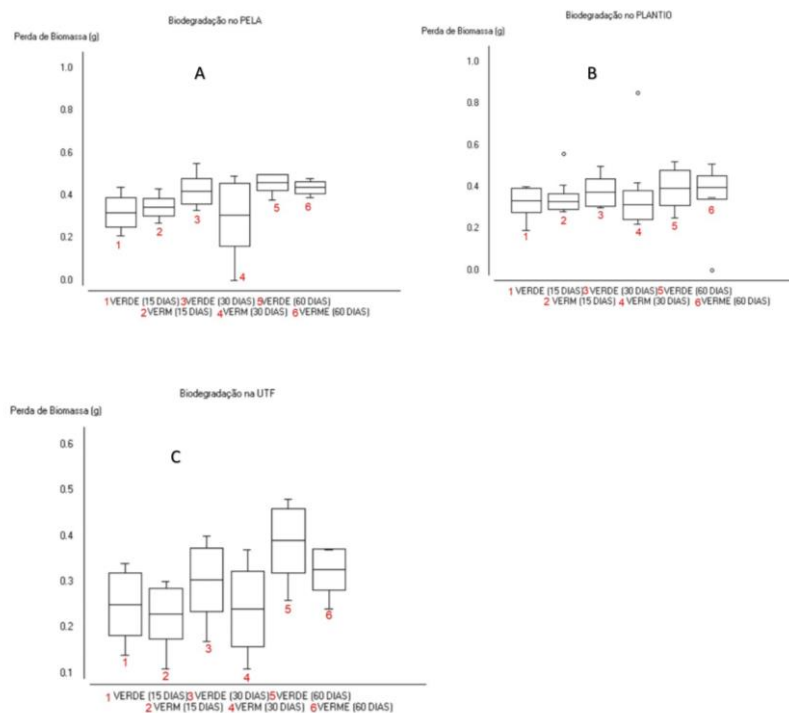
pelas florestas, conseqüentemente há maior degradação e assim sucessivamente (FAJARDO; TIMOFEICZYK JUNIOR, 2015; KEUSKAMP et al., 2013).

Tabela 1. Médias e desvios padrão da perda de peso (em gramas) dos chás após diferentes períodos de degradação em três áreas com diferentes usos de solo, Campo Mourão, Paraná.

		15 dias (N=15)	30 dias (N=15)	60 dias (N=10)
PELA	Verde	0,32 ($\pm 0,07$)	0,42 ($\pm 0,06$)	0,46 ($\pm 0,03$)
	Vermelho	0,34 ($\pm 0,04$)	0,36 ($\pm 0,08$)	0,44 ($\pm 0,03$)
UTF	Verde	0,25 ($\pm 0,06$)	0,30 ($\pm 0,07$)	0,39 ($\pm 0,07$)
	Vermelho	0,23 ($\pm 0,05$)	0,24 ($\pm 0,08$)	0,33 ($\pm 0,04$)
Plantio	Verde	0,33 ($\pm 0,06$)	0,37 ($\pm 0,06$)	0,34 ($\pm 0,08$)
	Vermelho	0,34 ($\pm 0,07$)	0,35 ($\pm 0,15$)	0,40 ($\pm 0,05$)

Fonte: Autoria Própria.

Figura 6. Biodegradação dos chás verde e vermelho para cada período estudado nas áreas do PELA (A), Plantio(B) e UTF(C).



Fonte: Autoria Própria.

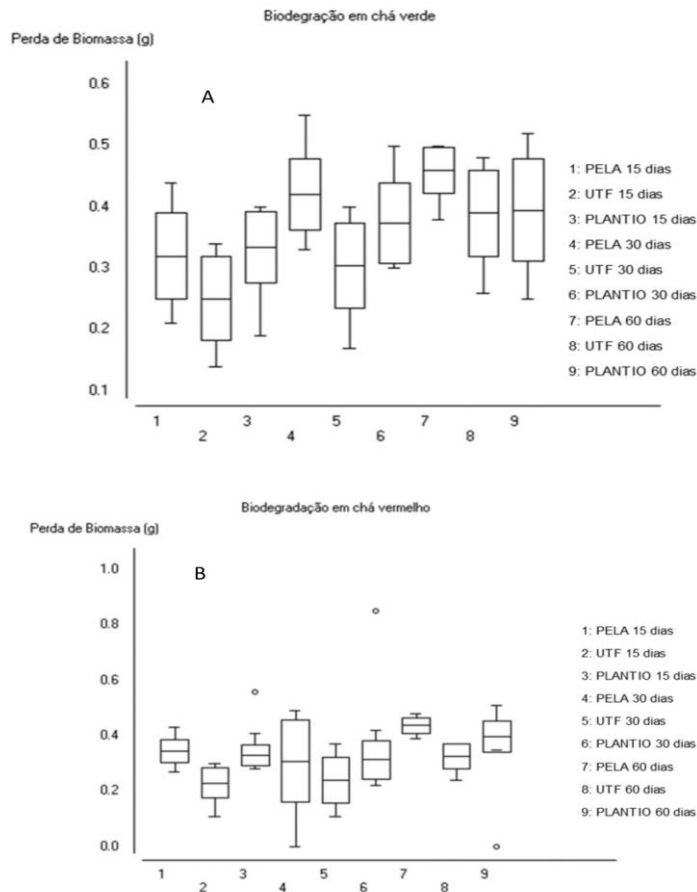
Tratando-se da biodegradação de cada tipo de chá nas diferentes áreas, o chá verde apresentou diferença de degradação entre todas as áreas. Para o período de 15 dias a degradação do chá verde foi maior no PELA e no Plantio do que na a área da UTFPR ($H=7.0196$, $GL=2$ e $p=0.0027$). Para o período de 30 dias aconteceu o mesmo ($H= 11.9862$, $GL=2$ e $p= 0.0002$) e não houve diferença de degradação entre as áreas para o período de 60 dias ($H= 3.4298$, $GL=2$ e $p= 0.0459$) (Figura 7A) . Definida como área de solo descoberto anteriormente, nas divergências constatadas, a área de estudo da UTFPR foi a que apresentou menor média de degradação em relação às outras áreas estudadas. Esse fato corrobora com a coleta de dados realizada por Keuskamp et al. (2013) em que o armazenamento de carbono foi menor em solos com temperaturas elevadas, e por consequência, a estabilização da degradação foi menor. Com o solo descoberto e em contato direto com a intempéries ambientais, este se torna mais vulnerável e com maior capacidade de absorção de calor. Estes resultados mostram que os parâmetros do TBI são sensíveis à diferenças específicas do ecossistema e, ao mesmo tempo, seguem tendências climáticas gerais em escala global.

Em uma metanálise dos fatores que influenciam as taxas de perda de biomassa, Zhang et al. (2008) verificaram, semelhante ao estudo de Djukic et al. (2018), a influência direta da qualidade da serrapilheira (relação C:N e o teor total de nutrientes) nas taxas da perda de massa. Para Djukic et al. (2018), o fator principal da perda de biomassa foi a qualidade da serrapilheira, e os efeitos dos diferentes usos da terra pouco influenciaram. Sendo o PELA o local de mata nativa sem intervenção antrópica, espera-se que este apresente maior qualidade em sua composição de modo geral devido a sua preservação, em relação às outras duas área, onde uma encontra-se degrada do ponto de vista de cobertura do solo, pois é composta apenas por gramíneas e sofre com a intervenção antrópica (passagem de pessoas) e a outra está sob influência de tratamento convencional, considerado prejudicial para saúde do solo.

Para o chá vermelho não houve diferença entre as áreas na biodegradação de 15 e 30 dias ($H= 0.0000$, $GL=2$ e $p= 0.9999$ e $H= 2.6396$, $GL=2$ e $p= 0.0815$

respectivamente). Entretanto, para o período de 60 dias o chá vermelho degradou mais na área do PELA que da UTFPR ($H= 4.6340$, $GL=2$ e $p= 0.0182$) (Figura 7B).

Figura 7. Descrição da biodegradação dos chás verde (A) e vermelho (B) para as áreas do PELA, UTFPR e plantio nos períodos de 15, 30 e 60 dias.



Fonte: Autoria Própria.

4.2 Microbiologia do Solo

No PELA as UFCs são superiores, com excessão dos FT, enquanto que a UTF apresenou os menores resultados, com excessão dos FT, que foram superiores aos demais.

A biomassa microbiana tem 90% de sua atividade realizada por fungos e bactérias, ou seja, quanto maior a presença destes microrganismos no solo, mais saudável e fértil este é. A fertilidade do solo está ligada aos nutrientes (em formas biodisponíveis) necessários ao seu crescimento, ou uma população microbiana que possa liberá-los para as plantas rapidamente (CARDOSO et al., 2009). Isto corrobora com o fato do PELA possuir as maiores UFCs de bactérias. Segundo Stöcker et al. (2017), os fungos são os microrganismos mais facilmente colonizáveis em solos com alto grau de degradação, o que pode explicar a UTFPR ter apresentado maiores UFCs de fungos totais.

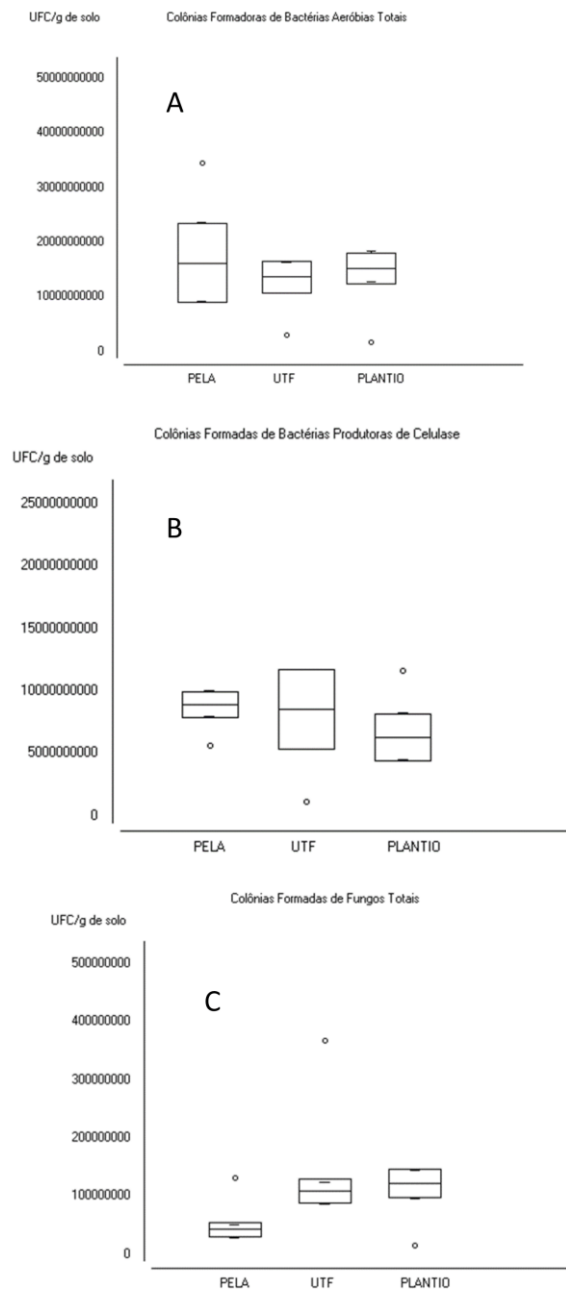
Tabela 2. Médias e desvios padrão de UFC (unidades formadoras de colônias) em solo de três áreas com diferentes usos de solo, Campo Mourão, Paraná. BAT= Bactérias Aeróbias Totais; BPC= Bactérias Produtoras de Celulase; FT= Fungos Totais.

	BAT		BPC		FT	
PELA	2,08x10 ¹⁰	(±2,95)	8,11x10 ⁹	(±3,03)	6,46x10 ⁷	(±1,53)
UTF	1,10x10 ¹⁰	(±0,74)	6,68x10 ⁹	(±3,11)	1,74x10 ⁸	(±3,02)
Plantio	1,19x10 ¹⁰	(±0,23)	7,64x10 ⁹	(±2,6)	9,51x10 ⁷	(±3,56)

Fonte: Autoria Própria.

A partir do teste estatístico foi constatado que não há diferença entre os valores das UFCs analisadas nas áreas de estudo. Foi obtido o valor de H= 1,7425, GL=2 e p= 0,2287 para Bactérias Aeróbias Totais (Figura 8A), H= 0,1916, GL=2 e p= 0,8295 para Bactérias Produtoras de Celulase (Figura 8B) e H= 1,6967, GL=2 e p=0,2365 para Fungos Totais (Figura 8C). De forma geral, os indicadores microbiológicos foram abundantes em todas as áreas.

Figura 8. Descrição dos dados de UFC/g de solo de Bactérias Aeróbias Totais (A), Bactérias Produtoras de Celulase (B) e Fungos Totais (C) para as áreas do PELA, UTF e Plantio.



Fonte: Autoria Própria.

5 CONCLUSÃO

Com a análise dos chás verde e vermelho foi possível detectar a diferença da taxa de biodegradação dos mesmos relacionada a composição de cada tipo de chá.

Foi possível verificar a sensibilidade da técnica *Tea Bag Index* através da escolha de solos com diferentes usos correlacionados a velocidade de biodegradação uma vez que o estoque de carbono está intimamente ligado ao maior ou menor poder de estabilização da degradação em solos com diferentes tipos de cobertura vegetal.

A composição microbiológica analisada também se mostrou sensível aos diferentes tipos de uso do solo e pode ser relacionada ao estoque de carbono, tendo apresentado maiores unidades formadoras de colônias para a área florestal e as menores para a área de solo descoberto. Desta forma, é um indicador biológico que agrega valor ao procedimento de análise da biodegradação do solo.

Portanto, a monitoração da biodegradação de matéria orgânica vegetal por meio da aplicabilidade do método *Tea Bag Index* em solos com diferentes tipos de uso mostrou-se satisfatória. Sua utilização como bioindicador de qualidade do solo é viável, assim como a replicação em partes distintas do mundo contribuem para a atualização de dados sobre a biodegradação de diferentes tipos de solo.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Daniel Caixeta; ROMEIRO, Ademar Ribeiro. Serviços ecossistêmicos e sua importância para o sistema econômico e o bem-estar humano: Texto para Discussão. **le/unicamp**, Campinas, v. , n. 155, p.2-45, fev. 2009.

BERG, Peter et al. **Eddy correlation measurements of oxygen fluxes in permeable sediments exposed to varying current flow and light**. *Limnology And Oceanography*, [s.l.], v. 58, n. 4, p.1329-1343, 14 jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.2013.58.4.1329>.

CARDOSO, Evaldo Luis et al. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em pastagem cultivada e nativa no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.631-637, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2009000600012>.

CURCIO, Gustavo Ribas; BONNET, Annete. **A degradação do solo e algumas implicações funcionais ecológicas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Núcleo Estadual do Paraná, Londrina, v. 3, p.413-418, out. 2013.

DENICH, Manfred; BRANDINO, Zeni Goes; BLUM, Erhard. **A Decomposição da Matéria Orgânica**. In: **AGROPECUÁRIA, Empresa Brasileira de Pesquisa**. Pesquisas Sobre Utilização e Conservação do Solo na Amazônia Oriental. Belém: Embrapa - Cpatu, 1986. p. 163-164.

DIDION, Markus et al. Towards Harmonizing Leaf Litter Decomposition Studies Using Standard Tea Bags—A Field Study and Model Application. **Forests**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.167-180, 1 ago. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/f7080167>.

DJUKIC, Ika et al. Early stage litter decomposition across biomes. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 628-629, p.1369-1394, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.012>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA: **Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo - Manual Técnico – 2000**. Jaguariúna, 2000. 198 p.

FAGERIA, N. K. Soil quality vs. environmentally-based agricultural management practices. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, n. 13-14, p. 2301-2329, 2002.

FAJARDO, Ana Milena Plata; TIMOFEICZYK JUNIOR, Romano. Avaliação Financeira do Sequestro de Carbono na Serra de Baturité, Brasil, 2012. **Floresta e Ambiente**,

[s.l.], v. 22, n. 3, p.391-399, set. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.061413>.

FERREIRA, Ana Lúcia. **Mas, e o que são decompositores?** Disponível em: <https://www.embrapa.br/contando-ciencia/ecologia-e-meio-ambiente/-/asset_publisher/EIjjNRSeHvoC/content/os-decompositores/1355746?inheritRedirect=false>. Acesso em: 13 dez. 2019.

FLORIEN. **Camelia sinensis**. Disponível em: <<http://florien.com.br/wp-content/uploads/2017/05/CAMELLIA-SINENSIS.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2019.

FREIRE, Joelma de Lira et al. Decomposição de serrapilheira em bosque de sabiá na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 39, n. 8, p.1659-1665, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982010000800006>.

FREITAS, Caio Evandro Santos de. **Efeito de Biofertilizante Inoculante de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma spp.* em Áreas de Cultivo Agrícola no Município de Novas Tebas – Paraná**. 2017. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2017.

GALLI, F. Microrganismos do Solo. In: SEÇÃO DE FITOPATOLOGIA E MICROBIOLOGIA. 21., 1964, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1964. p. 247-252.

GVAZOV, Konstantin S.. Dynamics of alpine plant litter decomposition in a changing climate. **Plant And Soil**, Netherlands, v. 337, n. 1-2, p.19-32, dez. 2010

HERNANI, Luis Carlos. **Microrganismos**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/sistema_plantio_direto/arvore/CONT00fwuzxobq02wyiv807fiqu9mw1rx0t.html>. Acesso em: 13 dez. 2019.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Rebio das Perobas recebe nova sinalização**. 2018. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/9636-rebio-das-perobas-recebe-nova-sinalizacao>>. Acesso em: 10 out. 2018.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Emissions Scenarios**. Nairobi: Intergovernmental Panel On Climate Change, 2000.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. **Microbial Biomass in Soil: Measurement and Turnover**. In: PAUL, E.A. & LADD, J.M. eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, v. 5, p. 415-471, 1981.

JÚNIOR, F. B. R. dos; MENDES, I. C. de. **Biomassa Microbiana do Solo**. 1. Ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 38p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 205).

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

KEUSKAMP, Joost A. et al. **Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems**. Methods In Ecology And Evolution, [s.l.], v. 4, n. 11, p.1070-1075, 19 ago. 2013.

LEPSCH, Igor Fernando. **Formação e Conservação dos Solos**. São Paulo: Oficina de Textos, 2002. 178 p.

LOBATTO, Breno. **Atividade Microbiana Indica a Saúde dos Solos**. 2015. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

MOREIRA, Wagner Henrique et al. Atributos Físicos de um Latossolo Vermelho Distroférico em Sistema de Integração Lavoura-Pecuária. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Minas Gerais, v. 36, n. -, p.389-400, 12 jan. 2012.

NOGUEIRA, Marco Antonio; CUNHA, Mariangela Hungria da. **Indicadores microbiológicos da qualidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Núcleo Estadual do Paraná, Londrina, v. 3, n. , p.539-544, maio 2013.

PARTON, W. et al. **Global-Scale Similarities in Nitrogen Release Patterns During Long-Term Decomposition**. Science, [s.l.], v. 315, n. 5810, p.361-364, 19 jan. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1134853>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. 2001. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100p.

SINGH, J. S.; RAGHUBANSH, A. S.; SINGH, R. S.; SRIVASTAVA, S. C. **Microbial biomass acts as a source of plant nutrientes in dry tropical forest and savana**. Nature, v. 338, n. 6215, p. 499-500, 1989.

SANTOS, Humberto Gonçalves dos; ZARONI, Maria José; CLEMENTE, Eliane de Paula. **Latossolos Vermelhos**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONT000fzyjaywi02wx5ok0q43a0r9rz3uhk.html>. Acesso em: 10 dez. 2019.

SOUZA, Djalma Martinhão Gomes de; LOBATO, Edson. **Latossolos**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_96_10112005101956.html>. Acesso em: 10 dez. 2019.

SOUZA, J. A.; DAVIDE, A. C. **Deposição de serrapilheira e nutrientes em uma mata não minerada e em plantações de bracatinga (*Mimosa scabrella*) e de eucalipto (*Eucalyptus saligna*) em áreas de mineração de bauxita**. Rev. Cerne, Lavras, v. 7, n. 1, p. 101-113. 2001.

STÖCKER, Cristiane Mariliz et al. Bioindicadores da qualidade do solo em sistemas agroflorestais. **Jornada da Pós-graduação e Pesquisa**, Bagé, v. 14, n. -, p.1-11, set. 2017.

TAUK, Sâmia Maria. **Biodegradação de Resíduos Orgânicos no Solo**. Revista Brasileira de Geociência, Rio Claro, v. 20, n. 4, p.299-301, dez. 1990.

TROFYMOW, J et al. **Rates of litter decomposition over 6 years in Canadian forests: influence of litter quality and climate**. Canadian Journal Of Forest Research, [s.l.], v. 32, n. 5, p.789-804, maio 2002. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/x01-117>.

WIDER, R. Kelman; LANG, Gerald E.. **A Critique of the Analytical Methods Used in Examining Decomposition Data Obtained From Litter Bags**. Ecology, [s.l.], v. 63, n. 6, p.1636-1642, dez. 1982. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/1940104>.

ZHANG, Deqiang et al. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. **Journal Of Plant Ecology**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.85-93, 13 mar. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jpe/rtn002>.