

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRA SANTOS

EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E ATRIBUTOS QUÍMICOS, FÍSICOS E
MICROBIOLÓGICOS DE COPRÓLITOS DA MINHOCA *Rhinodrilus alatus*

CURITIBA

2017

ALESSANDRA SANTOS

EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E ATRIBUTOS QUÍMICOS, FÍSICOS E
MICROBIOLÓGICOS DE COPRÓLITOS DA MINHOCA *Rhinodrilus alatus*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. George Gardner Brown
Coorientador: Dr. Luis Cunha
Coorientadora: Prof(a). Dr(a). Glaciela Kaschuk

CURITIBA

2017

SA237e Santos, Alessandra
Emissão de gases de efeito estufa e atributos químicos,
físicos e microbiológicos de coprólitos da minhoca *Rhinodrilus*
alatus / Alessandra Santos. - Curitiba, 2017.
44 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo.

Orientador: George Gardner Brown

Coorientador: Luis Cunha

Coorientador: Glaciela Kaschuk

1. Minhocas. 2. Minhocucu. 3. Biomassa microbiana. 4.
Gases - Efeito estufa. I. Brown, George Gardner. II. Cunha, Luis.
III. Kaschuk, Glaciela. IV. Título. V. Universidade Federal do
Paraná.

CDU 595.142



PARECER

A Banca Examinadora designada para avaliar a defesa da Dissertação de Mestrado de **Alessandra Santos**, intitulada: **"EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E ATRIBUTOS QUÍMICOS, FÍSICOS E MICROBIOLÓGICOS DE COPRÓLITOS DA MINHOCA RHINODRILUS ALATUS"**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após análise do texto e arguição do candidato, emitem parecer pela **"APROVAÇÃO"** da referida Dissertação. O candidato atende assim um dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Ciência do Solo - Área de Concentração Solo e Ambiente**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, em Curitiba, 20 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. George Gardner Brown, Presidente

Prof. Dr. Jefferson Dieckow, P. Examinador

Dr. Luis Cunha, IP. Examinador

Aos meus pais Carlos Alberto Santos e Tânia Regina Couto Santos,
minhas irmãs Arlene e Amanda Santos e amigos George, Herlon, Wilian, Guilherme,
Eduardo, Marie, Marcus e Anne Elise que me apoiaram durante todos os períodos bons e
ruins.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho, apoio e crença nas minhas escolhas;

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade para realizar o curso de mestrado;

Ao professor Dr. George Gardner Brown, pela orientação e confiança;

Aos professores Dra. Glaciela Kaschuk, Dra. Marie L. C. Bartz e Dr. Luis Cunha pelo auxílio teórico-científico;

Aos pesquisadores Peter Depkat-Jacob, Timo Frommann e Siu Mui Tsai, pela ajuda com o experimento e incentivo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária e CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;

Às instituições envolvidas: DFG, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ), CMBio (Flona de Paraopeba-MG), University of Bayreuth (Alemanha), pelo apoio e auxílio na realização das atividades do mestrado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de períodos de tempo pré-determinados para coleta de gases de efeito estufa e atributos químicos.....6
- Figura 2.** Metodologia de incubação das amostras e coleta de gases de efeito estufa.....9
- Figura 3.** Correlação dos dados químicos à esquerda e ACP dos dados químicos de coprólitos de *R. alatus* – R, e solo controle – C, com 5 amostras. Teste de permutação de Monte Carlo $p < 0.004$12
- Figura 4.** Variação de umidade (%) entre Coprólito e solo controle durante os 10 estágios de incubação do experimento. Letras diferentes no mesmo estágio apresentam diferenças significativas entre coprólitos e solo controle, com teste Tukey $p < 0,05$14
- Figura 5.** Relação entre Quociente Metabólico (qCO_2) e Biomassa Microbiana do Solo (BMS). Figura a: relação apresentada nos estágios de solo controle; b: relação apresentada nos estágios de coprólitos.....16
- Figura 6.** Concentração de $N-NO_3^-$ (a) e $N-NH_4^+$ (b) no solo controle e coprólitos durante o tempo de incubação.....17
- Figura 7.** ACP de dados químicos analisados por correlação. BMS: Biomassa Microbiana do Solo; qCO_2 : quociente metabólico. Fluxo de C- CO_2 , C- CH_4 e N- N_2O e umidade. Teste de permutação de Monte Carlo: $p < 0.001$19
- Figura 8.** Fluxo de GEE nos 10 estágios de incubação para solo controle e coprólitos. Gráfico a: refere-se a fluxo de C- CH_4 para solo controle e coprólitos; b: fluxo de C- CO_2 para solo controle e coprólitos e c: fluxo de N- N_2O para solo controle e coprólitos. Barras verticais correspondem ao erro padrão (*representa diferença significativa Tukey $p < 0.05$ entre controle e coprólitos; valores de regressão não significativos para todas as 3 variáveis).....20
- Figura 9.** Produção acumulada de CH_4 (gráfico a), CO_2 (gráfico b) e N_2O (gráfico c) durante os 10 estágios de incubação. (*representa diferença significativa Tukey $p < 0.05$ entre solo controle e coprólitos; n.s: não significativo).....22

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados das análises de rotina, C_{tot} , N_{tot} , H_{tot} , S_{tot} = C, N, H e S totais respectivamente, além de C-BMS (Carbono da Biomassa Microbiana), qCO_2 (Coeficiente metabólico), $N-NH_4^+$ - amônio, $N-NO_3^-$ - nitrato, micronutrientes e textura de coprólitos com 24 horas de idade da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG. SB - Soma de Bases, (t) - CTC efetiva, C_{org} - C orgânico.....13
- Tabela 2.** Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (C- BMS), Quociente metabólico (qCO_2) e Nitrogênio da BMS nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.....42
- Tabela 3.** Resultados de $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.....43
- Tabela 4.** Fluxos de C- CH_4 , C- CO_2 e N- N_2O nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.....44
- Tabela 5.** Produção acumulada de CH_4 , CO_2 e N_2O em $nmol\ g^{-1}$ de massa seca nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

N₂	Nitrogênio
N₂O	Óxido nitroso
N-N₂O	Nitrogênio na forma de óxido nitroso
O₂	Oxigênio
CO₂	Dióxido de carbono
C-CO₂	Carbono na forma de dióxido de carbono
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
N-NO₃⁻	Nitrogênio na forma de nitrato
NH₄⁺	Amônio
N-NH₄⁺	Nitrogênio na forma de amônio
GEE	Gases de efeito estufa
BMS	Biomassa microbiana do solo
qCO₂	Quociente metabólico
CNHS	Análise elementar de C, N, H e S

RESUMO

As minhocas possuem atividades que podem levar a importantes mudanças no solo, em atributos químicos, físicos e microbiológicos. Contudo, pouco se sabe sobre a influência que as minhocas de grande porte, os minhocuçus, exercem nos atributos do solo. Portanto os objetivos deste estudo foram avaliar os atributos químicos, físicos e microbiológicos de coprólitos de *Rhinodrilus alatus* Righi (1971) quando comparado ao solo controle. Incubaram-se cerca de 5 gramas de coprólitos e solo controle por períodos de 0 hora até 32 dias. Realizaram-se análises físico-químicas (pH, macro e micronutrientes, textura), análises de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, C-BMS e emissão de gases de efeito estufa (GEE) de coprólitos e de solo controle (onde os minhocuçus foram incubados). Os coprólitos de *Rhinodrilus alatus* apresentaram diferenças significativas em alguns nutrientes em comparação com o solo controle como: pH, H⁺Al, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, C-BMS, qCO₂, e micronutrientes. Fe apresentou umas das maiores diferenças significativas (37 %). A emissão de CH₄ pelo solo controle e pelos coprólitos é ínfima quando comparado a estudos sobre a emissão de CH₄ pelo intestino da minhoca. A emissão de CO₂ nos coprólitos e no solo controle reflete as variáveis a que os microrganismos são submetidos, como umidade e temperatura. A alta emissão de N₂O nos primeiros estágios de incubação do coprólito (0 a 24 horas) se dá principalmente, pelo fato de as bactérias presentes no intestino, sendo elas metanogênicas, fermentadoras e principalmente as redutoras de nitrato, serem estimuladas durante a passagem no intestino, ou seja, acredita-se que a principal via de transformação e emissão de N₂O seja através da desnitrificação. Portanto, os coprólitos de *R. alatus* apresentaram propensão a emitir os três GEE mencionados no estudo, esses resultados evidenciaram importantes efeitos das minhocas sobre atributos do solo, que devem ser estudados em maior detalhe, visando entender como essas mudanças acontecem e quais são os fatores responsáveis.

Palavras-chave: *Rhinodrilus alatus*; minhocuçus; macronutrientes; biomassa microbiana; gases de efeito estufa.

ABSTRACT

Earthworms, due their activities, can lead important changes in soil chemical, physical and microbiological attributes. However, not much is known about the impact of large earthworms (minhocuçu) on the soil attributes. Therefore, the aim of this study was to evaluate the greenhouse gases emissions, as well the chemical, physical and microbiological attributes of casts of *Rhinodrilus alatus*, Righi (1971), compared to control soil. Five grams of casts and control soil were incubated in periods from 0 hour to 32 days. The following analysis were carried out: physical and chemical analyses (pH, macro and micronutrients, texture), N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, C-BMS and greenhouse gases emissions of the casts and control soil. The incubated *Rhinodrilus alatus* casts had significant differences regarding some attributes compared to control soil, such as pH, H+Al, N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻, C-BMS, qCO₂ and micronutrients. However, Fe and organic carbon presented the most conspicuous differences: with 37% and 14% higher, respectively. The CH₄ emissions in control soil and casts are not significant when compared to studies of CH₄ emissions in intestine of earthworm. The CO₂ emission in the casts and in the control soil reproduces the variables to which the microorganisms are subjected, such as humidity and temperature. The high emissions in N₂O the first stages of the casts incubation (0 to 24 hours) were mainly due to the presence of gut bacteria (methanogenic, fermenting and nitrate reducers), which are stimulated during the transit of the soil in the intestine. And it seems that way of transformation and emission of N₂O happens through denitrification. Therefore, *R. alatus* casts were predisposed to emit the three GHGs mentioned in this study. These results evidenced important effects of earthworms on soil attributes, which should be studied with more detail, in order to understand how those changes happen and what are the factors responsible for that.

Keywords: *Rhinodrilus alatus*; minhocuçu; macronutrients; microbial biomass; greenhouse gases.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA	5
2.2. PREPARO DO SOLO.....	5
2.3. ESPÉCIE UTILIZADA	5
2.4. EXPERIMENTO PARA COLETA DE COPRÓLITOS DE R. ALATUS.....	6
2.5. ATRIBUTOS DE SOLO E EMISSÃO DE GASES	7
2.5.1. Biomassa Microbiana do solo	7
2.5.2. Caracterização química e física.....	8
2.5.3. Nitrogênio Inorgânico (N-NH ₄ ⁺ e N-NO ₃ ⁻).....	8
2.5.4. Análise CNHS	8
2.5.5. Temperatura do Solo e Ar	8
2.6. COLETA E ANÁLISES DE AMOSTRA DE AR	9
2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	10
3. RESULTADOS	11
3.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	11
3.2. CARACTERÍSTICAS DE QUOCIENTE METABÓLICO E BMS.....	14
3.3. TEOR DE NH₄⁺ E NO₃⁻	17
3.4. FLUXOS DE GEE.....	18
3.5. EMISSÃO ACUMULADA (PRODUÇÃO DE GEE)	21
4. DISCUSSÃO	23
4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	23
4.2. QUOCIENTE METABÓLICO, BMS E UMIDADE.....	25
4.3. TEORES DE NH₄⁺ E NO₃⁻	26
4.4. EMISSÃO E FLUXOS DE GEE.....	27
4.4.1. C-CH ₄ e emissão acumulada	27
4.4.2. C-CO ₂ e emissão acumulada	28
4.4.3. N-N ₂ O e emissão acumulada.....	28
5. CONCLUSÕES.....	30

6. LITERATURA CITADA.....	31
7. APÊNDICES	37

1. INTRODUÇÃO

A atmosfera da Terra é constituída principalmente por Nitrogênio (N_2), Oxigênio (O_2) e Argônio (Ar). Esses gases possuem interação limitada com o Sol e não interagem com a radiação infravermelha refletida pela Terra. Porém, existem alguns gases conhecidos como gases traços: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O), que absorvem e emitem radiação infravermelha. Esses gases são conhecidos como gases de efeito estufa (GEE), e possuem um papel importante na regulação da temperatura do planeta (Machado, 2005).

O solo possui um papel fundamental nas emissões e nos ciclos dos gases atmosféricos (Nyborg et al., 1995), sendo fonte e reserva de elementos do ciclo do C e N. O N_2O pode ser emitido para a atmosfera através de dois processos biológicos, a nitrificação e desnitrificação. A nitrificação ocorre em duas etapas: nitrificação em que NH_4^+ (amônio) é oxidado por bactérias do gênero *Nitrosococcus sp.*, *Nitrosospira sp.*, *Nitrosomonas sp.*, e transformado em nitrito (NO_2^-), e nitratação em que o nitrito é oxidado e transformado em nitrato (NO_3^-) por bactérias do gênero *Nitrococcus sp.*, *Nitrobacter sp.* (Moreira e Siqueira, 2006). A desnitrificação ocorre em ambientes anaeróbicos, nos quais bactérias facultativas oxidam o NO_3^- à N_2 . A emissão de óxido nitroso resulta de processos e interações entre a microbiota e os fatores físico-químicos do solo.

A formação de CH_4 no solo depende das condições de aeração, e ocorre de duas formas: oxidação e metanogênese. Esse segundo processo ocorre em condições anaeróbicas, sendo o metano o produto final da decomposição de materiais orgânicos, podendo tornar o solo fonte de CH_4 (Moreira e Siqueira, 2006). A emissão dos GEE está ligada diretamente à atividade microbiana do solo (Drake et al. 2006; Drake e Horn, 2007). Alguns autores consideram que a emissão de metano (CH_4) pelas minhocas é nula ou que a capacidade das bactérias metanogênicas no conteúdo intestinal e nos coprólitos das minhocas parecem ser insignificantes.

Diversos estudos relacionam as minhocas (um dos animais mais ativos do solo), com a produção de GEE, decorrentes da vasta população microbiana existente em seu trato intestinal. (Depkat-Jakob et al., 2012; Schulz et al., 2015). Esses organismos da fauna do solo são importantes, atuando ativamente para a bioturbação do solo, especialmente, as espécies de porte avantajado, vulgarmente chamadas de minhocuçus. Essas minhocas são espécies que

possuem mais de 30 cm de comprimento e cerca de 1 cm de diâmetro corporal (Brown e James, 2007). Por causa de seu tamanho e as atividades que desempenham, as minhocas são conhecidas como um dos agentes principais na estruturação do solo, sendo chamadas de “engenheiras do ecossistema”, juntamente com os cupins e as formigas (Lavelle et al., 1997).

Ao ingerir uma mistura de partículas orgânicas e minerais, e secretar abundante muco intestinal, as minhocas ativam a microbiota do solo no trato digestivo (Lavelle, 1997). Estudos recentes mostram que algumas espécies de minhocas européias que pertencem à família Lumbricidae, emitem N_2 e óxido nitroso (N_2O) e suas atividades podem influenciar a taxa de emissão dos gases nitrogenados nos solos que habitam. Outros estudos realizados aqui no Brasil comprovam que espécies como *Eudrilus eugeniae* e *Rhinodrilus alatus*, emitem CH_4 in vivo (Depkat-Jacob et al., 2012).

Após a passagem do solo pelo intestino da minhoca, esta defeca e o excremento é chamado de coprólito. Coprólitos são agregados biogênicos enriquecidos por compostos nitrogenados do metabolismo das minhocas, por meio da excreção de urina (Lee, 1985), também são largamente conhecidos por apresentar propriedades benéficas para o desenvolvimento das raízes (Nijhawan e Kanwar, 1952; De Vleeschauwer e Lal, 1981; Molungoy e Bedoret, 1989; Römcke et al., 2005), e atividade microbiana (Wüst et al., 2011), facilitando a mineralização de nutrientes e conseqüentemente a emissão de gases de efeito estufa (Lubbers et al., 2011, 2013; Majeed et al., 2013).

Vários estudos correlacionam a emissão de gases com as bactérias presentes no trato intestinal, por ser um ambiente anóxico (ausência de oxigênio na presença de nitrato), o trato intestinal da minhoca parece estimular a microbiota do solo capazes de sobreviver em anaerobiose, tanto pelo baixo potencial redox, como por riqueza de carbono orgânico e o pH do canal alimentar da minhoca ser próximo da neutralidade (Barois e Lavelle, 1986; Karsten e Drake, 1995; Horn et al., 2003; Wüst et al., 2009; Schmidt et al., 2011).

A taxa de emissão de gases depende da espécie, de seu tamanho e do tipo de substrato. As minhocas apresentam uma elevada propensão a emitir N_2O e N_2 , quase 60% das emissões de N_2O provenientes de certos solos podem ser derivados de minhocas, e estima-se que o montante anual de emissões de N_2O derivadas da atividade das minhocas seja cerca de 3×10^8 kg N_2O . Estas observações ilustram o impacto que a macrofauna do solo pode ter sobre os processos de ciclos do nitrogênio terrestre através da hospedagem transitória de procariontes ingeridos (Drake e Horn, 2007). Bhatnagar (1975), estimou que 40% do total de diazotróficos aeróbios e 13% do total de bactérias fixadoras de nitrogênio ocorrem na zona de 2mm de solo

ao redor das galerias feitas pelas minhocas, na França. Já Edwards e Bohlen (1996) comentam que a atividade de nitrogenase de bactérias diazotróficas de vida livre pode ser até 10 vezes maior em coprólitos do que em solo não ingerido.

Sabe-se atualmente que espécies de minhocas da família *Lumbricidae* e também em especial as espécies *Glossoscolex paulistus* (minhocuçu encontrado na região de São Paulo) e *Amyntas gracilis* (amplamente distribuída) também emitiram GEE (principalmente N_2O do conteúdo intestinal) (Depkat-Jacob et al., 2013).

Procurando elucidar a dinâmica entre a emissão de gases e refletindo sobre as categorias ecológicas Majeed et al. (2013), desenvolveram um estudo que traz a comparação entre o impacto de diferentes estratégias de alimentação (categorias ecológicas) das minhocas tropicais sobre a emissão de N_2O através de coprólitos e a caracterização de comunidades microbianas associadas com as dinâmicas de emissão. Foram utilizadas várias espécies de minhocas de acordo com sua categoria ecológica, onde como resultado as taxas de emissão de N_2O pelos coprólitos de espécies epigéicas alimentadas com borra de café (*Dichogaster annae* e *Eienia andrei*) foi cerca de 400 vezes mais do que as espécies de minhocas endogéicas alimentadas com solo da própria floresta tropical onde encontradas.

Esses valores podem ser explicados por influência de parâmetros como C e N, umidade e pH dos coprólitos de ambas as categorias ecológicas (Drake et al., 2006; Ciarlo et al., 2007). Por exemplo, C e NO_3^- são ricos em um solo com alto nível de umidade e um pH acima de 5 irá influenciar positivamente a atividade das enzimas de desnitrificação, em consequência os processos microbianos como desnitrificação seriam muito maiores em coprólitos de minhocas epigéicas do que de endogéicas, porque se alimentaram de substrato que continha um alto teor de C e N em contraste com as demais (Wüst et al., 2009; Ganeshamurthy et al., 1998).

A liberação de espécies de N de fácil assimilação e mineralização no solo já foram observadas em estudos anteriores (Drake e Horn, 2007). Majeed et al. (2013) encontrou maiores teores de NH_4^+ e menores teores de NO_3^- em coprólitos de espécies de minhocas epigéicas do que endogéicas, sendo a proporção de 19 e 0,7 respectivamente. Confirmando resultados que já haviam sido encontrados em coprólitos de minhocas de clima temperado. No entanto, sabe-se que excreções nitrogenadas, particularmente NH_4^+ por diferentes órgãos da minhoca também são fontes importantes de altos teores de N mineral tanto no intestino como nos coprólitos (Barois e Lavelle, 1986).

Contudo, a redução significativa do teor de NO_3^- nos coprólitos em comparação com o substrato, pode ser explicado pelas forças redutivas as quais o substrato é submetido quando passa a pelo interior da minhoca. Dependendo da qualidade do substrato utilizado para a alimentação das minhocas, a físico-química e os processos potencialmente ligados à microbiota do intestino e ao fluxo de N_2O pode ser diferente nos coprólitos (Drake e Horn, 2007).

A desnitrificação microbiana e a troca gasosa coprólito-atmosfera é um dos processos mais importantes a serem estudados em solos tropicais. Apesar de uma abundante literatura sobre as propriedades de coprólitos, em relação a atributos físicos, químicos e biológicos (Lee, 1985; Edwards e Bohlen, 1995; Brown et al., 2000), essa área ainda possui certa carência em estudos que correlacionam os GEE com a atividade microbiana em coprólitos.

Neste estudo, a espécie utilizada pertence à família Rhinodrilidae, e é endêmica ao Estado de Minas Gerais. A biologia da espécie é razoavelmente bem conhecida, tendo sido objeto de estudo de vários anos por Drumond et al. (2012), como parte do Projeto Minhocuçu. Esse minhocuçu possui em média 60cm de comprimento, podendo alcançar mais de um metro. Ela é considerada uma espécie endogeica, vive no solo, se alimenta de matéria orgânica e suas fezes formam coprólitos minerais (Brown e James, 2007). *Rhinodrilus alatus* é um minhocuçu capaz de mudar as características físicas e químicas do solo por meio de seus coprólitos, que disponibilizam argila, possuem pH maior que o do solo e alteram significativamente a concentração de alguns elementos, ao diminuir, por exemplo, a quantidade de Al e aumentar H+Al, Mg, K, Mn e Fe (Cardoso, 2015). Sabe-se que a *R. alatus* emite GEE tanto in vivo, quanto de seu conteúdo intestinal. Dessa forma, os coprólitos de *R. alatus* contribuem para a ciclagem de nutrientes, como outras espécies de minhocas, além de construir galerias que podem contribuir para a drenagem dos solos, processos importantes para a provisão de serviços ecossistêmicos (Depkat-Jacob et al., 2012, 2013).

Portanto este trabalho teve como objetivo principal avaliar a emissão de gases de efeito estufa e atributos físicos, químicos e microbiológicos em coprólitos de *Rhinodrilus alatus* e solo controle durante tempos de envelhecimento predeterminados (0, 4, 8, 12, 24, 48, 96 horas e 8, 16 e 32 dias). Tendo como objetivos específicos: a) avaliar as emissões de gases de efeito estufa e biomassa microbiana nos coprólitos e solo controle nos estágios de envelhecimento; b) analisar atributos químicos do coprólito como N-NH_4^+ e N-NO_3^- , química rotineira e micronutrientes tendo como comparação os atributos do solo controle. Com isso as hipóteses são: a) os estágios de envelhecimento dos coprólitos influenciam a atividade das

bactérias, com uma diminuição da atividade de bactérias emissoras de GEE com o decorrer do tempo; b) os coprólitos de *R.alatus* melhoram os atributos químicos do solo comparado ao solo controle.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA

O solo utilizado no experimento foi coletado no município de Paraopeba-MG dentro da Floresta Nacional de Paraopeba (Apêndice 1) (S19° 15' 17.2'' W44° 24' 04.9''), situada a 725 metros acima do nível do mar. O clima da região é denominado como tropical úmido Aw (Köppen), com verão chuvoso e estação seca entre abril e setembro, coincidindo com o inverno e a época de quiescência das minhocas da espécie utilizada no trabalho. Segundo Drumond et al. (2013) a área recebe cerca de 1500 mm ano⁻¹ de chuva, concentrados no período chuvoso. O solo utilizado é classificado como Latossolo Amarelo segundo Neri (2007). Coletaram-se 120 kg de solo (0 – 10 cm) (Apêndice 2), em área de Cerrado Natural sensu stricto em agosto de 2016. A área apresentava revolvimento para a captura de minhocas e muitos coprólitos visíveis na superfície.

2.2. PREPARO DO SOLO

O solo coletado foi peneirado em malha de 2mm, homogeneizado e armazenado em laboratório a temperatura de 22±1 °C. Não houve secagem do solo para preservar a microbiota e matéria orgânica. A capacidade de campo de cada solo foi medida, seguindo metodologia de Anderson e Ingram (1993).

2.3. ESPÉCIE UTILIZADA

A espécie *Rhinodrilus alatus* Righi 1971 (Apêndice 3) foi comprada no município de Paraopeba–MG (19° 21' 03.6''S e 44° 21' 05.4''W) de coletores da região. Duas dúzias foram adquiridas (R\$ 70,00 a dúzia). A espécie descrita por Righi (1971) possui indivíduos que medem entre 56,5 a 62,5 cm, porém Drumond et al. (2013) encontram um indivíduo desta espécie medindo 130,0 cm de comprimento. Para a ambientação dos animais, foi usado solo da Floresta Nacional de Paraopeba, seu habitat natural.

2.4. EXPERIMENTO PARA COLETA DE COPRÓLITOS DE *R. ALATUS*

O experimento seguiu em delineamento fatorial, com o substrato (coprólito de minhoca e solo controle) e o tempo (10 tempos de incubação) como fatores experimentais com 5 repetições por combinação cada tratamento, sendo realizado segundo a metodologia de Lavelle (1975) com modificações descritas no decorrer do item 2. Os experimentos foram realizados no escuro, em ambiente climatizado em incubadora (Incubadora *Full Gauge Imperial III*), a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cinco espécimes foram individualizados em potes de dimensões 24 x 17 x 10 cm de largura, comprimento e altura, respectivamente. Devido ao grande tamanho desta espécie (peso médio de 60g) foram usado 500 g de solo para a incubação, corrigido para 70 % da capacidade de campo, e as minhocas permaneceram incubadas por 32 dias com troca de solo a cada 48 horas. Foi realizado um tratamento controle (solo sem minhoca) com 5 repetições, com a mesma característica de solo, umidade e duração da incubação especificada anteriormente (Apêndice 4). Para a realização das análises químicas, físicas e de emissão dos três principais gases de efeito estufa (CO_2 , N_2O , CH_4), os coprólitos foram coletados em 10 períodos de tempos predeterminados sendo estes: 0, 4, 8, 12, 24, 48, 96 horas e 8, 16 e 32 dias após o acondicionamento, conforme Figura 1.



Figura 1. Esquema de períodos de tempo pré-determinados para coleta de gases de efeito estufa e atributos químicos.

2.5. ATRIBUTOS DE SOLO E EMISSÃO DE GASES

2.5.1. Biomassa Microbiana do solo

A biomassa microbiana do solo (BMS) é definida como parte da matéria orgânica constituída pelos organismos vivos com volume inferior a $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, sendo expressa em micrograma (μg) de carbono por grama de solo seco. Para a realização desta análise foi utilizado o método de fumigação-incubação (Jenkinson et al, 1976), que consiste na remoção dos resíduos grosseiros visíveis, com tamisação em malha de 5 mm. Para essa análise utilizou-se 20 gramas de coprólito e solo controle, em todos os 10 estágios de avaliação.

O C extraído do solo é calculado pela fórmula:

$$C (mg . kg^{-1}) = (Vb - Va) . N . 0,003 . 50 . (8 . Ps)^{-1} . 10^6 \quad (1)$$

Sendo:

C: carbono extraído do solo; Vb (ml): volume do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); Va (ml): volume gasto na titulação da amostra; N: normalidade exata do $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe} (\text{SO}_4)_2 . 6\text{H}_2\text{O}$; Ps (g): massa de solo seco.

O cálculo da BMS é dado pela fórmula:

$$BMS (mg . kg^{-1}) = FC . kc^{-1} \quad (2)$$

Sendo:

BMS: biomassa de carbono microbiano do solo em mg de C kg^{-1} de solo; FC: fluxo obtido da diferença entre a quantidade de C (MG kg^{-1}) recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada; kc: fator de correção.

O fator de correção (kc) em situações que exijam maior exatidão deverá ser calculado para cada tipo de solo. Como para os solos do Brasil o fator ainda não foi determinado, pode-se utilizar o valor 0,33, a fim de expressar a fração do C da BMS recuperada após o processo de fumigação-extração (De-Polli e Guerra, 1997).

Para o cálculo de N-BMS (Nitrogênio da Biomassa Microbiana do Solo) foi utilizada a razão C:N para biomassa microbiana encontrada em Moreira e Siqueira, 2006. Esses autores relatam que a biomassa microbiana possui razão C:N entre 4 e 6. Neste caso foi considerado para o cálculo estimado razão C:N de biomassa microbiana igual a 6.

2.5.2. Caracterização química e física

As análises químicas de rotina e de micronutrientes foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Marques e Motta (2004). As análises de granulometria do solo e coprólitos foram realizadas usando o método da pipeta segundo Embrapa (1997). Para essas análises utilizou-se um *pool* de coprólitos frescos de até 24 horas de idade. Foram analisadas 5 repetições, uma para cada espécime utilizado. O mesmo foi feito com o solo controle (5 repetições). Para as análises de rotina, de micronutrientes e para a textura as amostras foram secas ao ar e peneiradas novamente em malha de 2 mm para homogeneização.

2.5.3. Nitrogênio Inorgânico (N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻)

Parte da amostra coletada para determinar umidade foi separada para a determinação da concentração de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, em todos os 10 estágios de avaliação.

Dez gramas de solo úmido foram pesados e extraídos com KCl 2M. A determinação de N-NH₄⁺ foi realizada por espectrofotometria de absorção ultravioleta com leitura em comprimento de onda com 640 nm, após o preparo das amostras com adição de fenol, nitroprussiato de sódio e uma solução oxidante (citrato de sódio e hipoclorito de sódio) com base na reação de Berthelot (Mulvaney, 1996).

Para a determinação do N-NO₃⁻ também foi utilizado o espectrofotômetro de absorção ultravioleta com amostras preparadas previamente com solução de H₂SO₄ 10% pelo método Griess-Ilosvay, com zinco como agente redutor e lidas em comprimento de onda de 210 nm (Heinzmann et al., 1984).

2.5.4. Análise CNHS

Para as análises de CNHS, as amostras foram moídas manualmente e passadas em malha de 212 µm até que todos os grãos de areia passassem pela malha, encapsulados em folha de estanho, as amostras foram analisadas por condutividade térmica, em analisador elementar CNHS (Vario EL III) em todos os 10 estágios de avaliação.

2.5.5. Temperatura do Solo e Ar

A temperatura do solo foi medida a cada avaliação de emissão de gases de efeito estufa empregando termômetros digitais no solo da incubação e no controle, no mesmo

instante da coleta de gás. A temperatura do ar foi mantida constante em $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e aferida com auxílio de termômetro de mercúrio.

2.6. COLETA E ANÁLISES DE AMOSTRA DE AR

As avaliações da emissão de CO_2 , N_2O e CH_4 tiveram início em 01/09/2016 e se estenderam por um período de 3 meses. As mesmas foram realizadas em intervalos predeterminados em horas nos primeiros 4 dias e posteriormente em intervalos de 8, 16 e 32 dias (Figura 1). Amostras de ar foram coletadas por método modificado de Kusel e Drake (1995) que consiste na incubação de aproximadamente 5 gramas de coprólito ou solo em frascos de vidro de 38 ml hermeticamente vedados.

Após a vedação injetava-se 20 mL de ar atmosférico para que a pressão do vidro se mantivesse em torno de 500 mbar, para facilitar a retirada das amostras de gás em quatro (CH_4 e N_2O) ou seis tempos (CO_2) para cada estágio sendo: 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Cada tempo relaciona-se a um frasco diferente, caracterizando amostras acumuladas. Antes de ser retirado o gás do frasco para análise, media-se a pressão do ar no frasco.

Para a coleta de gás foram utilizadas seringas plásticas de 20 mL, acopladas com agulhas de 0,55 x 20 mm. Os conteúdos das seringas (20 mL) foram transferidos para frascos de vidro (Exetainer, Labco) e armazenados até análise cromatográfica (Figura 2).

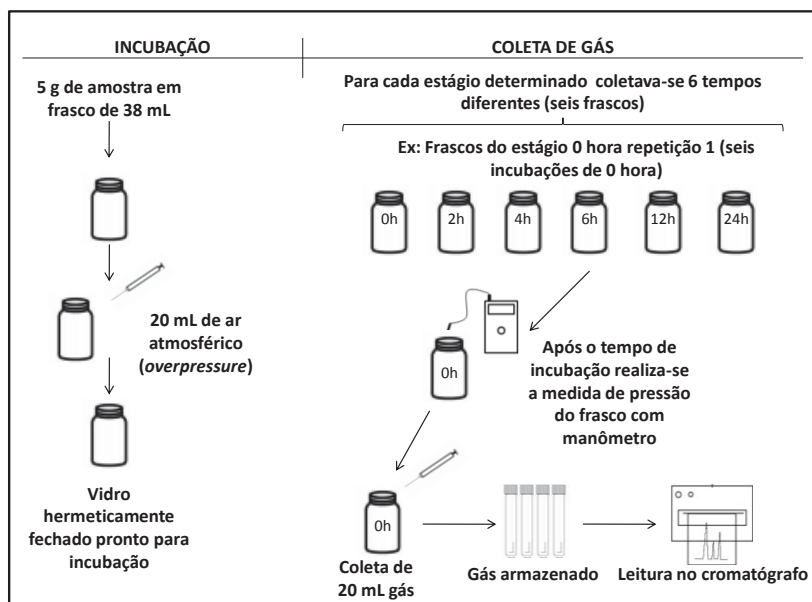


Figura 2. Metodologia de incubação das amostras e coleta de gases de efeito estufa.

A concentração dos três gases foi determinada via cromatografia gasosa pelo equipamento GC - Trace 1310, pertencente a EMBRAPA-Florestas, Colombo-PR. O cromatógrafo é equipado com detector de ionização de chama (FID), para avaliação de CH₄, e detector de captura de elétrons (ECD) para avaliação de N₂O. Os volumes dos gases foram calculados a partir dos dados das suas concentrações e dos volumes dos frascos de incubação.

Com as informações do volume, temperatura e pressão dos frascos (medida em cada seção de coleta com manômetro digital RMD-P-DIF *Rücken*), pressão atmosférica (considerando 1017 mbar ou 1 atm) e a constante universal dos gases ideais, calcularam-se o número de nanomols (nmol) e, posteriormente, a quantidade (massa) do gás contido no frasco (Equação 3).

$$n_g = C_g \cdot V_g \frac{(p_{amb} + p_{tubo})}{p_{amb}} \quad (3)$$

Sendo:

A quantidade total de um determinado gás (n_g) dentro do recipiente é calculada a partir da concentração deste gás na fase gasosa (C_g), o volume da fase gasosa (V_g), a pressão ambiental (P_{amb}) e a pressão no interior do recipiente (P_{tubo}) (Equação 4).

$$C_g = \frac{y \cdot p_{amb}}{(R \cdot T_{amb})} \quad (4)$$

Sendo:

A concentração de um determinado gás na fase gasosa (C_g) calculada a partir da razão deste gás para os restantes gases presentes (y), a pressão ambiente (P_{amb}), a temperatura ambiente (T_{amb}) e a constante dos gases ideais (R) de acordo com a lei dos gases ideais.

2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de gases foram avaliados e aqueles considerados como *outliers* foram excluídos com (valores $\pm 3x$ desvio padrão), sendo principalmente aqueles com teores menores que os atmosféricos, cerca de: CO₂ – 600ppm/ N₂O – 330 ppm, aproximadamente no tempo de 0 hora).

Para comparar as características físico-químicas dos coprólitos e solos controle, foram calculadas as médias para todos os atributos físicos e químicos, e se realizaram

comparações entre o solo controle e os coprólitos usando ANOVA e teste Tukey ($p < 0.05$) com o programa Statistica v.7.0 (StatSoft, 2006).

Os dados foram testados para a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors, e para os dados não normais foram feitas transformações dos dados (raiz quadrada ou log de $(x+1)$). Para os dados que continuaram não apresentando normalidade, sendo dados de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , foram realizadas análises não paramétricas. Também foram realizadas Análises de Componentes Principais (ACPs) e teste de permutação (Simulação de Montecarlo, $p < 0.001$) usando os atributos físico-químicos dos coprólitos e solo controle, para explorar a relação entre os diferentes fatores (variáveis resposta e explicativa) avaliados com o programa estatístico R.

Os resultados de produção de gás e emissão acumulada foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Análises de regressão e correlação também foram realizadas, para entender como determinadas variáveis influenciam outras, verificando seu comportamento. Foram utilizados os programas Sisvar e Statistica v 7.0 e o editor gráfico Sigma Plot 12.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA

Os coprólitos de *Rhinodrillus alatus* apresentaram diferenças significativas (Tukey $p < 0.05$) em alguns elementos em comparação com o solo controle (Tabela 1). Houve aumento no pH SMP em 1,7% (3,95 no solo controle para 4,02 no coprólito) porém o pH CaCl_2 apresentou decréscimo de 2,8% (5,19 no controle para 5,04 no coprólito). H^+ aumentou 11% (9,28 no controle para 10,50 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ no coprólito). O Na apresentou diferença de 10% (0,0027 para 0,003 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, controle e coprólito respectivamente).

Os valores de C orgânico (C_{org}) variaram entre 17,42 a 20,42 g dm^{-3} no controle e coprólitos, respectivamente. Essa diferença representa um aumento de 14%. Os demais elementos analisados como Al, K, Ca e Mg não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0.05$). Dentre os micronutrientes, o Mn aumentou 43 % (de 2,94 para 5,20 mg kg^{-1} , C e R, respectivamente), Cu teve um aumento de 15 % (1,36 a 1,60 mg kg), e o Fe apresentou aumento de 37 % (93,9 para 149,6 mg kg). Nos coprólitos não foram observadas diferenças significativas para Zn. A análise de textura não demonstrou alterações em nenhuma fração.

A ACP explicou 72,37 % da variabilidade dos dados nos dois primeiros eixos, sendo 47,28 e 25,09 % para o componente principal 1 (CP1) e componente principal 2 (CP2), respectivamente. O CP1 separou as amostras em controle (C) e coprólitos (R) devido principalmente ao pH, micronutrientes e matéria orgânica. Os coprólitos estão relacionados positivamente com macro e micronutrientes, em correlação negativa está apenas saturação por alumínio (*m%*) e pH SMP (Figura 3). O CP2 foi principalmente relacionado com os valores das bases do solo.

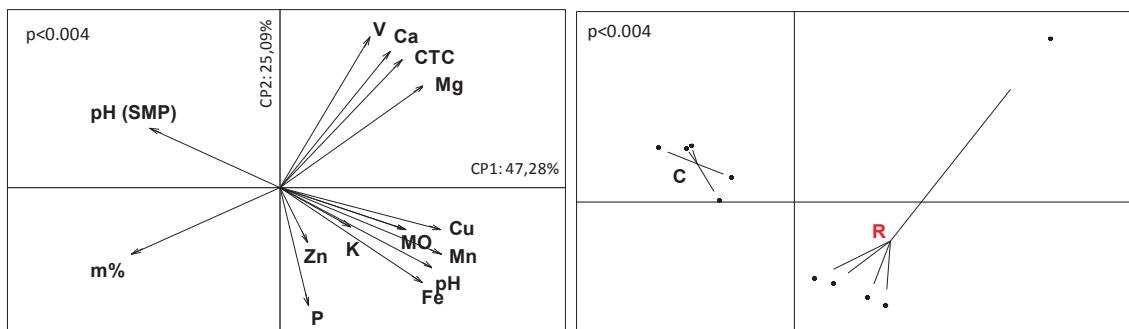


Figura 3. Correlação dos dados químicos à esquerda e ACP dos dados químicos de coprólitos de *R. alatus* – R, e solo controle – C, com 5 amostras. Teste de permutação de Monte Carlo $p < 0.004$.

Tabela 1. Resultados das análises de rotina, C_{tot} , N_{tot} , H_{tot} , S_{tot} = C, N, H e S totais respectivamente, além de C-BMS (Carbono da Biomassa Microbiana), qCO_2 (Coeficiente metabólico), $N-NH_4^+$ - amônio, $N-NO_3^-$ - nitrato, micronutrientes e textura de coprólitos com 24 horas de idade da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG. SB - Soma de Bases, (t) - CTC efetiva, C_{org} - C orgânico.

cmol _c dm ⁻³											%				g dm ⁻³			
Al	H + Al	Na	K	Ca	Mg	P	SB	(t)	C:N	C_{org}	C_{tot}	N_{tot}	H_{tot}	S_{tot}				
Controle	1,92a	9,28b	0,0027b	0,069a	0,76a	0,40a	2,66a	1,23a	3,15a	11,91a	17,42b	21,2a	1,78a	9,3a	0,02b			
Coprólito	2,05a	10,50a	0,0030a	0,073a	0,82a	0,52a	2,86a	1,41a	3,46a	11,74a	20,42a	22,0a	1,88a	9,3a	0,21a			
	pH		mg dm ⁻³	mg C kg ⁻¹	mg C-CO ₂ g ⁻¹ CBMS.h ⁻¹	qCO ₂	Cu	Mn	Fe	Zn	Argila	Areia Grossa	Areia Fina	Silte				
	CaCl ₂	SMP	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	C-BMS													
Controle	5,19a	3,95b	19,3b	1,6a	586,32a	16,2b	1,36b	2,94b	93,96b	0,78a	509,60a	18,40a	16,31a	455,69a				
Coprólito	5,04b	4,02a	176,1a	0,7b	330,66b	27,3a	1,60a	5,20a	149,60a	0,86a	514,40a	17,60a	16,17a	451,83a				

*Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas entre solo controle e coprólito, com teste Tukey p<0,05.

Para os coprólitos de *R. alatus* a maior umidade (51%) foi observada há 0 horas, a menor umidade foi encontrada há 32 dias 26% (Figura 4). A umidade nos diferentes estágios de incubação oscilou no controle entre 27% há 8 dias e 17% há 32 dias.

A umidade do solo foi maior nos coprólitos em todos os estágios exceto aos 4 e 8 dias. O estágio de 0 h apresentou a maior diferença entre solo controle e coprólito, sendo 63% maior no coprólito, mas essa diferença diminuiu com o tempo.

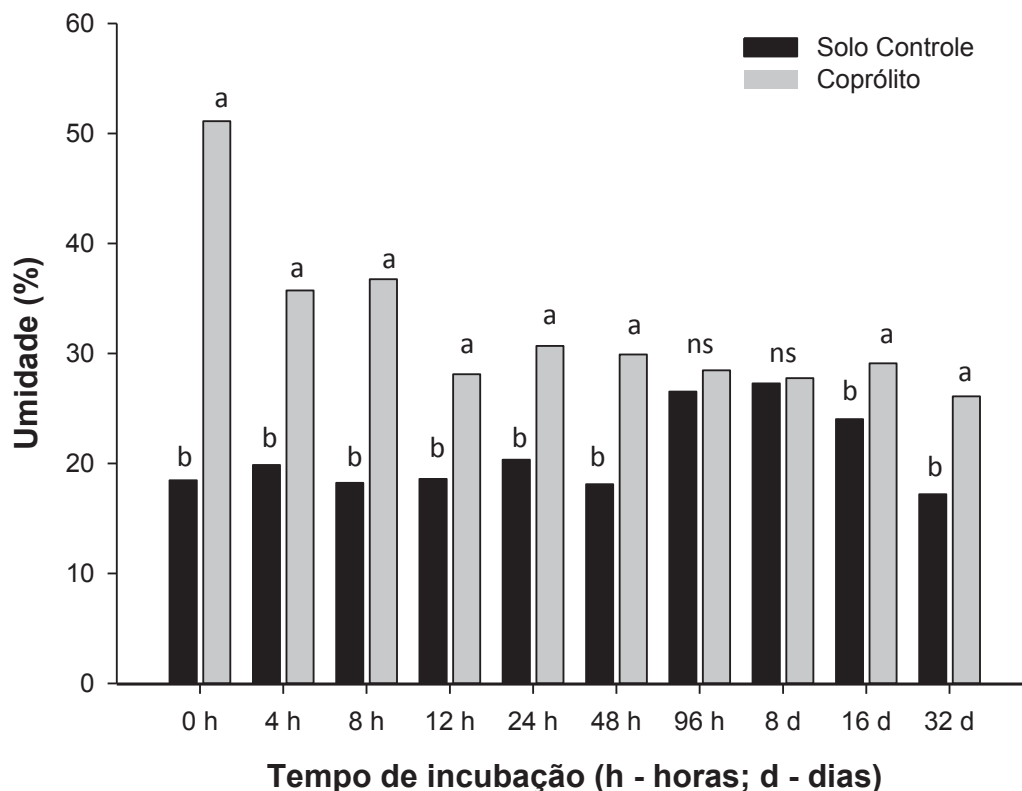


Figura 4. Variação de umidade (%) entre Coprólito e solo controle durante os 10 estágios de incubação do experimento. Letras diferentes no mesmo estágio apresentam diferenças significativas entre coprólito e solo controle, com teste Tukey $p < 0,05$.

3.2. CARACTERÍSTICAS DE QUOCIENTE METABÓLICO E BMS

A BMS variou entre 494 e 595 mg C kg⁻¹ no solo controle, e entre 247 e 387 mg C kg⁻¹ no coprólito (Figura 5). O estágio de 48 horas obteve menor valor para ambos os tratamentos. Todos os estágios do experimento de envelhecimento apresentaram diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$), sendo maiores no controle que no coprólito.

Os valores de quociente metabólico variaram de 4,6 a 18 mg C-CO₂ g⁻¹ BMS-C h⁻¹ para solo controle, e entre 11,4 e 37 mg C-CO₂ g⁻¹ BMS-C h⁻¹ para R (Figura 5). Foram observadas diferenças significativas no quociente metabólico onde os coprólitos apresentam o maior número nos estágios de 0 horas, 12 horas, 48 horas, 96 horas, 8 dias, 16 dias e 32 dias.

Houve decréscimo significativo no quociente metabólico do solo controle com o tempo ($r^2= 0.85$), apresentando menor taxa no estágio de 32 dias (Figura 5. a). Já o quociente metabólico dos coprólitos teve comportamento diferente, com oscilação entre as idades apresentando dois picos de maior atividade, às 12 horas e outro entre 48 e 96 horas (Figura 5. b).

Houve diferenças significativas no N estimado através da BMS entre os tratamentos em todos os estágios, sendo maior no solo controle que nos coprólitos, porém dentro do mesmo tratamento houve diferença estatística apenas no coprólito nos tempos de 8 e 24 horas com 48 horas em comparação com os demais estágios (Figura 5).

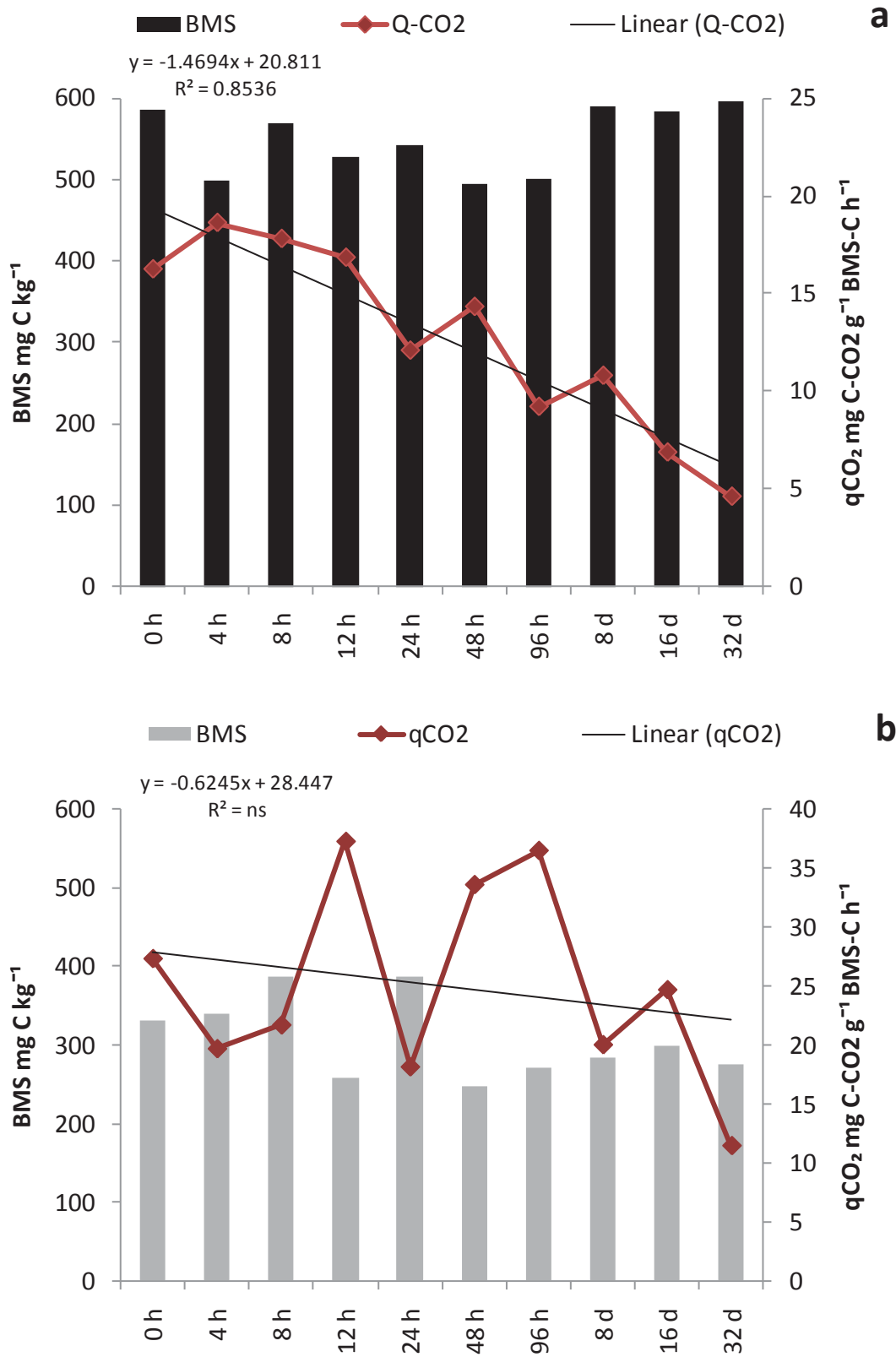


Figura 5. Relação entre Quociente Metabólico (qCO_2) e Biomassa Microbiana do Solo (BMS). Figura a: relação apresentada nos estágios de solo controle; b: relação apresentada nos estágios de coprólito.

3.3. TEOR DE NH_4^+ E NO_3^-

A concentração de NH_4^+ foi maior nos coprólitos em todos os estágios analisados (Figura 6).

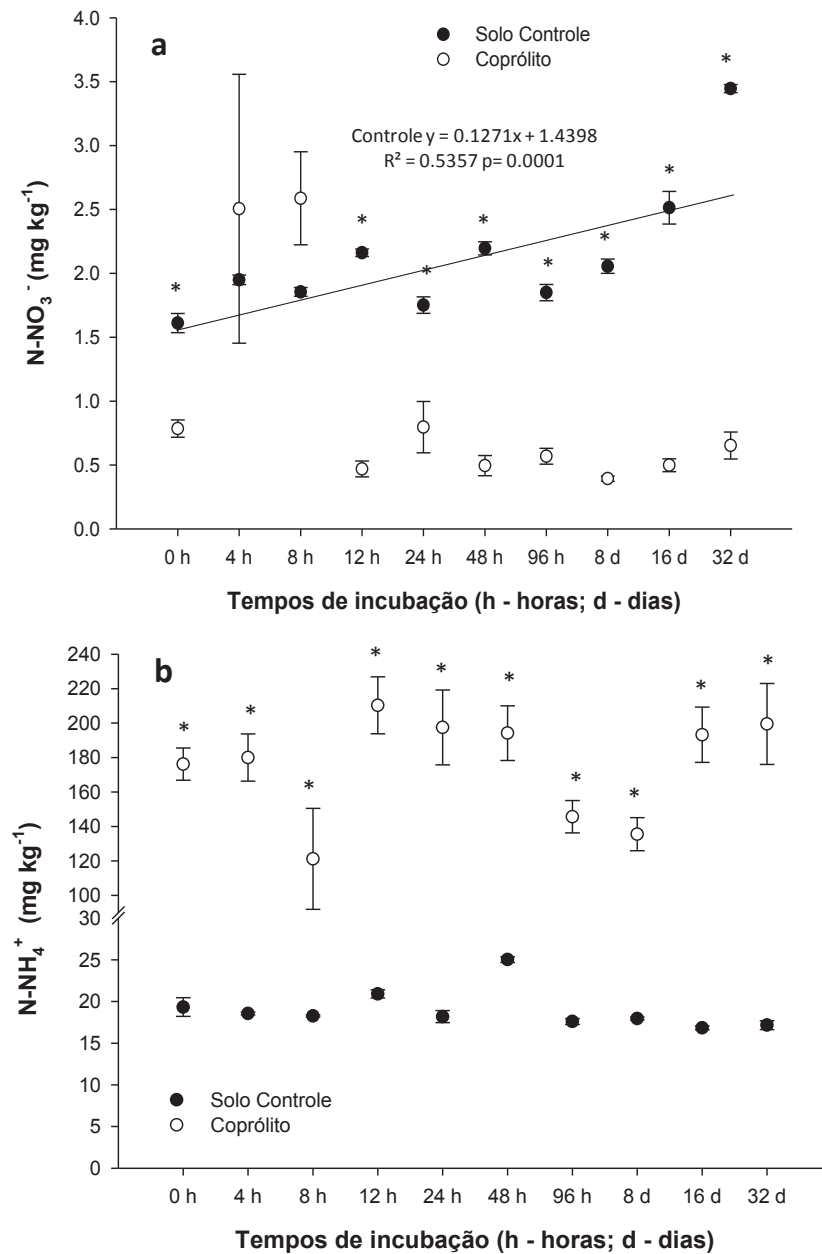


Figura 6. Concentração de N- NO_3^- (a) e N- NH_4^+ (b) no solo controle e coprólito nos 10 estágios (* representa diferença significativa Tukey $p < 0.05$).

Os coprólitos de *R. alatus* apresentam teores médios que variam de 121,2 a 210 mg kg⁻¹ de N-NH₄⁺, enquanto no controle variaram entre 16 e 25 mg kg⁻¹ de N-NH₄⁺ (Figura 6). Os coprólitos de *R. alatus* apresentaram uma oscilação grande ao longo do tempo.

Ao contrário, NO₃⁻ foi maior no solo controle em quase todos os estágios (Figura 6). O teor médio mínimo encontrado no solo controle foi no estágio de 0 h (1,6 mg kg⁻¹ de N-NO₃⁻) e o teor máximo encontrado no solo controle foi no estágio de 32 dias (3,4 mg kg⁻¹ de N-NO₃⁻) havendo uma tendência significativa de aumento ao longo do tempo ($r^2=0,53$ $p=0,0001$). Nos coprólitos, o menor teor médio foi observado no estágio de 8 dias (0,39 mg kg⁻¹ N-NO₃⁻) e o maior no de 4 e 8 horas (2,5 mg kg⁻¹ N-NO₃⁻) (Figura 6).

3.4. FLUXOS DE GEE

Os fluxos de GEE estiveram relacionados com as variáveis avaliadas nos coprólitos ou solo controle. A ACP com os atributos químicos como N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, umidade (%) e a BMS e qCO_2 , mostrou claramente a relação positiva entre os fluxos de gás com coprólitos e teor de N-NO₃⁻ e BMS com o controle. A componente principal 1 explicou 42,7% da variabilidade dos dados e opondo BMS e N-NO₃⁻ com N-NH₄⁺ e qCO_2 . A componente principal 2 explicou 21,4% da variação dos dados sendo C-CO₂ e C-CH₄ relacionados positivamente, valor de $p<0.001$ (Figura 7).

Encontrou-se baixa emissão de CH₄ tanto no coprólito quanto no solo controle. Não houve diferença no fluxo de C-CH₄ entre solo controle e o coprólito (Figura 8). Nos coprólitos os fluxos de C-CH₄ tiveram maior variação entre os estágios, apresentando menor valor há 16 dias com 0,58 nmol g⁻¹ coprólito h⁻¹ e pico de fluxo no estágio de 24 h com 0,83 nmol g⁻¹ coprólito h⁻¹ (Figura 8).

O fluxo de C-CO₂ foi inferior no solo controle comparado ao coprólito (Figura 8), em diversos momentos ao longo dos 32 dias de incubação. Porém a 8 e 32 dias apresentaram maior fluxo de C-CO₂. No coprólito o fluxo de C-CO₂ variou significativamente ao longo do tempo, sendo maior no coprólito fresco até 8 horas e também às 96 horas. Nos outros estágios a emissão foi menor que 70 nmol g⁻¹ coprólito h⁻¹.

O fluxo de N-N₂O foi maior nos coprólitos que no solo controle. O solo controle apresenta baixa variação nos períodos avaliados, com o fluxo mínimo ocorrido no estágio de 4 h (34,1 nmol N-N₂O g⁻¹ solo h⁻¹) e a maior emissão nos 16 dias (49 nmol N-N₂O g⁻¹ solo h⁻¹).

Já nos coprólitos houve um pico a 0 horas (107 nmol N-N₂O g⁻¹ coprolito h⁻¹) e o menor fluxo foi registrado a 12 horas (25 nmol g⁻¹ h⁻¹) (Figura 8).

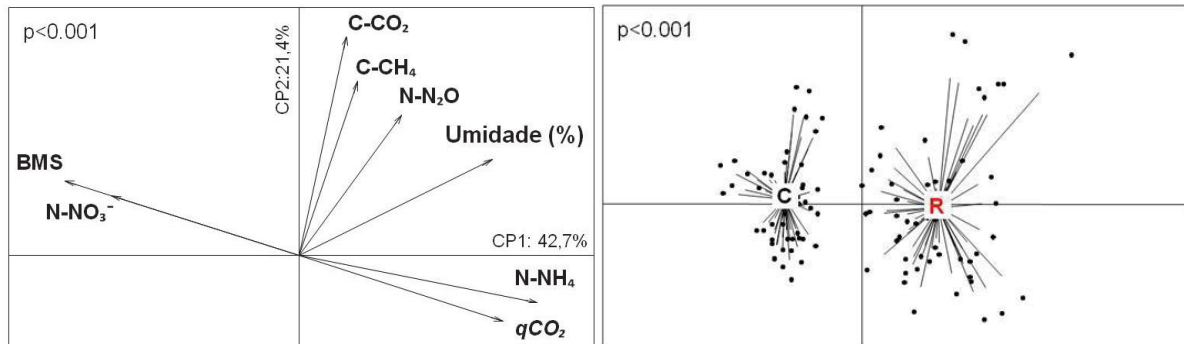


Figura 7. ACP de dados químicos analisados por correlação (usando todos os dados dos coprólitos – estágios de incubação). BMS: Biomassa Microbiana do Solo; qCO₂: quociente metabólico. Fluxo de C-CO₂, C-CH₄ e N-N₂O e umidade. Teste de permutação de Monte Carlo: $p < 0.001$.

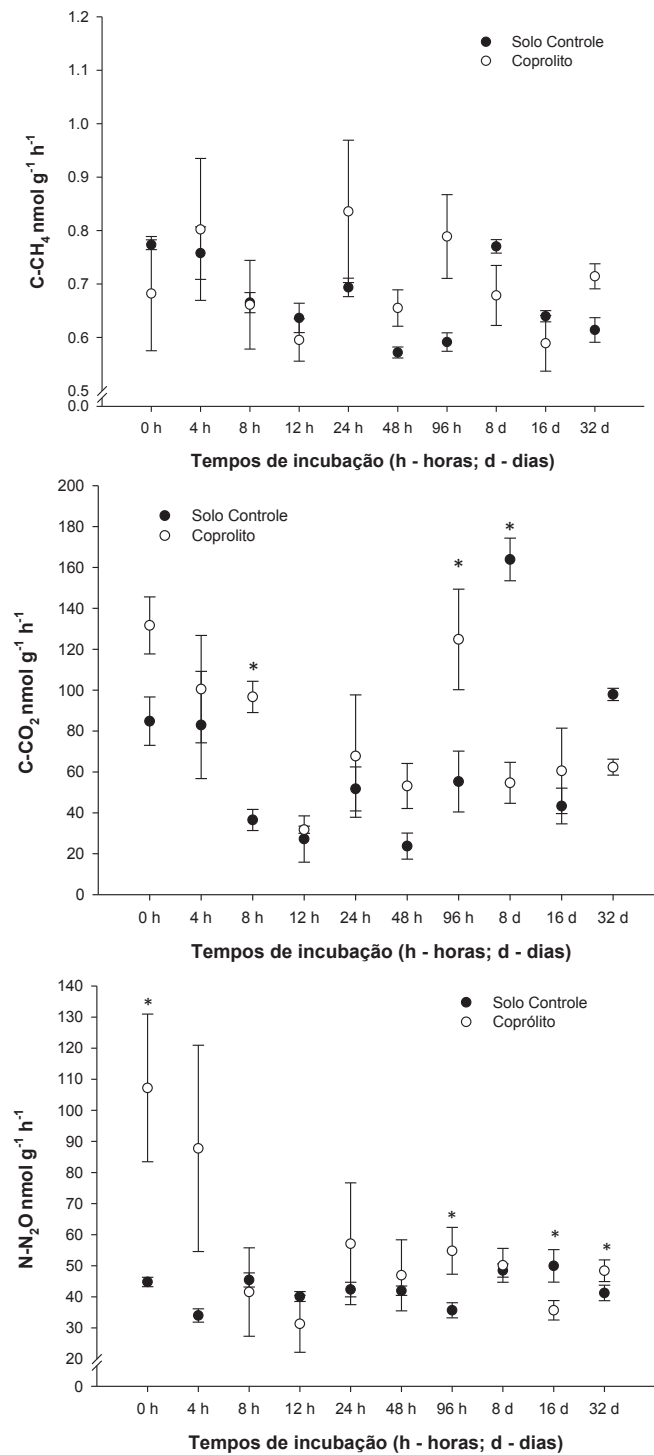


Figura 8. Fluxo de GEE nos 10 estágios de incubação para solo controle e coprólito. Gráfico a: refere-se a fluxo de C-CH₄ para solo controle e coprólito; b: fluxo de C-CO₂ para solo controle e coprólito e c: fluxo de N-N₂O para solo controle e coprólito. Barras verticais correspondem ao erro padrão (*representa diferença significativa Tukey p<0.05 entre controle e coprólito; valores de regressão não significativos para todas as 3 variáveis).

3.5. EMISSÃO ACUMULADA (PRODUÇÃO DE GEE)

A emissão acumulada durante 24 horas variou entre os 10 estágios de incubação. Entretanto, para cada GEE os tratamentos controle e coprólito, se comportaram de maneiras diferentes.

A emissão de CH₄ diminuiu drasticamente ao longo da incubação no controle ($y = -0,0007x + 0,7785$ $r^2 = 0,7816$ $p = 0,0007$), mas apenas levemente nos coprólitos (valor $p = n.s.$). Após 8 dias a produção de CH₄ nos coprólitos continuou alta e muito maior que no solo controle (Apêndice 8).

A emissão acumulada de CO₂ foi semelhante para os dois tratamentos. Para ambos a produção de CO₂ nos estágios iniciais (0 h) foi elevada. Aos 32 dias a emissão foi baixa e em ambas houve diminuição significativa ao longo do tempo (Controle $y = -1,7174x + 1695,4$ $r^2 = 0,7878$ $p = 0,0006$; Coprólito $y = -1,6085x + 1864,6$ $r^2 = 0,678$ $p = 0,034$).

Para N₂O, os dois tratamentos apresentaram comportamentos e magnitudes diferentes ($p = n.s.$ para ambos) (Figura 9). Para os coprólitos a produção média inicial foi de 489,9 nmol N₂O g⁻¹ de massa seca, aumentando até chegar a 1882 nmol N₂O g⁻¹ de massa seca às 4 horas. A partir desse estágio, ocorreu uma diminuição acentuada da produção de N₂O, mantendo-se estável em níveis médios entre 524 e 187 nmol N₂O g⁻¹ de massa seca. No controle a emissão de N₂O foi baixa e houve apenas pequenas variações na emissão ao longo dos 32 dias.

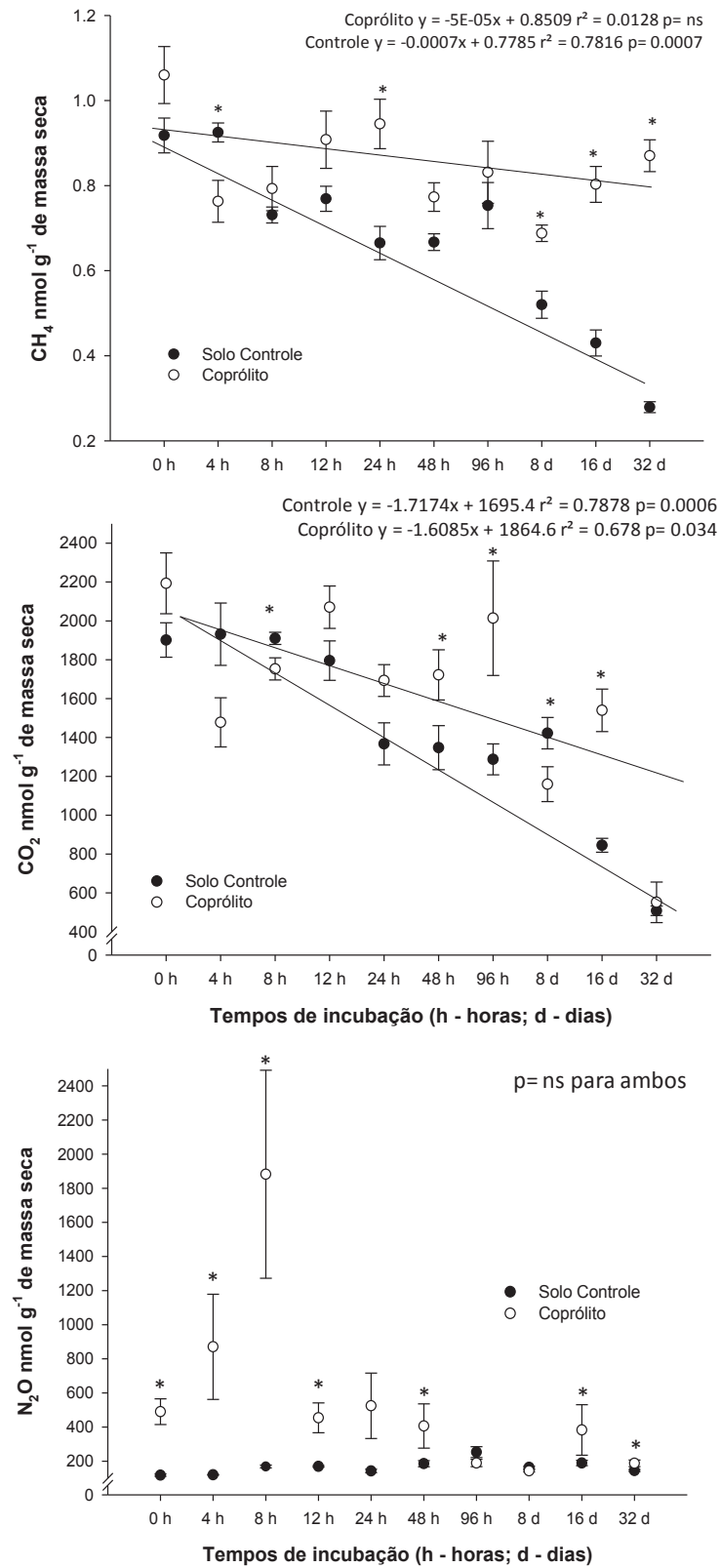


Figura 9. Produção acumulada de CH₄ (gráfico a), CO₂ (gráfico b) e N₂O (gráfico c) durante os 10 estágios de incubação. (*representa diferença significativa Tukey $p < 0.05$ entre solo controle e coprólito; n.s.: não significativo).

4. DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O solo do presente estudo apresentou características químicas semelhantes às encontradas por Neri (2007) na mesma região em Paraopeba-MG. O pH baixo está associado a baixos teores de P e soma de bases, típicos de Latossolos amarelos da região.

Os resultados deste estudo demonstraram que *R. alatus* alterou o pH do solo após a passagem pelo trato intestinal. Muitos autores também observaram aumentos no pH de coprólitos quando comparados ao solo de origem (Clause et al., 2014; Hmar e Ramaneijam, 2014; Fiuza et al., 2011; Hulugalle e Ezumah, 1991; Dadalto e Costa, 1990). Essas mudanças de pH podem ser explicadas pela fisiologia de cada espécie estudada, diretamente relacionada a ocorrência de glândulas calcíferas (*R. alatus* possui três pares de glândulas calcíferas (Righi, 1971)). Essas estruturas são responsáveis pela retirada do excesso de CO₂ do sangue com a ajuda de Ca, formando o carbonato de cálcio (CaCO₃) que é posteriormente excretado no intestino, modificando o pH dos coprólitos. Esse aumento temporário do pH pode ter efeitos significativos nos processos do solo, que são sensíveis a mudanças de pH (Lavelle et al., 1997).

A presença de glândulas calcíferas, além de influenciar no pH, também pode aumentar os teores Ca disponível nos coprólitos (Edwards e Bohlen, 1996). Isso tem sido observado por vários autores (Fiuza et al., 2011; Quadros et al., 2002; Materechera et al., 1998; Hulugalle e Ezumah, 1991) que encontraram incrementos nos valores de Ca e Mg nos coprólitos. No presente estudo, a ausência de diferenças para estes teores pode ser efeito do menor número de glândulas comparadas às outras espécies trabalhadas. Dadalto e Costa (1990) também não encontraram diferenças significativas para Ca em coprólitos de minhocuçus do gênero *Glossoscolex*, com apenas 1 par de glândulas calcíferas.

Outros elementos que geralmente possuem diferenças estatísticas entre o solo e os coprólitos são K e Na (Hmar e Ramanujam, 2014; Quadros et al., 2002; Materechera et al., 1998; Basker et al., 1993), no presente estudo houve apenas um aumento significativo nos teores de Na no coprólito.

Apesar de alguns trabalhos mostrarem que as minhocas são responsáveis por aumentar os valores de P nos coprólitos (Hmar e Ramanujam, 2014; Bayon e Binet, 2006; Kuczak et al., 2006; Quadros et al., 2002), não se observaram aumentos nos teores de P para a *R. alatus*.

Aparentemente os valores de P são muito variáveis de acordo com a idade dos coprólitos, assim como sua forma (Hernandez et al., 1993; Bayon e Binet, 2006).

O conteúdo de P orgânico decresce nos coprólitos enquanto o P inorgânico aumenta, mas o conteúdo de P total continua o mesmo na maioria dos casos (Bayon e Binet, 2006). Portanto, é possível que nos coprólitos da espécie estudada no presente experimento, seja necessário realizar um estudo mais aprofundado das formas de P, visando determinar se existem diferenças nos coprólitos em relação ao controle.

Existem poucos dados na literatura referentes a micronutrientes em coprólitos (Bartz, 2010). Para o presente estudo houve diferenças significativas, onde o coprólito de *R. alatus* teve aumento para Cu, Mn e Fe. De modo geral, o aumento no pH indisponibiliza Mn através de reações de oxiredução no intestino anóxico (Nascimento et al., 2005), porém nesse caso o pequeno aumento no pH não foi suficiente para isso. O aumento significativo de Mn confirma tendências encontradas na literatura para outras espécies de minhocas (Bartz et al., 2010; Ganeshamurthy et al., 1998). Camargo et al. (1982) mostram que de maneira geral, os teores de Cu, Mn, Fe e Zn diminuem conforme aumento o pH. Portanto, o efeito positivo das minhocas sobre a concentração desses micronutrientes no solo ocorre apesar de um aumento no pH dos coprólitos, indicando importantes processos no intestino e/ou de comportamento alimentar das minhocas sobre a disponibilidade desses nutrientes.

Aumentos significativos de Fe nos coprólitos de minhocas também foram apresentados por Bityutskii et al. (2012). Este último encontrou incrementos de até cinco vezes comparado ao solo controle. No presente estudo o Fe aumentou cerca de 40%. No presente estudo os coprólitos utilizados nas análises químicas foram de 24 horas, o que pode ter influenciado nos resultados encontrados. A ligação de Fe com a matéria orgânica é muito importante, uma vez que possibilita sua movimentação através do solo, inclusive em direção à raiz, e evita sua precipitação no pH em que normalmente aconteceria (Camargo 2006). Entretanto, existem poucas evidências de que a complexação de Fe pela matéria orgânica do solo seja difundida (Goodman 1985). A interação do Fe com minerais de argila se dá ocupando lugares de troca ou, como no caso da caulinita, se adsorvendo na superfície do tetraedro de sílica (Camargo 2006).

Materechera et al. (1998) sugerem que a passagem do solo no intestino das minhocas desempenha um importante papel nas mudanças físico-químicas, as quais variam de acordo com a espécie e tipo de solo (Clause et al., 2014). Microrganismos do solo, invertebrados e raízes possuem estratégias adaptativas complementares que influenciam três dos processos

mais importantes no solo, a decomposição e dinâmica da MOS, a formação e manutenção da estrutura e o fornecimento de água e nutrientes para as plantas (Lavelle, 1997).

As concentrações de certos nutrientes nos coprólitos das minhocas mostram claramente a importância desses animais na ciclagem de nutrientes no solo (Materechera et al., 1998). Razão pela qual muitas vezes as raízes de plantas se concentram em coprólitos (Tomati, 1988), os quais possuem ainda maior importância em zonas mais profundas no solo, onde existem maiores limitações químicas para o crescimento radicular (Mouat e Keogh, 1987).

4.2. QUOCIENTE METABÓLICO, BMS E UMIDADE

A BMS, com sua atividade avaliada pela evolução de CO_2 in situ ou em laboratório, tem sido utilizada como indicativo da condição ambiental (De-Polli & Guerra, 1997). Os métodos de avaliação da biomassa microbiana do solo são bastante variados, mas, de forma geral, permite avaliar do *pool* de carbono e, também, de outros nutrientes contidos nos microrganismos (Anderson e Domsch, 1993). A razão entre o CO_2 evoluído e o *pool* de carbono da biomassa microbiana fornece o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), que indica o estado metabólico dos microrganismos e pode ser utilizado como indicador de estresse/perturbação ou estabilidade do ecossistema. Assim é possível perceber que a biomassa microbiana responde de maneira diferenciada tanto a manejos adotados, como de situações químicas e físicas diferentes, como é o caso dos coprólitos (DePolli e Guerra, 1997; Moreira e Siqueira, 2006).

Os menores valores de biomassa microbiana no coprólito que no solo controle no presente estudo indicam que a minhoca ao se alimentar de materiais ricos em matéria orgânica, ingerem também materiais como polímeros orgânicos (ou seus derivados), derivados de plantas, protozoários, fungos e bactérias (Brown e Doube, 2004; Edwards e Bohlen, 1996). Os protozoários ingeridos são necessários para a maturação de certas espécies de minhocas, já as hifas fúngicas têm grande redução de comprimento durante a passagem pelo intestino, enquanto que esporos fúngicos podem percorrer todo o processo digestivo intactos (Brown e Doube, 2004; Schönholzer et al., 2002; Wolter e Scheu, 1999). A digestão de grandes bactérias também pode ocorrer durante a passagem pelo intestino. Assim há evidências de que os microrganismos de altos volumes celulares são preferencialmente perturbados durante a passagem pelo intestino e moela das minhocas (Drake e Horn, 2007).

A biomassa microbiana digerida resulta em diferentes formas de carbono orgânico que podem ser utilizadas pela minhoca. Drake e Horn (2007) trazem como exemplo os ácidos graxos de cadeia longa, provavelmente derivados dos lipídios membranosos das bactérias digeridas, que podem ser assimilados nos tecidos das minhocas. Esses fatores resultam em capacidades distintas de assimilar carbono e energia dos materiais ingeridos, com eficiências de assimilação variando entre 1% e 60% (Edwards e Bohlen, 1996). Por isso o intestino da minhoca é conhecido como um sistema mutualístico, onde as exoenzimas produzidas pelos microrganismos ingeridos aumentam a degradação de materiais orgânicos, que são absorvidos durante a passagem pelo intestino (Brown e Doube, 2004; Barois e Lavelle, 1989).

Os microrganismos ingeridos pelas minhocas encontram-se inicialmente num local anóxico, úmido e rico em matéria orgânica solúvel em água, que é derivada do muco intestinal e até mesmo da biomassa ingerida. Portanto, as condições internas são ideais para o metabolismo anaeróbico de microrganismos. Após a passagem pelo intestino e a formação dos coprólitos, este já recebe à medida que a umidade decai, fluxos de O_2 entrando no sistema, diminuindo a diversidade desses microrganismos (Drake e Horn, 2007).

Porém apesar da diminuição de BMS significativa entre solo controle e coprólito em todos os estágios de incubação, o quociente metabólico (qCO_2) é maior e possui diferença na maioria dos estágios. Segundo Anderson e Domsch (1993), valores mais elevados de qCO_2 normalmente são associados com ecossistemas jovens, submetidos a alguma condição de estresse, enquanto menores valores são associados a ecossistemas maduros e estáveis. Isso se deve ao fato de que apesar do intestino da minhoca diminuir quase pela metade a BMS, o restante dos microrganismos restantes são extremamente ativos. Segundo Drake et al. (2006) e Karsten et al. (1995) existem microrganismos, principalmente fermentativos, que estão em estado mais ativo no coprólito que no solo, portanto exoenzimas de fermentadores podem aumentar a digestão da matéria orgânica aumentando a atividade, pois podem utilizar o nitrato e o nitrito presente no coprólito como aceitador terminal de elétrons, quando o O_2 se torna limitado, produzindo N_2O e N_2 como produtos gasosos da respiração anaeróbia.

4.3. TEORES DE NH_4^+ E NO_3^-

Como já relatado anteriormente a concentração de NH_4^+ é superior nos coprólitos em comparação com o solo controle. Estudos anteriores já evidenciaram que coprólitos de

minhocas possuem elevadas quantidades de NH_4^+ , NO_3^- se comparados ao solo adjacente (Lunt e Jacobson, 1944; Parle, 1963). Essa quantidade elevada de amônio é derivada de um excremento que se compara a urina. Segundo Lavelle e Martin (1992), uma porção significativa do C assimilado pelas minhocas é secretado no muco intestinal e cutâneo, com maiores razões C:N do que as do solo ingerido, como resultado parte do nitrogênio assimilado pode ser em excesso e têm de ser excretado na forma de NH_4^+ no intestino, podendo assim ser incorporado nos coprólitos.

Já para o NO_3^- no presente estudo não houve diferenças significativas para os coprólitos. Este resultado é pouco comum entre os estudos já realizados com este íon. Lavelle et al. (1992) relatam um aumento simultâneo de NO_3^- e redução de NH_4^+ à medida que os coprólitos envelhecem, resultado observado com apenas um dia de envelhecimento. Resultados similares foram observados no presente estudo, porém esse aumento é perceptível até 8 horas nos demais estágios os valores de NO_3^- são baixos. Para Lavelle e Martin (1992), a ausência de NO_3^- é possivelmente efeito da incorporação desta forma de nitrogênio na BMS, devido a ausência de plantas para absorvê-lo. De fato às 8 e 24 horas houve aumento de Nitrogênio estimado na biomassa microbiana, mas apenas significativo entre 24 e 48 horas. Em todos os estágios após 48 horas o Nitrogênio da biomassa foi baixo e estável.

4.4. EMISSÃO E FLUXOS DE GEE

4.4.1. C- CH_4 e emissão acumulada

A emissão de CH_4 pelo solo controle e pelos coprólitos é ínfima quando comparado a estudos sobre a emissão de CH_4 pelo intestino da minhoca. Depkat-Jakob et al. (2012) encontraram que a espécie com a maior produção de metano foi *Eisenia eugeniae* emitindo até $41 \text{ nmol CH}_4 \text{ g}^{-1}$ em 5 horas de incubação. Já a espécie *R. alatus* não apresentou emissão elevada tendo valores próximos à $5 \text{ nmol CH}_4 \text{ g}^{-1}$ e, em seu substrato os valores não passam de $1 \text{ nmol CH}_4 \text{ g}^{-1}$. Nos coprólitos de *R. alatus* a emissão não superou $0,9 \text{ nmol CH}_4 \text{ g}^{-1}$.

O comportamento de emissão de CH_4 pode ser explicado pela decomposição da matéria orgânica em condições de ausência de oxigênio. Nestas condições outras moléculas são utilizadas como aceptadores de elétrons, por exemplo, o NO_3^- (redução de nitrato), SO_4^{2-} (redução de sulfato) ou CO_2 (formação de metano). A formação de metano não ocorre em

ambientes onde oxigênio, nitrato ou sulfato encontram-se prontamente disponíveis, e são os primeiros utilizados para esse fim (Depkat-Jakob et al., 2012).

Contudo a emissão acumulada maior aos 8 dias no coprólito que no solo controle, evidencia maior potencial de metanogênese nos coprólitos envelhecidos que no solo não ingerido.

4.4.2. C-CO₂ e emissão acumulada

A emissão de CO₂ nos coprólitos e no solo controle reflete as variáveis as quais os microrganismos são submetidos, como umidade e temperatura. Quando há um aumento de umidade (Figura 3) o mesmo aumento é perceptível no fluxo de C-CO₂. Os primeiros estágios de incubação dos coprólitos possuem uma umidade maior do que nos demais estágios, pelo fato do coprólito ainda estar relativamente fresco com alta massa de água. Os microrganismos respondem à maior umidade, aumentando a respiração e mineralização do C e do N na MOS.

Os valores para a emissão de CO₂ e o fluxo de C-CO₂ foram próximos entre solo controle e coprólito, mesmo havendo redução de BMS no coprólito. Isso pode ser devido a alta competitividade de bactérias nos coprólitos das minhocas, tendo que competir por recursos. Odum (1985) descreve que o aumento na respiração da comunidade microbiana pode ser o primeiro sinal de estresse, uma vez que a reparação por danos causados por distúrbios do solo (no caso o trato intestinal da minhoca) requer desvios de energia do crescimento e reprodução para a manutenção celular. Portanto, durante um estresse na BMS, haverá direcionamento de energia para a manutenção celular, em detrimento do crescimento, de forma que uma proporção de carbono da biomassa será perdida como CO₂. Além do efeito de cisalhamento dos volumes celulares ingeridos pelas minhocas, principalmente durante a passagem pela moela e intestino (Drake e Horn, 2007).

4.4.3. N-N₂O e emissão acumulada

A alta emissão de N₂O nos primeiros estágios de incubação do coprólito (0 a 24 h) se dá principalmente, pelo fato de as bactérias ingeridas, sendo elas metanogênicas, fermentadoras e redutoras de nitrato, serem estimuladas durante a passagem no intestino (Drake e Horn, 2007). O número de microrganismos capazes de anaerobiose no coprólito pode ser de até três vezes maiores do que o solo não ingerido.

A desnitrificação é a principal fonte de N_2O emitida pelas minhocas. A maioria dos desnitrificadores possui a capacidade de produzir e consumir N_2O . A liberação líquida de N_2O durante a desnitrificação é regulada por vários fatores como: umidade, temperatura, pH e também as concentrações de íons de nitrogênio, todos encontrados em altas concentrações nos coprólitos (Horn et al., 2003). A produção de N_2O pelas bactérias dissimiladoras de nitrato é favorecida em sistemas que contém altos níveis de carbono orgânico, porém alguns nitrificadores são capazes de usar nitrato ou nitrito como receptores de elétrons, podendo produzir N_2O ou N_2 sob condições de oxigênio limitado (Fischer et al., 1997).

A alta emissão de N_2O com subsequente decréscimo a partir de 24 h nos coprólitos e a emissão de N_2O encontrada no solo controle pode ser resultado do melhor desenvolvimento das bactérias desnitrificantes em pH 6 a 8. O pH do intestino da *R. alatus* está em cerca de 6 (Depkat-Jacob et al., 2013), quando o coprólito é recém fabricado, as bactérias desnitrificantes do intestino estão mais ativas, mas com o passar do tempo e mudanças de fluxos de O_2 e umidade, o pH torna-se mais ácido, a desnitrificação se torna lenta a pH menor que 5, e geralmente ausente em pH muito ácido, e o consumo de O_2 aumenta a necessidade do uso de NO_3^- como aceptor de elétrons para o crescimento microbiano (Moreira e Siqueira, 2006).

A alta emissão de N_2O também pode estar associada com os baixos valores de NO_3^- e também com a alta taxa de NH_4^+ nos coprólitos. Segundo Smith (1983) e Tiedje (1988), o N_2O é produzido como um produto da redução dissimilatória do nitrato em nitrito e/ou em amônio, provavelmente pela ação não específica da nitrato-redutase com nitrito. No estudo realizado por Drake e Horn (2007) constatou-se que as bactérias dissimiladoras de nitrato são abundantes no intestino da minhoca, onde 15 dos 25 tipos taxonômicos de bactérias distintos e isolados são dissimiladores de nitrato e apenas 5 são desnitrificantes. Porém as taxas de produção de N_2O dos redutores de nitrato são 30 vezes menores à dos desnitrificantes, indicando que ainda assim a desnitrificação é o principal formador de N_2O na minhoca.

A partir de uma meta-análise feita por Lubbers et al. (2013) sugeriu-se que as minhocas aumentam as emissões líquidas de GEE, nesse estudo a meta-análise sugere que as emissões de N_2O aumentam 42% e de CO_2 aumentam 33%. Porém não é possível corroborar essas informações com os dados do presente estudo.

5. CONCLUSÕES

Os coprólitos de *R. alatus* emitem os três GEE mencionados nesse estudo, porém a emissão de N_2O em sua maior parte, deriva da produção de bactérias desnitrificantes, e altos valores de NH_4^+ influenciam na taxa de emissão de N_2O .

A baixa emissão de CH_4 pelos coprólitos e solo controle indica baixo potencial metanogênico desse solo, e a produção acumulada desse gás só difere nos últimos estágios de avaliação, onde é afetada pela umidade dos coprólitos.

Os valores encontrados de BMS e qCO_2 indicam que as minhocas estão digerindo biomassa microbiana no intestino e que os coprólitos representam zonas de alta atividade e estresse microbiano, já que a emissão de CO_2 manteve-se constante.

Portanto o coprólito de *R. alatus* é um nicho anóxico que possui processos bioquímicos complexos, onde altos teores de amônio influenciam tanto na redução, emissão de gases e transformação de N, modificando a biomassa microbiana, reduzindo-a em quantidade porém aumentando a atividade de bactérias no solo. Além disso, o passar do solo pelo trato intestinal afeta a concentração de certos atributos, devido a processos ainda pouco conhecidos para *R. alatus*, mas entre esses estão aumento de pH, S e micronutrientes.

6. LITERATURA CITADA

ANDERSON J.M.; INGRAM J.S.I. **Tropical Soil Biology and Fertility**: A handbook of methods. 2nd ed. England: Wallingford CAB International; 1993.

ANDERSON J.P.E.; DOMSCH K.H. The metabolic quotient of CO₂ (q CO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial of forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

BAROIS I.; LAVELLE P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (glossoscolecidae, oligochaeta). **Soil Biology and Biochemistry**, 18(5), 539–541, 1986. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(86\)90012-X](http://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90012-X)

BARTZ M.L.C.; COSTA A.C.S.; SOUZA I.G.; BROWN G.G. Micronutrientes e óxidos de ferro em coprólitos de minhocas produzidos em um Latossolo Vermelho distroférrico (Oxisol) sob diferentes sistemas de manejo. **Acta Zoológica Mexicana**, 2:281-294, 2010.

BASKER A.; MACGREGOR A.N.; KIRKMAN J.H. Exchangeable potassium and other cations in non-ingested soil and casts of two species of pasture earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, 25: 1673-1677, 1993.

BAYON R.C.; BINET F. Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in inorganic substrates. **Soil Biology and Biochemistry**, 38:235-246, 2006.

BITYUTSKII N.P.; K Aidun P.I.; YAKKONEM K.L. The earthworm (*Aporrectodea caliginosa*) primes the release of mobile and available micronutrients in soil. **Pedobiologia**, 55: 93–99, 2012.

BROWN G.G.; DOUBE B.M. **Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants**. In *Earthworm Ecology*, ed. CA Edwards, pp. 213–39. Boca Raton, FL: CRC Press. 2nd ed. 2004.

BHATNAGAR T. **Lombriciens et humification**: Un aspect nouveaux de l'incorporation microbienne A'azote indirite par les vers de terre. In: Kilbertus G; Reisinger O; Mourey A; Fonseca J.A.C. de. (Ed.) *Biodegradation et humification*. Serreguemines: Pierron,169182. 1975.

BROWN G.G.; BAROIS I.; LAVELLE P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. **European Journal of Soil Biology**. Paris, 36:177-198, 2000.

BROWN G.G.; JAMES S.W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: Brown GG, Fragozo C, (Eds). **Minhocas na América Latina**: Biodiversidade e Ecologia, p. 297-381, 2007.

CAMARGO A.O.; VALADARES J.M.A.S.; DECHEN A.R. Efeitos do pH e da incubação na extração do manganês, zinco, cobre e ferro do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 6:83-8, 1982.

CAMARGO, A.O. Reações e interações de micronutrientes no solo. **Infobibos**, Artigo em Hipertexto, 2006. Disponível em:

<http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Micronutrientes/Index.htm>. Acesso em: 20 de setembro de 2017.

CARDOSO, G.B.X. **Atributos físicos e químicos de coprólitos de duas espécies de minhocas endogeicas**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). 59 f. Setor Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

CIARLO E.; CONTI M.; BARTOLONI N.; RUBIO G. The effect of moisture on nitrous oxide emissions from soil and the N₂O/(N₂O+N₂) ratio under laboratory conditions. **Biology and Fertility of Soils**, 43(6), 675–681, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1007/S00374-006-0147-9>

CLAUSE J.; BAROT S.; RICHARD B.; DECAËNS T.; FOREY E. The interactions between soil type and earthworm species determine the properties of earthworm casts. **Applied Soil Ecology**, 83:149-158, 2014.

DADALTO G.G.; COSTA L.M. Relação entre características químicas de solo e excreções de minhocoçu (*Glossoscolex* spp.). **Revista Ceres**, 37:331-336, 1990.

DEPKAT-JAKOB P.S.; BROWN G.G.; TSAI S.M.; HORN M.; DRAKE H.L. Emission of nitrous oxide and dinitrogen by diverse earthworm families from Brazil and resolution of associated denitrifying and nitrate-dissimilating taxa. **FEMS Microbiology Ecology**, 83(2), 375–391, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01476.x>

DEPKAT-JAKOB P.S.; HUNGER S.; SCHULZ K.; BROWN G.G.; TSAI S.M.; DRAKE H.L. Emission of methane by *Eudrilus eugeniae* and other earthworms: From Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(8), 3014–3019, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.07949-11>

DE-POLLI H.; GUERRA J.G.M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração. **Seropédica**: Embrapa-CNPAB, 10 p. 1997.

DE VLEESCHAUWER D.; LAL R. Properties of worm casts under secondary tropical Forest regrowth. **Soil Science**, 132: 175-181, 1981.

DRAKE H.L.; HORN M.A. As the Worm Turns: The Earthworm Gut as a Transient Habitat for Soil Microbial Biomes. **Annual Review of Microbiology**, 61(1), 169–189. 2007. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093139>

DRAKE H.; SCHRAMM A.; HORN M. **Earthworm Gut Microbial Biomes**: Their Importance to Soil Microorganisms, Denitrification, and the Terrestrial Production of the Greenhouse Gas N₂O. *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates*. 6, 65–87, 2006. DOI: http://doi.org/10.1007/3-540-28185-1_3

DRUMOND M.A.; CAMPOS S.H.C.; GUIMARÃES A.Q.; NUNES J.T. **Ecologia e uso do minhocoçu *Rhinodrilus alatus***. *MG-Biota*, v. 1, n. 3, p. 5-23, 2008.

DRUMOND M.A.; GUIMARÃES A.Q.; EL BIZRI H.R.; GIOVANETTI L.C.; SEPÚLVEDA D.G.; MARTINS R.P. Life history, distribution and abundance of the giant earthworm *Rhinodrilus alatus* RIGHI 1971: conservation and management implications. **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n. 4, p. 699-708, 2013.

EDWARDS C.A.; BOHLEN P.J. **Biology and Ecology of earthworms**. 3 ed., London:

Chapman & Hall; 1996.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa do Solo. Manual de métodos de análise de solo. 2nd ed. Rio de Janeiro: **Embrapa**, 1997.

FISCHER K.; HAHN D.; HONERLAGE W.; ZEYER J. Effect of passage through the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. **Soil Biology and Biochemistry**, 29:1149–52, 1997.

FIUZA S.S.; KUSDRA J.F.; FURTADO D.T. Caracterização Química e Atividade microbiana de coprólitos de *Chibui bari* (*Oligochaeta*) e do solo adjacente. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35: 723-728, 2011.

GANESHAMURTHY A.N.; MANJIAIAH K.M.; RAO SUBBA A. Mobilization of nutrients in tropical soils through worm casting: Availability of macronutrients. **Soil Biology and Biochemistry**, 30(13), 1671–1676, 1998. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00260-5](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00260-5)

GOODMAN B.A. **The characterization of iron complexes with soil organic matter**. In: J. W. Stucki, A. Goodman and U. Schwertmann (Eds.). *Iron in soils and clay minerals*. NATO Advanced Study Institute, Bad Windsheim. p. 842-851, 1985.

HERNANDEZ D.L.; LAVELLE P.; FARDEAU J.C.; NINO M. Phosphorous transformations in two P-sorption contrasting tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (*Glossoscolecidae*: *Oligochaeta*). **Soil Biology and Biochemistry**, 25:789-792 1993.

HEINZMANN F.X.; MIYAZAWA M.; PAVAN M.A. Determinação de nitrato em extratos de solos ácidos por espectrofotometria de absorção ultravioleta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 159-163, 1984.

HMAR L.; RAMANUJAM S. Earthworm cast production and physic-chemical properties in two agroforestry systems of Mizoram (India). **Tropical Ecology**, 55:77-86, 2014.

HORN M.A.; SCHRAMM A.; DRAKE H.L. The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, 69:1662–1669, 2003.

HORN M.A.; DRAKE H.L.; SCHRAMM A. Nitrous oxide reductase genes (*nosZ*) of denitrifying microbial populations in soil and the earthworm gut are phylogenetically similar. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 1019–1026, 2006.

HULUGALLE N.R.; EZUMAH H.C. Effects of cassava-based cropping systems on physic-chemical properties of soil and earthworm casts in a tropical Alfisol. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 35: 55-63, 1991.

JENKINSON D.S.; POWLSON D.S.; WEDDERBURN R.W.M. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil III. The relationship between soil biovolume measured by optical microscopy and the flush of decomposition caused by fumigation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.8.p.189-202, 1976.

KARSTEN G.R.; DRAKE H.L. Comparative assessment of the aerobic and anaerobic microfloras of earthworm guts and forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 1039–1044, 1995.

KUCZAK C.N.; FERNANDES E.C.M.; LEHMANN J.; RONDON M.A.; LUIZÃO F.J. Inorganic and organic phosphorous pools in earthworm casts (Glossoscolecidae) and a Brazilian rainforest Oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, 38:553-560, 2006.

LAVELLE P. Faunal activities and soil process: strategies that determine ecosystem function. **Advances in Ecological Research**, 37:93-132, 1997.

LAVELLE P.; MARTIN A. Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soils of the humid tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Vol. 24, No. 12, pp. 1491-1498, 1992.

LEE K.E. **Earthworms: their ecology and relationships with soil and land use**. New York: Academic Press, p.411, 1985.

LUBBERS I.M.; BRUSSARD L.; OTTEN W.; GROENIGEN K.J.W. Earthworm-induced N mineralization in fertilized grassland increases both N₂O emission and crop-N uptake. **European Journal Soil of Science**, 62:152-161, 2011.

LUBBERS I.M.; GROENIGEN K.J.W.; FONTE S.J.; SIX J.; BRUSSARD L.; GROENIGEN J.W. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. **Nature Climate Change**, 3:187-194, 2013.

LUNT H.A.; JACOBSON H.G.M. The chemical composition of earthworm casts. **Soil Science**, 58: 367-376, 1944.

MACHADO P.L.O. **Soil Carbon and the mitigation of global climate change**. São Paulo: Química Nova; Vol.28, 2ed., 2005.

MAJEED M.Z.; MIAMBI E.; BAROIS I.; BLANCHART E.; BRAUMAN A. Emissions of nitrous oxide from casts of tropical earthworms belonging to different ecological categories. **Pedobiologia**, 56:49-58, 2013.

MARQUES R.; MOTTA A.C.V. Análise química do solo para fins de fertilidade. In: Lima MR, editor. **Manual de diagnostico de fertilidade e manejo dos solos agrícolas**. 2nd ed. Curitiba: Imprensa Universitária da UFPR, p. 82-102, 2003.

MATERECHERA S.A.; MANDIRINGANA O.T.; NYAMAPFEN E. Production and physico-chemical properties of surface castas from microchaetid earthworms in central Eastern Cape. **South African Journal of Science**, 15:151-157, 1998.

MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA: 729 p., 2006.

MOUAT M.C.H.; KEOGH R.G. Adsorption of water-soluble phosphate from earthworm casts. **Plant and Soil**, 97:233-241, 1987.

MULVANEY R.L. **Nitrogen – Inorganics forms**. In: Bartels JM, Bigham JM, Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltampam PN, Tabatai MA, Johnson CT, Summer ME Eds. *Methods of soil analysis. Part 3 - Chemical methods*. 5 ed. Madison, Soil Science Society of American Book Series, 1996.

MULONGOY K.; BEDORET A. Properties of worm casts and surface soils under various plant covers in the humid tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, 21: 197-203, 1989.

NASCIMENTO C.W.A.; LEITE P.V.V.; NASCIMENTO R.S.M.P; MELLO E.E.C. Influência da calagem no fracionamento e na disponibilidade de manganês em solos de Pernambuco. **Agropecuária Técnica**. 26:22-28, 2005.

NERI A.V. **Gradiente pedológico-cegetacional de cerrado em Paraopeba, MG.** (Tese de Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

NIJHAWAN S.D.; KANWAR J.S. Physico-Chemical properties of earthworm castings and their effect on the productivity of soil. **Indian Journal of Agricultural Science**, 22:357-373, 1952.

NYBORG M.; SOLBERG E.D.; MALHI S.S.; IZAURRALDE R.C. Fertilizer N, cropresidue, and tillage alter soil C and N content in a decade. In: Lal R, Kimble J, Levine E, Stewart BA. (Ed.) **Soil management and greenhouse effect**. Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 93-99, 1995.

ODUM E.P. Trends expected in stressed ecosystems. **Biology Science**, v. 35, p. 419-422, 1985.

PARLE J.N. Microorganisms in the intestine of earthworms. **Journal of General Microbiology**, 31:1-13, 1963.

QUADROS R.M.B.; BELLOTE A.F.J.; DIONÍSIO J.A. Observações sobre as Propriedades Químicas do solo e de excrementos de minhocas em plantios de *Eucalyptus grandis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, 45:29-39, 2002.

RÖMBKE J.; JÄNSCH S.; DIDDEN W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 62:249-265, 2005.

SCHÖNHOLZER F.; HAHN D.; ZARDA B.; ZEYER J. Automated image analysis and in situ hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. **Journal of Microbiology Methods**, 48:53-68, 2002.

SCHMIDT O.; WÜST P.K.; HELLMUTH S.; BORST K.; HORN M.A.; DRAKE H.L. Novel [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenase gene transcripts indicative of active facultative aerobes and obligate anaerobes in earthworm gut contents. **Applied Environmental Microbiology**, 77: 5842-5850, 2011.

SCHULZ K.; HUNGER S.; BROWN G.G.; TSAI S.M.; CERRI C.C.; CONRAD R.; DRAKE H.L. Methanogenic food web in the gut contents of methane-emitting earthworm *Eudrilus eugeniae* from Brazil. **The ISME Journal**, 1-15, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.262>

SMITH S.M. Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. **Applied Environmental Microbiology**, 45:1545-47, 1983.

TIEDJE J.M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In **Biology of Anaerobic Microorganisms**, ed. AJB Zehnder, pp. 179-243. New York: Wiley, 1988.

TOMAT U.; GRAPPELLI A.; GALLI E. The hormone-like effect of earthworm casts on plant growth. **Biology and Fertility of Soil**, 5:288-294, 1988.

WOLTER C.; SCHEU S. Changes in bacterial numbers and hyphal lengths during the gut passage through *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae, Oligochaeta). **Pedobiologia**, 43:891–900, 1999.

WÜST P.K.; HORN M.A.; DRAKE H.L. Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. **The ISME Journal**, 5:92-106, 2011.

WÜST P.K.; HORN M.A.; HENDERSON G.P.H.; JANSSENREHM B.H.; DRAKE H.L. Gut-associated denitrification and in vivo emission of nitrous oxide by the earthworm families Megascolecidae and Lumbricidae in New Zealand. **Applied Environmental Microbiology**, v.75:3430–3436, 2009.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Floresta Nacional de Paraopeba-MG. a) início da Floresta Nacional; b) área experimental de coleta de solo.



Apêndice 2. Área do local de coleta de solo para montagem do experimento e análises químicas. a) local de coleta e b) 120 kg de solo coletados para montagem do experimento.



Apêndice 3. Indivíduo exemplar da espécie *Rhinodrilus alatus* utilizada no presente estudo.



Apêndice 4. Cinco espécimes de *Rhinodrilus alatus* mantidos individualmente para pesagem, e após, acondicionamento dos minhocuçus nos potes de repetição.



Apêndice 5.

Tabela 2. Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (C- BMS), Quociente metabólico (qCO_2) e Nitrogênio da BMS nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.

Estágios	C-BMS (mg C kg ⁻¹)		qCO_2 (mg C-CO ₂ kg ⁻¹ CBMS.h ⁻¹)		N-BMS (mg N kg ⁻¹)	
	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito
0 hora	586,3Aa	330,6Bab	16,2Bab	27,3Aabcd	97,7Aa	55,1Bab
4 horas	498,9Aa	340Bab	18,6Aa	19,6Acde	83,1Aa	56,6Bab
8 horas	569,5Aa	387,3Ba	17,7Aa	21,6Abcde	94,9Aa	64,5Ba
12 horas	528,8Aa	257,1Bab	16,8Bab	37,2Aa	88,1Aa	42,8Bab
24 horas	542,5Aa	387,6Ba	12,1Abc	18,1Acde	90,4Aa	64,6Ba
48 horas	494,0Aa	247,7Bb	14,3Babc	33,5Aabc	82,3Aa	41,2Bb
96 horas	500,6Aa	271,8Bab	9,1Bcde	36,4Aab	83,4Aa	45,2Bab
8 dias	590,8Aa	284,0Bab	10,7Bcd	19,9Acde	98,4Aa	47,3Bab
16 dias	583,6Aa	298,4Bab	6,8Bde	24,6Aabcde	97,2Aa	49,7Bab
32 dias	595,7Aa	276,2Bab	4,6Be	11,4Ae	99,2Aa	46,0Bab
CV (%)	13,7		27,6		13,7	

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas entre solo controle e coprólito para cada variável, letras minúsculas apresentam diferenças significativas entre os estágios, com teste Tukey $p < 0,05$.

Apêndice 6.

Tabela 3. Resultados de N-NH_4^+ e N-NO_3^- nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.

Estágios	N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)		N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	
	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito
0 hora	19,3Babc	176,1Aa	1,6Ac	0,7Babc
4 horas	18,5Babc	180,0Aa	1,9Aabc	2,5Aab
8 horas	18,2Babc	121,2Aa	1,8Aabc	2,5Aabc
12 horas	20,9Bab	210,3Aa	2,1Aabc	0,4Bbc
24 horas	18,1Babc	197,5Aa	1,7Ac	0,7Babc
48 horas	25,0Ba	194,2Aa	2,1Aabc	0,4Babc
96 horas	17,5Bbc	145,6Aa	1,8Aabc	0,5Babc
8 dias	17,9Babc	135,5Aa	2,1Aabc	0,3Bc
16 dias	16,8Bc	193,2Aa	2,5Aab	0,4Babc
32 dias	17,1Bbc	199,5Aa	3,4Aa	0,6Babc
CV (%)	4.02		6.32	

*Letras maiúsculas apresentam diferenças significativas entre tratamentos para cada estágio e variável, letras minúsculas apresentam diferenças significativas entre os estágios para cada variável com teste Tukey $p < 0,05$.

Apêndice 7.

Tabela 4. Fluxos de C-CH₄, C-CO₂ e N-N₂O nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.

Estágios	C-CH ₄ (nmol g ⁻¹ h ⁻¹)		C-CO ₂ (nmol g ⁻¹ h ⁻¹)		N-N ₂ O (nmol g ⁻¹ h ⁻¹)	
	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito
0 hora	0,77Aab	0,68Aa	84,8Aab	131,6Aa	44,8Bab	107,2Aa
4 horas	0,75Aa	0,80Aa	82,9Aab	100,5Aab	34,1Aab	28,5Aa
8 horas	0,66Acd	0,66Aa	36,5Bab	96,7Aab	45,4Aab	33,2Aa
12 horas	0,63Acd	0,59Aa	27,2Ab	31,7Ab	40,1Aab	25,06Aa
24 horas	0,69Abc	0,83Aa	51,7Aab	67,8Aab	42,3Aab	57,0Aa
48 horas	0,57Ad	0,65Aa	23,7Ab	53,1Aab	41,9Aab	37,5Aa
96 horas	0,59Ad	0,78Aa	55,3Bab	124,8Aab	35,6Ba	54,8Aa
8 dias	0,77Aab	0,67Aa	163,9Aa	54,6Bab	48,4Aab	50,1Aa
16 dias	0,64Acd	0,58Aa	43,3Aab	60,5Aab	49,9Ab	35,6Ba
32 dias	0,61Acd	0,71Aa	97,9Aab	62,3Aab	41,2Bab	48,3Aa
CV (%)	21.4		19.3		18.4	

*Letras maiúsculas apresentam diferenças significativas entre tratamentos para cada estágio e variável, letras minúsculas apresentam diferenças significativas entre os estágios para cada variável com teste Tukey p<0,05.

Apêndice 8

Tabela 5. Produção acumulada de CH₄, CO₂ e N₂O em nmol g⁻¹ de massa seca nos 10 estágios de envelhecimento. Coprólitos da espécie *R. alatus* e solo controle – Latossolo Amarelo de Paraopeba-MG.

Estágios	CH ₄ nmol g ⁻¹ massa seca		CO ₂ nmol g ⁻¹ massa seca		N ₂ O nmol g ⁻¹ massa seca	
	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito	Solo Controle	Coprólito
0 hora	0,91A	1,6A	1901A	2193A	118B	489A
4 horas	0,76B	0,92A	1931A	1477A	119B	870A
8 horas	0,73A	0,69A	1910A	1753B	168B	1882A
12 horas	0,76A	0,90A	1795A	2070A	169B	454A
24 horas	0,66B	0,94A	1366A	1693A	142A	524A
48 horas	0,66A	0,77A	1347B	1722A	185A	406A
96 horas	0,75A	0,83A	1287B	2014A	189A	153A
8 dias	0,52B	0,68A	1422A	1159B	143A	163A
16 dias	0,43B	0,80A	845B	1539A	189B	383A
32 dias	0,27A	0,87A	508A	551A	145B	187A

*Letras maiúsculas apresentam diferenças significativas entre tratamentos para cada estágio e variável com teste Tukey p<0,05.