

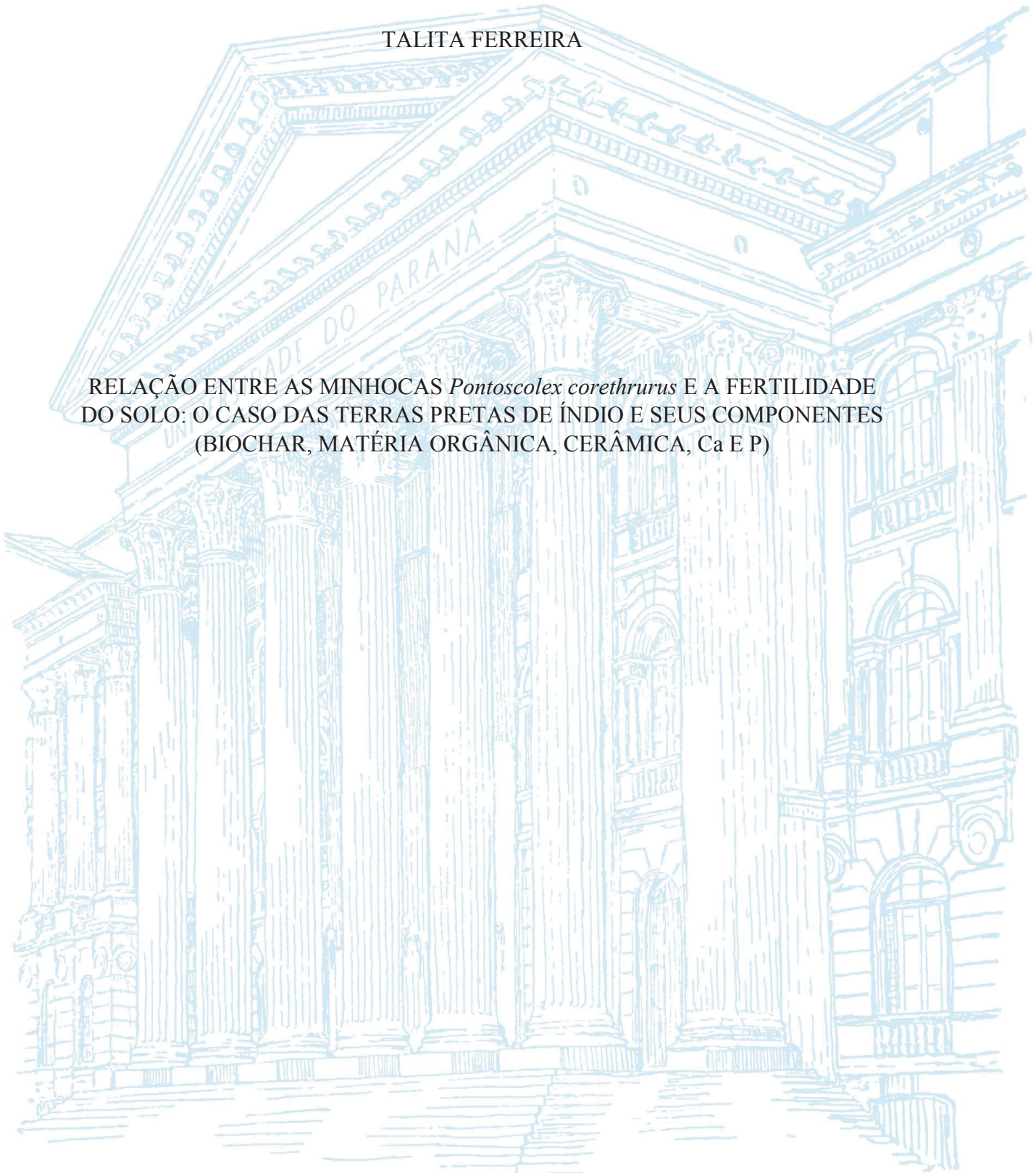
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TALITA FERREIRA

RELAÇÃO ENTRE AS MINHOCAS *Pontoscolex corethrurus* E A FERTILIDADE DO SOLO: O CASO DAS TERRAS PRETAS DE ÍNDIO E SEUS COMPONENTES (BIOCHAR, MATÉRIA ORGÂNICA, CERÂMICA, Ca E P)

CURITIBA

2020



TALITA FERREIRA

RELAÇÃO ENTRE AS MINHOCAS *Pontoscolex corethrurus* E A FERTILIDADE
DO SOLO: O CASO DAS TERRAS PRETAS DE ÍNDIO E SEUS COMPONENTES
(BIOCHAR, MATÉRIA ORGÂNICA, CERÂMICA, Ca E P)

Tese 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 Doutora em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. George Gardner Brown

Coorientador: Prof. Dr. Luís Cunha

CURITIBA

2020

Ferreira, Talita

Relação entre as minhocas *Pontoscolex corethrurus* e a fertilidade do solo: o caso das terras pretas de índio e seus componentes (Biochar, matéria orgânica, cerâmica, Ca E P). / Talita Ferreira. - Curitiba, 2020.

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

Orientador: George Gardner Brown.

Coorientador: Luís Cunha.

1. Minhoca (Biologia do solo). 2. Solos, 3. Fertilidade dos Solos - Composição. I. Brown, George Gardner. II. Cunha, Luís. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA DO SOLO -
40001016014P4

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DO SOLO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de TALITA FERREIRA intitulada: **RELAÇÃO ENTRE AS MINOCAS *Pontoscolex corethrurus* E A FERTILIDADE DO SOLO: O CASO DAS TERRAS PRETAS DE ÍNDIO E SEUS COMPONENTES (BIOCHAR, MATÉRIA ORGÊNICA, CERÂMICA, Ca E P)**, sob orientação do Prof. Dr. GEORGE GARDNER BROWN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2020.


GEORGE GARDNER BROWN

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSITY OF WISCONSIN)


NEWTON PAULO DE SOUZA FALCÃO

Avaliador Externo (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA)


VOLNEI PAULETTI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ANTÔNIO CARLOS VARGAS MOTTA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Ao meu pai Milton Ferreira e minha mãe Terezinha Kuiawa
Ferreira, e a meus irmãos Thayná Ferreira e José Vitor
Ferreira pelo incentivo e exemplo de persistência na vida.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Milton Ferreira e Terezinha Kuiawa Ferreira, pelo amor, educação e apoio incondicional. Aos meus irmãos Thayná Ferreira e José Vitor Ferreira pelas alegrias, amizade, apoio e paciência. Obrigada por tudo, amo vocês.

Ao meu orientador George G. Brown e co-orientador Luís Cunha pela oportunidade, amizade, ensinamentos e conhecimentos compartilhados ao longo desses anos.

Ao analista da EMBRAPA Fabricio Augusto Hansel pela amizade, conversas e colaboração nas análises e redação deste trabalho.

A pesquisadora Claudia Maia e Krisle da Silva, pela ajuda e colaboração no projeto.

A todos os colegas de trabalho, Herlon, Wilian, Alessandra, Ana Caroline, Rodrigo, Lilianne, Elodie, Ricardo, Anne Elise e Nivaldo pela ajuda durante a montagem e execução do experimento.

As amigas Jéssica e Ana Caroline pelo incentivo, conversas e confiança.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade do doutorado e pela contribuição na minha formação.

A Embrapa Florestas e todos os pesquisadores e laboratoristas envolvidos direta e indiretamente no trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

A Universidade de Cardiff pela oportunidade e auxílio na realização de atividades.

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana”.*

Carl G. Jung

RESUMO

As Terras Pretas de Índio (TPIs) são solos altamente férteis de origem antrópica, comumente encontrados na Amazônia. Nesses solos, a atividade dos engenheiros edáficos como as minhocas é de fundamental importância, afetando sua gênese, estrutura, atividade microbiana e ciclagem de nutrientes. Contudo, há pouca informação sobre a relação entre as minhocas e os diversos componentes das Terras Pretas de Índio (matéria orgânica, biochar, cerâmica, Ca e P), e sua influência sobre a fertilidade do solo e a produção vegetal. Dentro deste contexto, o presente estudo teve por objetivo geral avaliar a relação das minhocas *Pontoscolex corethrurus* com as TPIs e seus componentes e o efeito resultante sobre a fertilidade do solo. Numa série de experimentos em laboratório e casa de vegetação avaliou-se tanto os aspectos positivos como os negativos dessa relação. Em laboratório foram realizados testes para verificar o efeito de doses de biochar sobre as minhocas (teste ecotoxicológico com *P. corethrurus* como bioindicador), assim como a adição de Ca e P sobre as populações de minhocas em cultivo e a qualidade dos coprólitos produzidos. Finalmente, em casa de vegetação avaliou-se o efeito da interação das minhocas com os componentes das TPIs (biochar, cerâmica, matéria orgânica e fonte de fósforo/cálcio) na fertilidade do solo e na produção vegetal usando milho como planta modelo. Verificamos que o biochar não apresentou efeito toxicológico nas minhocas *P. corethrurus* e que após a passagem pelo trato intestinal foram constatadas alterações na composição química do biochar, como teores de lignina, alterações morfológicas e evidência de atividade microbiana. A presença de minhocas *P. corethrurus* nos solos em experimentos em laboratório e casa de vegetação teve efeito sobre suas características químicas e crescimento de plantas de milho. A influência desses organismos nos solos de TPI se deve não somente pela redistribuição do carvão pirogênico no perfil, mas também pelas transformações nas características químicas, físicas e biológicas do solo após passagem pelo trato intestinal. A adição de matéria orgânica e espinha de peixe ao solo foram os principais responsáveis pelo aporte de nutrientes, no entanto concluímos que as interações entre os diferentes fatores apresentam efeito sinérgico sobre o crescimento das plantas e fertilidade do solo, indicando a complexidade dos processos que ocorrem nos solos TPI e terra preta nova.

Palavras-Chave: Bioturbação. Coprólitos. Glândulas calcíferas. Qualidade do solo.

ABSTRACT

Amazonian Dark Earth (ADE) are highly fertile soils of anthropic origin, commonly found in the Amazon. In these soils, the activity of ecosystem engineers such as earthworms is of fundamental importance, affecting their genesis, structure, microbial activity and nutrient cycling. However, there is little information on the relationship between earthworms and the various components of ADEs (organic matter, biochar, ceramics, Ca and P), and their influence on soil fertility and plant production. The main objective of the present study was to evaluate the relationship between *P. corethrurus* earthworms with ADEs and their components and the effect on soil fertility. In a series of experiments in the laboratory and in the greenhouse, we consider both positive and negative aspects of this relationship. In the laboratory we carried out tests to verify the effect of biochar doses on earthworms (ecotoxicological test with *P. corethrurus* as bioindicator), as well as the addition of Ca and P on earthworm populations in culture and quality of the casts produced. Finally, in the greenhouse we studied the effect of earthworm interaction with components of ADEs (biochar, ceramics, organic matter and source of phosphorus/calcium) on soil fertility and plant production using corn as model plants. We observed that biochar had no toxic effect on *P. corethrurus* and that gut passage altered the biochar, such as its lignin contents, morphology and microbial activity. Earthworm presence in the laboratory and greenhouse soils impacted soil fertility and increased maize growth. The influence of these animals on ADEs is due not only to the redistribution of pyrogenic charcoal in the profile but also to transformations in chemical, physical and biological soil characteristics after gut passage. The addition of organic matter and fish bones to the soil were the main factors responsible for nutrient enrichment, but we also conclude that interactions between different factors lead to synergistic effects on maize growth and soil fertility, indicating the complexity of processes that occur in both ADEs and Terra Preta Nova soils.

Keywords: Bioturbation. Casts. Calciferous glands. Soil quality.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – PROPORÇÃO DOS COMPONENTES NAS AMOSTRAS DE ESFAGNO, BIOCHAR, SOLO ARTIFICIAL (SA), SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE BIOCHAR 10%(V/V) (SB10).....31
- FIGURA 2 - PIROGRAMAS DAS CORRENTES TOTAIS DE ÍONS (CTI) PARCIAIS DAS AMOSTRAS DE ESFAGNO (A) E BIOCHAR (B).....33
- FIGURA 3 - (A) SCORES DA ACP DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR, ESFAGNO, SOLO ARTIFICIAL (SA) E SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE 10% (v/v) DE BIOCHAR (SB10). (B) LOADINGS DE CORRELAÇÃO DOS PRODUTOS DE PIROLISE DETECTADOS NAS AMOSTRAS.....37
- FIGURA 4 - ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS COMPOSTOS BIFENIL (A) C1-GUAIACOL (B), C2-GUAIACOL (C), E NAFTALENO (D) NAS DIFERENTES AMOSTRAS. SA (SOLO ARTIFICIAL), C (COPRÓLITO DE MINHOCAS), CB10 (COPRÓLITO DE MINHOCAS PRESENTES NO TRATAMENTO COM ADIÇÃO DE 10% (V/V) DE BIOCHAR), SAW (SOLO ARTIFICIAL COM PRESENÇA DE MINHOCAS), SB10 (SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE BIOCHAR (10% v/v), SWB10 (SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE 10% (v/v) DE BIOCHAR NA PRESENÇA DE MINHOCAS).....39
- FIGURA 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM BIOCHAR DO OURIÇO DA CASTANHA DO PARÁ; A) BIOCHAR ANTES DE PASSAR PELO TRATO INTESTINAL DAS MINHOCAS *P.corethrurus*, AUMENTO DE 500x B) BIOCHAR APÓS PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL DAS MINHOCAS, AUMENTO 500X; C E D) PRESENÇA DE MICROORGANISMOS EM BIOCHAR APÓS PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL, AUMENTO DE 2000 E 5000 x..40
- FIGURA 6 - A) PRESENÇA DE COPRÓLITOS NA SUPERFÍCIE DOS SOLOS SEM ADIÇÃO DE P B) MORTALIDADE DE MINHOCAS OBSERVADA NOS

TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE P (FOSFATO DIPOTÁSSICO); C) COPRÓLITOS E SOLOS COLETADOS DURANTE O EXPERIMENTO.....56

FIGURA 7 - RELAÇÃO ENTRE A CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS SOLOS (CE mS/cm) E A MORTALIDADE DE MINHOCAS (%) NOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (SN); SOLO NATURAL+pH6,0 (SN+pH6,0), SOLO+CA (SN+CA), SOLO+CA+pH6,0 (CA+pH6,0), SOLO+P (SN+P), SOLO+P+pH6,0 (P+pH6,0), SOLO+CA+P (CA+P), SOLO+CA+P+pH6,0 (CA+P+pH6,0).....57

FIGURA 8 - VALORES DE pH CaCl₂ DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *Pontoscolex corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM pH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca (Ca), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca A pH 6,0 (Ca+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca E P (Ca+P), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca, P A pH6,0 (Ca+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A pH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).....60

FIGURA 9 - TEORES DE Ca⁺² DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *Pontoscolex corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM pH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (Ca), SOLO COM ADIÇÃO DE CA A pH 6,0 (CA+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca E P (Ca+P), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca, P A pH6,0 (Ca+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A PH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).....62

FIGURA 10 - TEORES DE P DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *Pontoscolex corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM pH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (Ca), SOLO COM ADIÇÃO DE CA A pH 6,0 (Ca+pH6,0), SOLO

COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA E P (Ca+P), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca, P A pH6,0 (Ca+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A pH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).....63

FIGURA 11 - VALORES DE T DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *Pontoscolex corethrus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM pH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (Ca), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca A pH 6,0 (Ca+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca E P (Ca+P), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca, P A pH6,0 (Ca+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A pH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).....64

FIGURA 12 - A) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AMOSTRAS DE SOLO SEM ADIÇÃO DE MINHOCAS; B) ESPECTRO DE EDS DA AMOSTRA DE SOLO SEM ADIÇÃO DE MINHOCAS; C) AMOSTRAS DE COPRÓLITOS DAS MINHOCAS *P. corethrus*; D) ESPECTRO DE EDS DOS COPRÓLITOS DAS MINHOCAS.....65

FIGURA 13 - A) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA PARTE EXTERNA DA GLÂNDULA CALCÍFERA RETIRADA DO SEGMENTO 9 DAS MINHOCAS *P. corethrus*; B) ESPECTRO DE EDS DA PARTE INTERNA DA GLÂNDULA CALCÍFERA; C) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA PARTE INTERNA DA GLÂNDULA CALCÍFERA; D) SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS NO ESPECTRO DE EDS DA GLÂNDULA CALCÍFERA DAS MINHOCAS.....66

FIGURA 14 - COMPONENTES PRESENTES NOS SOLOS TPI, UTILIZADOS NO ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO; A) MINHOCAS *Pontoscolex corethrus*; B) FRAGMENTOS CERÂMICOS; C) BIOCHAR DO OURIÇO DA CASTANHA DO PARÁ; D) ESPINHA DE PEIXE; E) ESTERCO EQUINO.....89

FIGURA 15 - ALTURA DAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) *Pontoscolex corethrurus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA - ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE).....91

FIGURA 16 - MASSA SECA DA PARTE AÉREA (g) DO MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) *Pontoscolex corethrurus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA- ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE).....92

FIGURA 17 - MASSA SECA DE RAIZ (g) DAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) *PONTOSCOLEX CORETHRURUS*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA- ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO.....93

FIGURA 18 - VOLUME DE RAIZ (cm³) DAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) *Pontoscolex corethrurus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA- ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE). AS BARRAS EM VERMELHO REPRESENTAM ACRÉSCIMO OU DECRÉSCIMO NO VOLUME DE RAIZ NA PRESENÇA DO FATOR.....93

FIGURA 19 - A) PRESENÇA DE COPRÓLITOS NA SUPERFÍCIE DOS VASOS; B) BIOTURBAÇÃO NO PERFIL DO SOLO.....94

FIGURA 20 - INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA DAS PLANTAS DE MILHO NOS TRATAMENTOS COM *Pontoscolex corethrurus* (P) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; PB (MINHOCA+BIOCHAR), PC (MINHOCA+CERÂMICA); PM (MINHOCA+MATÉRIA ORGÂNICA); PE (MINHOCA+ESPINHA DE PEIXE); PBCME

(MINHOCA+BIOCHAR+CERÂMICA+MATÉRIA ORGÂNICA+ESPINHA DE PEIXE).....95

FIGURA 21 - INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA DAS PLANTAS DE MILHO (%) NOS TRATAMENTOS COM BIOCHAR (B) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; BP (BIOCHAR+MINHOCA), BC (BIOCHAR+CERÂMICA); BM (BIOCHAR E MATÉRIA ORGÂNICA); BE (BIOCHAR+ESPINHA DE PEIXE); BPCME (BIOCHAR+MINHOCAS+CERÂMICA+MATÉRIA ORGÂNICA+ESPINHA DE PEIXE).....96

FIGURA 22 - INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA (%) DAS PLANTAS DE MILHO NOS TRATAMENTOS COM CERÂMICA (C) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; CP (CERÂMICA+MINHOCA), CB (CERÂMICA+BIOCHAR); CM (CERÂMICA E MATÉRIA ORGÂNICA); CE (CERÂMICA+ESPINHA DE PEIXE); CPBME (CERÂMICA+MINHOCA+BIOCHAR+MATÉRIA ORGÂNICA+ESPINHA DE PEIXE).....97

FIGURA 23 - INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA (%) DO MILHO NOS TRATAMENTOS COM MATÉRIA ORGÂNICA (M) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; MP (MATÉRIA ORGÂNICA+MINHOCA), MB (MATÉRIA ORGÂNICA+BIOCHAR); MC (MATÉRIA ORGÂNICA+CERÂMICA); ME (MATÉRIA ORGÂNICA+ESPINHA DE PEIXE); MPBCE (MATÉRIA ORGÂNICA+MINHOCA+BIOCHAR+ MATÉRIA ORGÂNICA+ESPINHA DE PEIXE).....97

FIGURA 24 - INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA (%) DO MILHO NOS TRATAMENTOS COM ESPINHA DE PEIXE (E) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; EP (MINHOCA+ESPINHA DE PEIXE), EB (ESPINHA DE PEIXE+BIOCHAR); EC (ESPINHA DE PEIXE+MATÉRIA ORGÂNICA); EM (ESPINHA DE PEIXE+MATÉRIA ORGÂNICA); EPBCM (ESPINHA DE PEIXE+MINHOCA+BIOCHAR+CERÂMICA+MATÉRIA ORGÂNICA).....98

FIGURA 25 - VALORES MÉDIOS DE NITRÓGENIO (N) NAS PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* – DKB 230) NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL). P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE).....100

FIGURA 26 - VALORES MÉDIOS DE FÓSFORO NAS PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* – DKB 230) NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL).; P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATERIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE).....100

FIGURA 27 - VALORES MÉDIOS DE POTÁSSIO NAS PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* – DKB 230) NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL). P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATERIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE).....101

FIGURA 28 - VALORES MÉDIOS DE CÁLCIO NAS PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* – DKB 230) NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL). P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE).....102

FIGURA 29 - VALORES MÉDIOS DE MAGNÉSIO NAS PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* – DKB 230) NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS E PORCENTAGEM DE GANHO; P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATERIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE).....103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - BIOMASSA MÉDIA (g) DE MINHOCAS (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) EXPOSTAS A SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE BIOCHAR DO OURIÇO DA CASTANHA DO PARÁ DURANTE UM PERÍODO DE 28 DIAS, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.....	30
TABELA 2 - ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS DIFERENTES COMPOSTOS DA PI-GC-EM DO ESFAGNO, BIOCHAR, SOLO ARTIFICIAL SEM (SA) E COM 10% (v/v) DE BIOCHAR (SB10).....	35
TABELA 3- ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM OU SEM ADIÇÃO DE P, Ca, E AJUSTE OU NÃO DO pH A 6,0.....	59
TABELA 4 - ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO E DOS COPRÓLITOS (CP) DE MINHOCAS <i>Pontoscolex corethrurus</i> DOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM OU SEM ADIÇÃO DE P, CA, FARINHA DE OSSO (FO) E ESPINHA DE PEIXE (E), AJUSTADO OU NÃO A pH A 6,0. AUMENTOS OU DIMINUIÇÃO ACIMA DE 15% ENTRE OS COPRÓLITOS E OS TRATAMENTOS, ESTÃO SINALIZADAS EM NEGRITAS.....	61
TABELA 5 - ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO LATOSSOLO AMARELO USADO NO EXPERIMENTO.....	87
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SOLOS APÓS ADIÇÃO DOS DIFERENTES FATORES E SUAS INTERAÇÕES: MINHOCA (P), BIOCHAR (B), MO (M), CERÂMICA(C) E ESPINHA DE PEIXE (E).....	105
TABELA 7 - PESO TOTAL DAS MINHOCAS ADICIONADAS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS, PESO TOTAL FINAL, % DE MORTALIDADE POR TRATAMENTO E PRODUÇÃO DE CASULOS.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

TPI – TERRA PRETA DE ÍNDIO

HPA - HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Pi-CG-EM - CROMATOGRAFIA GASOSA E À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

DBO - DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO

SA – SOLO ARTIFICIAL

MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

ACP – ANALISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

TFSA – TERRA FINA SECA AO AR

CE – CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

EDS - ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA

TPN - TERRA PRETA NOVA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1	AS MINHOCAS E A FERTILIDADE DOS SOLOS.....	11
1.2	COMPONENTES DAS TPI'S E SUA RELAÇÃO COM AS MINHOCAS.....	12
2	CAPÍTULO I: INTERAÇÃO ENTRE BIOCHAR E MINHOCAS <i>Pontoscolex corethrurus</i> UMA VISÃO BIOQUÍMICA E MICROSCÓPICA.....	14
2.1	RESUMO.....	14
2.2	ABSTRACT.....	14
2.3	INTRODUÇÃO.....	15
2.4	MATERIAL E METODOS.....	16
2.4.1	PREPARO DO BIOCHAR. E DO SOLO ARTIFICIAL.....	16
2.4.2	SELEÇÃO E COLETA DAS MINHOCAS.....	17
2.4.3	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	17
2.4.4	ANÁLISE MACROMOLECULAR BIOQUÍMICA.....	18
2.4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	19
2.5	RESULTADOS.....	20
2.5.1	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	20
2.5.2	Pi-CG-EM NA DETECÇÃO DE BIOCHAR EM SOLO ARTIFICIAL.....	20
2.5.3	INTERAÇÃO ENTRE BIOCHAR E MINHOCAS <i>P. corethrurus</i>	28
2.5.4	MORFOLOGIA DO BIOCHAR APÓS PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL DE minhocas <i>P. corethrurus</i> (MEV).....	30
2.6	DISCUSSÃO.....	31
2.7	CONCLUSÃO.....	33
2.8	REFERÊNCIA.....	33
3	CAPÍTULO II: EFEITO DA PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL DAS MINHOCAS <i>P. corethrurus</i> NA FERTILIDADE DO SOLO E CARACTERIZAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO DOS COPRÓLITOS...	39
3.1	RESUMO.....	39
3.2	ABSTRACT.....	39
3.3	INTRODUÇÃO.....	40
3.4	MATERIAL DE MÉTODOS.....	42

3.4.1 COLETA E PREPARO DO SOLO.....	42
3.4.2 ENSAIO 1.....	42
3.4.3 ENSAIO 2.....	43
3.5 RESULTADOS.....	45
3.5.1 ENSAIO 1.....	45
3.5.2 QUIMICA DO SOLO.....	46
3.5.3 ENSAIO 2.....	49
3.6 DISCUSSÃO.....	55
3.6.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS COPRÓLITOS.....	55
3.6.2 CARACTERIZAÇÃO QUIMICA DOS COPRÓLITOS (ENSAIO 2).....	58
3.6.3 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA.....	62
3.7 CONCLUSÃO.....	64
3.8 REFERÊNCIAS.....	
4 CAPÍTULO III: MONTAGEM E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE TPI SIMULADO EM CASA DE VEGETAÇÃO: INFLUÊNCIA DOS DIVERSOS COMPONENTES DA TPI NA PRODUÇÃO DE MILHO.....	73
4.1 RESUMO.....	73
4.2 ABSTRACT.....	73
4.3 INTRODUÇÃO.....	74
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
4.4.1 COLETA E PREPARO DO SOLO.....	76
4.4.2 TRATAMENTOS AVALIADOS.....	76
4.4.3 MONTAGEM DO ENSAIO.....	78
4.4.3.1 ANÁLISE DO TEOR DE NUTRIENTES NAS PLANTAS.....	79
4.4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
4.5 RESULTADOS.....	79
4.5.1 CRESCIMENTO DO MILHO.....	79
4.5.2 NUTRIENTES DAS PLANTAS.....	87
4.5.3 ANÁLISE QUÍMICA DOS SOLOS.....	91
4.5.4 POPULAÇÃO DE MINHOCAS.....	97
4.6 DISCUSSÃO.....	98
4.6.1 CRESCIMENTO DO MILHO.....	98

4.6.2 ANÁLISE NUTRICIONAL DAS PLANTAS DE MILHO.....	105
4.6.3 BIOMASSA REPRODUÇÃO DAS MINHOCAS.....	109
4.7 CONCLUSÃO.....	109
4.8 REFERÊNCIA.....	110
5 CONCLUSÃO GERAL.....	119
6 REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS I -	122
ANEXO II -	123

1. INTRODUÇÃO GERAL

Grande parte da Amazônia apresenta solos ácidos, altamente intemperizados, com baixos teores de P, e baixa capacidade de retenção de nutrientes (FALCÃO et al., 2009). Levando em consideração essas características, esses solos da região amazônica podem ser limitantes para a produção agrícola. No entanto na Amazônia também existem manchas de solos com alta fertilidade natural, chamados de Terras Pretas de Índio (TPI's) ou Terras Pretas Amazônicas.

As TPIs são caracterizadas por apresentarem profundidades variadas, com até dois metros, alto teor de nutrientes (especialmente P e Ca) e matéria orgânica (MO), e foram formados pela entrada contínua de materiais orgânicos (resíduos orgânicos vegetais e animais, carvão) e inorgânicos (cerâmica), adicionados pela atividade de comunidades indígenas ao longo do tempo (GLASER; BIRK, 2012). Esses materiais foram também incorporados e processados pela microbiota e fauna edáfica, incluindo as minhocas, importantes engenheiros edáficos. Contudo, ainda se sabe pouco sobre a interação entre esses componentes das TPIs e as minhocas, e como elas contribuem para a formação de TPIs e sua fertilidade (CUNHA et al., 2016).

1.1 AS MINHOCAS E A FERTILIDADE DO SOLO

As minhocas desempenham papel fundamental na formação e manutenção da estrutura do solo. Através do processo de bioturbação, as minhocas formam agregados, alteram a porosidade, aeração e infiltração de água (LAVELLE, 1988). Para sobreviverem num ambiente com pouco alimento e de baixa qualidade, elas desenvolveram uma relação estreita com a microbiota do solo, formando uma simbiose com bactérias no intestino, que permite melhor aproveitamento dos resíduos orgânicos ingeridos (LAVELLE et al., 1995). No intestino há estimulação da atividade microbiana, mineralização de nutrientes, decomposição de MO, reorganização de partículas minerais, e alteração do pH por adição de carbonato de cálcio (CaCO_3) (BROWN et al., 2000). Portanto, a passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas pode ter um efeito importante sobre a disponibilidade de diversos nutrientes (especialmente o P) para as plantas, e conseqüentemente sobre a fertilidade do solo (LEE, 1985).

Muitas espécies de minhocas, incluindo *Pontoscolex corethrurus*, possuem ainda a capacidade de sintetizar e secretar carbonato de cálcio (CaCO_3) (CANTI; PIEARCE, 2002). A produção de carbonato de cálcio amorfo (CaCO_3), ocorre em um órgão especializado das minhocas, as glândulas calcíferas (DARWIN, 1881; CANTI; PIEARCE, 2002). Nessas glândulas é formado um líquido leitoso que compreende micro esférulas amorfas de CaCO_3 . Acredita-se que essas micro-esférulas se cristalizam para formar grânulos de calcita, aragonita e valerita (GAGO-DUPORT et al., 2008; LEE et al., 2008). Os grânulos de calcita são transferidos das glândulas para o esôfago da minhoca, e a partir daí movem-se para parte final do intestino e são expulsos nos coprólitos (VERSTEEGH et al., 2017).

1.2 COMPONENTES DAS TPI'S E SUA RELAÇÃO COM AS MINHOCAS

A atividade das minhocas pode afetar a distribuição espacial e a dinâmica dos diversos componente das TPIs no solo (biochar, MO, nutrientes, cerâmica) (CUNHA et al., 2016). Além do efeito das minhocas sobre a disponibilidade dos nutrientes por alteração do pH nos coprólitos, a bioturbação das minhocas pode levar à alteração das taxas de decomposição da MO no solo. Os materiais orgânicos e carvão vegetal (por exemplo, biochar) depositados na superfície do solo podem ser incorporados no solo contribuindo para mudanças no teor de C no perfil do solo.

Sabe-se que as minhocas preferem solos com maiores teores de matéria orgânica, mas pouco se sabe sobre a relação entre as minhocas, a MO e o biochar nas TPIs amazônicas (CUNHA et al., 2016). Trabalhos inéditos realizados recentemente mostraram que as minhocas podem ser um importante componente das TPIs e que a espécie *P. corethrurus* representou 42 % de todos os indivíduos coletados (CUNHA et al., 2016). *P. corethrurus* é uma espécie amplamente encontrada em solos alterados pelo homem, que apresentam acúmulo de nutrientes e carbono orgânico proveniente de desmatamento e queimadas (MARICHAL et al., 2010). A espécie é conhecida por ingerir altas quantidades de carvão, e colonizar rapidamente áreas desmatadas (Topoliantz e Ponge, 2003, Marichal et al., 2010). Consequentemente esta espécie pode ser colonizadora preferencial em solos de TPI, e suas relações com as propriedades e processos do solo merecem atenção (PONGE et al., 2006).

O biochar é formado pela combustão incompleta de materiais orgânicos, na ausência total ou parcial de oxigênio (CHENG et al., 2006). É utilizado como

condicionador de solos, com o propósito de melhorar as propriedades físicas e químicas, além de mitigar as mudanças climáticas, através do sequestro de carbono (LEHMANN, 2007).

Quando aplicado ao solo, o biochar degrada lentamente, aumentando o carbono orgânico, a capacidade de troca de cátions e a retenção de água (YANAI et al., 2007), permitindo que os nutrientes fiquem retidos no solo e disponíveis para a absorção das plantas (SCHULZ; GLASER, 2012). Porém dependendo da matéria-prima utilizada e das condições de pirólise o biochar pode conter elementos potencialmente tóxicos para os animais, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (SPOKAS et al., 2012 e OLESZCZUK et al., 2013). Os HPA são compostos orgânicos que apresentam dois ou mais anéis aromáticos condensados em suas estruturas. São compostos altamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos que representam ameaça aos ecossistemas (LIANG et al., 2010). A presença destes hidrocarbonetos no biochar pode representar um risco potencial à qualidade biológica dos solos. O efeito destes pode ser avaliado através de testes ecotoxicológicos. Nesses testes, é possível avaliar a toxicidade aguda ou crônica de substâncias contaminantes sobre o ambiente, em função das respostas do organismo exposto (CLASIN; PEDROZO, 2004), observando os efeitos letais, morfológicos, comportamentais, fisiológicos, citogenéticos, bioquímicos e moleculares (NEUHAUSER et al., 1985). O efeito agudo de um agente tóxico sobre o organismo teste é observado em um curto período de tempo, através da letalidade, mas outras manifestações podem ser apresentadas como diminuição na mobilidade e alterações nos aspectos biométricos relativos ao peso e crescimento (FERREIRA, 2007). O organismo teste é exposto a uma matriz contaminada, com o objetivo de analisar se a contaminação é alta o suficiente para causar efeitos adversos sobre seu crescimento, sobrevivência, morfologia, metabolismo e comportamento (LIMA, 2009).

Uma das características que definem as TPI's são a grande quantidade de fragmento de cerâmica encontrados na superfície ou no perfil dos horizontes antrópicos (COSTA et al., 2009). Esses fragmentos são importantes para aumentar a capacidade de retenção de água nos solos devida sua alta porosidade, o que poderia interferir na população e atividade da biota edáfica, incluindo as minhocas. Sabe-se que as minhocas tem preferência por superfícies compactas (por exemplo, pedras) dentro de ambientes com macroporosidade, possivelmente devido a maior proteção que esses ambientes proporcionam. Contudo, não existem estudos sobre a interação dos fragmentos de cerâmica com a fauna do solo.

Dentro deste contexto, o presente estudo teve por objetivo geral avaliar a relação das minhocas *Pontoscolex corethrurus* com as TPIs e seus componentes e o efeito resultante sobre a fertilidade do solo. Numa série de experimentos em laboratório e casa de vegetação avaliou-se tanto os aspectos positivos como os negativos dessa relação. Em laboratório foram realizados testes para verificar o efeito de doses de biochar sobre as minhocas, através de um teste ecotoxicológico usando *P. corethrurus* como bioindicador (Capítulo 1), assim como a adição de Ca e P sobre as populações de minhocas em cultivo e a qualidade dos coprólitos produzidos (Capítulo 2). Finalmente, em casa de vegetação avaliou-se o efeito da interação das minhocas com os componentes das TPIs (biochar, cerâmica, matéria orgânica e fonte de fósforo/cálcio) na fertilidade do solo e na produção vegetal usando milho como planta modelo (Capítulo 3).

REFERÊNCIAS

- 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 Soil Biology**, v. 36, p. 177–198, 2000.
- CANTI, M.G.; PIEARCE, T.G. Morphology and dynamics of calcium carbonate granules produced by different earthworm species. **Pedobiologia**, v. 47, p. 511–521, 2002.
- CHENG, C.H.; LEHMANN, J.; THIES, J.E.; BURTON, S.D.; ENGELHARD, M.H. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. **Organic Geochemistry**, v. 37, p. 1477-1488, 2006.
- CLASIN, A.A.M.; PEDROZO, M.F.M. O estudo da toxicologia. *In*: Azevedo FA & Clasin AAM **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. (Eds.) Rima/InterTox, São Carlos/São Paulo, 2004, p. 340.
- CUNHA, L.; BROWN, G.G.; STANTON, D.W.G.; DA SILVA, E.; HANSEL, F.A.; JORGE, G.; MCKEY, D.; VIDAL-TORRADO, P.; MACEDO, R.S.; VELASQUEZ, E.; JAMES, S.W.; LAVELLE, P.; KILLE, P.; the Terra Preta de Indio Network. Soil Animals and Pedogenesis: The Role of Earthworms in Anthropogenic Soils. **Soil Science**, v. 181,110–125, 2016.
- DARWIN, C. The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. Murray, London. (1881)

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N.B. A fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia central. *In*: TEIXEIRA, W. G., KERN, D. C., MADARI, B. E., LIMA, H. N., WOODS, W. I. (eds.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009, p. 285-296.

GAGO-DUPORT, L.; BRIONES, M.J.I.; RODRÍGUEZ, J.B.; COVELO, B. Amorphous calcium carbonate biomineralization in the earthworm's calciferous gland: Pathways to the formation of crystalline phases. **Journal of Structural Biology**, v. 162, 422–435, 2008.

GLASER, B.; BIRK, J.J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (Terra Preta de Índio). **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 82, 39–51, 2012.

LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biol. Fertil. Soils**, v. 3, p. 237-251, 1988.

LAVELLE, P.; CHAUVEL, A.; FRAGOSO, C. Faunal activity in acid soils. *In*: Date RA, Grundon NJ, Rayment GE, Probert ME, editors. **Plant–Soil Interactions at Low pH: Principles and Management**. 1st ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 201-211, 1995.

LEE, K.A. Earthworms: Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use. Academic Press, Sydney, 1985.

LEHMANN, J. Bio-energy in the black. **Ecology Environment**, v. 5, p. 381-387, 2007.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, v. 41, 206–213, 2010.

MARICHAL, R.; MARTINEZ, A.F.; PRAXEDES, C., RUIZ, D.; CARVAJAL, A.F.; OSZWALD, J.; DEL PILAR HURTADO, M.; BROWN, G.G.; GRIMALDI, M.; DESJARDINS, T.; SARRAZIN, M.; DECAËNS, T.; VELASQUEZ, E., LAVELLE, P. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 443–449, 2010.

OLESZCZUK, P.; JOSKO, I.; KUSMIERZ, M. Biochar properties regarding to contaminants content and ecotoxicological assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 375-382, 2013.

PONGE, J.F.; TOPOLIANTZ, S.; BALLOF, S. Ingestion of charcoal by the Amazonian earthworm *Pontoscolex corethrurus*: a potential for tropical soil fertility, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2008–2009, 2006.

SCHULZ, H.; GLASER, B. Effects of biochar compared to organic and inorganic fertilizers on soil quality and plant growth in a greenhouse experiment. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 1, p. 13, 2012.

SPOKAS, A.; BAKER, M.; REICOSKY, C. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. **Plant Soil**, v. 333, p. 443-452, 2012.

TOPOLIANTZ, S.; PONGE, J.F. Burrowing activity of the geophagous earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) in the presence of charcoal. **Appl. Soil Ecol.**, v. 23, p. 267–271, 2003.

VERSTEEGH, E.A.A.; BLACK, S.; HODSON, M.E. Carbon isotope fractionation between amorphous calcium carbonate and calcite in earthworm-produced calcium carbonate. **Applied Geochemistry**, v. 78, p. 351-356, 2017.

YANAI, Y.; TOYOTA, K.; OKAZAKI, M. Effects of charcoal addition on N₂O emissions from soil resulting from rewetting air-dried soil in short-term laboratory experiments. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.53, p.181-188, 2007.

2 CAPÍTULO I: INTERAÇÃO ENTRE BIOCHAR E MINHOCAS *Pontoscolex corethrurus* UMA VISÃO BIOQUÍMICA E MICROSCÓPICA

2.1 RESUMO

As Terras Pretas de Índio são solos antrópicos que apresentam grandes estoques de matéria orgânica estável e elevados níveis de nutrientes. Sua matéria orgânica é composta por substâncias húmicas aromáticas, sugerindo a incorporação de resíduos de combustão incompleta da biomassa (i.e. biochar). Nesses solos o biochar pode ser ingerido por oligoquetas terrestres potencialmente afetando as suas propriedades químicas e morfológicas. Nesse trabalho, o objetivo foi de verificar os efeitos potenciais da interação entre as minhocas e o biochar, através da técnica de pirólise acoplado a espectrometria de massa e microscopia eletrônica de varredura. Foram identificados 102 compostos produzidos via pirólise. Pela análise de componentes principais foram escolhidos nove compostos biomarcadores do biochar, sendo que quatro destes compostos (i.e. bifenil, C1-guaiacol, C2-guaiacol e naftaleno) indicaram ingestão de biochar de forma seletiva ou acidental. Após ingestão pelas minhocas foram constatadas alterações na composição química, como teores acentuados de lignina, alterações morfológicas e evidência de atividade microbiana no biochar. Com base em nossos resultados a minhoca peregrina *P. corethrurus* tem o potencial para transformar biochar nos solos, alterando as características físicas, químicas e microbianas do biochar e influenciando a gênese das Terras Pretas de Índio.

Palavras-chave: bioturbação, Terra Preta de Índio, compostos aromáticos.

2.2 ABSTRACT

The Amazonian Dark Earth are anthropic soils with large stocks of stable organic matter and high nutrient contents. Its organic matter is composed of aromatic humic substances, suggesting the incorporation of residues from incomplete combustion of biomass (i.e. biochar). In these soils, the biochar can be ingested by terrestrial oligochaetes potentially affecting its chemical and morphological properties. In this study, we aimed to verify the potential effects of the interaction between earthworms and biochar, using pyrolysis coupled with mass spectrometry and scanning electron microscopy. A total of 102 compounds produced via pyrolysis were identified. Using principle components analysis, nine biochar biomarker compounds were chosen, four of which (i.e. biphenyl, C1-guaiacol, C2-guaiacol and naphthalene) indicated selective or accidental ingestion by earthworms. After earthworm ingestion, changes in chemical composition were observed, such as marked levels of lignin, morphological changes and evidence of microbial activity. Based on our results, the peregrine earthworm species *P. corethrurus* has the potential to transform biochar in soils, changing the physical, chemical and microbial characteristics of the biochar and influencing the genesis of Amazonian Dark Earths.

Keywords: bioturbation, Amazonian Dark Earth, aromatic compounds.

2.3 INTRODUÇÃO

As Terras Pretas de Índio (TPI) são solos caracterizados por um alto teor de nutrientes (especialmente P e Ca) e matéria orgânica (MO), e foram formados pela deposição contínua de materiais orgânicos (resíduos orgânicos vegetais, animais e carvão) e inorgânicos (cerâmica), adicionados pela atividade de comunidades indígenas ao longo do tempo (GLASER; BIRK, 2012). Sua matéria orgânica é composta por substâncias húmicas altamente aromáticas, sugerindo a incorporação de resíduos da combustão incompleta (biochar) o que é um fator chave para recalcitrância desses solos (GLASER et al., 2001).

A origem da fertilidade das TPIs tem sido atribuída em partes à incorporação do biochar ao solo mineral gerando húmus estável (GLASER et al., 1998). Estudos recentes com adição de biochar em solos mostraram sua capacidade de aumentar as cargas negativas do solo (BENITES et al., 2009; CUNHA et al., 2009; GLASER et al., 2002; LIANG et al., 2010), e o uso do biochar na agricultura tem sido intensamente discutido (GASKIN et al., 2010; LEHMANN, 2007; LEHMANN; JOSEPH, 2009; MAJOR et al., 2010; MASULILI et al., 2010), podendo ser importante para o melhoramento do solo e o desenvolvimento de uma agricultura sustentável nos trópicos (GLASER et al., 2001).

Nos solos antropogênicos da Amazônia o biochar foi incorporado via bioturbação e processado ao longo dos anos por ações químicas e biológicas. A fauna do solo (e.g., minhocas), inclui importantes engenheiros edáficos, que através da bioturbação movem as partículas do solo dentro e entre os horizontes, misturando frações orgânicas e inorgânicas, alterando a porosidade, aeração e infiltração de água (BLOUIN et al., 2013).

A bioturbação pode ser frequentemente observada nos perfis das TPIs, onde ocorre a sobreposição dos horizontes Au antrópicos escuros aos horizontes Bt de coloração mais clara (MACEDO, 2014), devido a incorporação da matéria orgânica e pequenos pedaços de carvão ao solo. Em trabalho publicado por Topoliantz e Ponge (2003), foi demonstrado experimentalmente que as minhocas da espécie *Pontoscolex corethrurus* ingerem pequenas partículas de carvão pirogênico juntamente com solo mineral e posteriormente depositam seus coprólitos escuros em diferentes profundidades do solo. Além disso, as minhocas possuem a capacidade de influenciar nas propriedades químicas do solo (PASHANASI et al., 1992; BAROIS et al., 1999;

BARTZ et al., 2010), devido às transformações que ocorrem durante e após a passagem pelo seu trato intestinal.

O intestino da minhoca é um ponto de acesso para uma grande variedade de microrganismos envolvidos em inúmeros processos bioquímicos com potencial para alterar a fertilidade do solo (VAN GROENIGEN et al., 2019). As minhocas fragmentam e homogeneizam o material ingerido através da ação muscular, adicionando muco e enzimas, aumentando assim a área de superfície para a ação microbiana (BAROIS; LAVELLE, 1986, BAROIS et al., 1993). Portanto, esses organismos podem ter grande influência sobre a gênese e as características dos solos de TPI através da ingestão e incorporação do biochar em seus coprólitos, podendo alterar a estabilidade e seu funcionamento (CUNHA et al., 2016).

Apesar dos trabalhos sobre a interação do biochar com a fauna do solo, especialmente minhocas (WEYERS; SPOKAS, 2011), poucos estudos avaliaram os coprólitos das minhocas após a ingestão do carbono pirolisado (ECKMEIER et al., 2007). Esse tipo de avaliação é fundamental para identificar a interação entre as minhocas e os microrganismos e os efeitos nas propriedades e qualidade do biochar após a passagem pelo trato intestinal. Na análise de solo e biochar, a técnica de pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas (Pi-CG-EM) apresenta-se como uma excelente alternativa. Nessa análise, as macromoléculas dos compostos são clivadas, em produtos de baixo peso molecular, mantendo informações estruturais suficientes para a caracterização das macromoléculas originais (e.g. lignina e celulose).

Portanto, conduzimos um estudo em condições de laboratório, dividido em três etapas, visando avaliar a toxicidade do biochar, caracterizar as macromoléculas do solo e coprólitos por Pi-CG-EM, e caracterizar o biochar usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As hipóteses que orientaram o estudo foram: (i) as minhocas ingerem biochar; (ii) o biochar ingerido é transformado química e/ou biologicamente pelas minhocas, e (iii) a técnicas de Pi-CG-EM é uma ferramenta útil na detecção de biochar em solos e de sua transformação após a passagem pelo trato intestinal das minhocas.

2.4 MATERIAL E METODOS

2.4.1 PREPARO DO BIOCHAR E DO SOLO ARTIFICIAL

O biochar foi produzido a partir do ouriço da castanha do Pará, pirolisado em um reator de pirólise vertical de aço inox a 350 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto, com tempo de pirólise total de quatro horas e meia.

O experimento foi conduzido em solo artificial (SA) com formulação baseada no protocolo internacional (OECD, 1984), que apresenta composição de 70% de areia fina, 20% de argila branca (caulim), e 10% de esfagno (*Sphagnum* sp.). Os materiais foram misturados até a completa homogeneização, com ajuste de pH para $6,0 \pm 0,5$ utilizando carbonato de cálcio e a umidade corrigida para 40-60% da capacidade de retenção de água com água deionizada.

2.4.2 SELEÇÃO E COLETA DAS MINHOCAS

Todas as minhocas utilizadas nos ensaios toxicológicos foram indivíduos adultos (clitelados) de *P. corethrurus* coletados na área experimental da Embrapa Florestas em Colombo, PR. Após a coleta os animais foram mantidos no SA em condições de laboratório, a 22 °C para aclimação dos mesmos por pelo menos uma semana. Esses animais pertencem todos a uma única linhagem de *P. corethrurus* (L1 de TAHERI et al., 2018), considerada por James et al. (2019) com sendo iguais ao neótipo da espécie original.

2.4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda foi baseado na Organization for Economic Co-operation and Development - Guia para testes químicos nº 207 (OECD, 1984), usando SA. No ensaio foi avaliada a mortalidade e biomassa das minhocas expostas as diferentes doses de biochar (0%, 2.5%, 5% e 10% v/v), acrescidas ao SA. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos, com cinco repetições. O ensaio foi realizado usando 250 gramas do SA misturados com as diferentes doses de biochar em recipientes plásticos do tipo gerbox, ajustando-se a umidade do substrato para 40-60% da capacidade de campo. Em cada unidade experimental foram colocadas cinco minhocas adultas. Os recipientes foram acondicionados em incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 28 dias,

com temperatura constante de 20 °C. A pesagem e contagem das minhocas sobreviventes foi realizada a 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a instalação do experimento. Foi preparado 1 L de uma solução com 25 g de frutose e glicose com adição de 2.4 ml do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Essa solução foi adicionada ao solo artificial até atingir 60% da capacidade de retenção de água. Esses açúcares e nutrientes foram usados ao invés do esterco animal (padrão), porque não interfeririam na análise bioquímica do biochar e do esfagno.

Os dados da biomassa das minhocas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey adotando-se o nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas usando o software Sisvar (FERREIRA, 2000).

2.4.4 ANÁLISE MACROMOLECULAR BIOQUÍMICA

Os coprólitos de *P. corethrurus* foram coletados a cada dois dias, após a instalação do experimento, e armazenados a -20 °C. As duas primeiras coletas de coprólitos foram descartadas, por se tratar do expurgo do solo original.

Considerando a falta de toxicidade dos SAs, a caracterização química das amostras foi realizada apenas nos SAs com 10% v/v de biochar. No experimento de interação foi realizada a caracterização por Pi-CG-EM das amostras de SA, coprólito de minhoca (C), coprólito de minhocas presentes no tratamento com adição de 10% (v/v) de biochar (CB10), solo artificial com presença de minhocas (SAW), solo artificial com adição de biochar 10%(v/v) (SB10) e solo artificial com biochar (10% v/v) na presença de minhocas (SWB10).

Os materiais analisados (coprólitos, SA, biochar e esfagno) foram secos em liofilizador e extraídos com diclorometano:metanol (2:1) para remoção dos compostos livres solúveis, e cerca de 0.75 mg de material sólido foi caracterizado por Pi-CG-EM. A pirólise (Py) foi realizada a 700 °C por 20 s, sendo o filamento aquecido a 10°C ms⁻¹, com temperatura do forno e linha de transferência a 280 °C. Os compostos pirolisados foram inseridos on-line em um cromatógrafo gasoso com o injetor a 230 °C e divisão de fluxo de 1:50, sendo esses separados usando uma coluna capilar DB-5 ms (30 m × 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm) com a seguinte programação de forno: 40 °C (mantido por 5 min), com taxa de aquecimento de 7 °C min⁻¹ até 280 °C (mantido por 5 min). O hélio foi usado como gás de arraste (1,0 ml min⁻¹). A interface GC-MS e as

temperaturas da fonte de íons foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. O espectrômetro de massa foi operado no modo eletrônico de impacto positivo a 70 eV, o tempo total de varredura foi de 0,58 s para a faixa de m/z 50-650 e emissão corrente de 250 mA.

Os cromatogramas das correntes totais de íons foram deconvoluídos utilizando o software AMDIS (NIST). Alcanos lineares produtos de pirólise de polietileno foram utilizados para a calibração do índice de retenção (IR, MELO et al., 2018). Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa deconvoluídos usando uma biblioteca de espectros de massas confeccionada no software AMDIS a partir de produtos pirolisados de diferentes biomassas (MELO et al., 2018). Os produtos obtidos da Pi-GC-MS foram quantificados através da razão da altura do pico de cada composto (m/z específico) pela altura total dos picos detectados.

$$Q_{ij} = (x_{ij} / \sum x_i) * 100$$

Onde: x_{ij} é a altura integrada para o composto j na amostra i , $\sum x_i$ é a soma de todas as alturas integradas para os compostos detectados na amostra i , e Q_{ij} é a quantificação relativa do composto j na amostra i . Somente compostos com respostas relativas acima de 0,1% foram analisados.

Em casos em que os compostos foram detectados em pelo menos 60% dentro de uma amostra, os faltantes foram substituídos pela média desses e quando ao contrário (<60%), esses foram substituídos pela raiz quadrada do valor do limite de detecção dividido por 2. Os dados foram transformados para CLR ('centered log ratio') para as análises multivariadas. Nas análises individuais as variáveis (compostos) foram testadas estatisticamente ($n=5$) usando software R studio, com os seguintes pacotes: stats, open.xlsx, multcomp, lattice, agricolae, hnp e effects (R core team, 2016). As variáveis foram classificadas quanto a distribuição LM (normal), GLM (modelos lineares generalizados, família gama) ou NP (não-paramétricas). As variáveis LM e GLM foram analisadas por ANOVA com teste F ($p > 0,05$), e teste CHISQ ($p < 0,05$), respectivamente. Por fim, as variáveis NP foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As comparações foram realizadas pelos testes post hoc de Tukey (LM e GLM) e Fisher (NP), a um nível de 5% de probabilidade.

2.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de biochar coletadas antes e após passagem pelo trato intestinal das minhocas (nos coprólitos) foram montadas sobre stubes e recobertas com ouro, em um sistema de pulverização no equipamento da marca Balzers MED 010, com tempo de exposição de 180 segundos e corrente de 50mA. Posteriormente os stubs foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura da marca LEO Evo 40, no laboratório de microscopia da Embrapa Instrumentação Agropecuária em São Carlos-SP.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Ao longo dos 28 dias não foi verificada mortalidade nem redução significativa no peso médio das minhocas (Tabela 1), evidenciando que até a maior dose de biochar (10% v/v) não houve toxicidade do biochar às minhocas *P. corethrurus*.

TABELA 1. BIOMASSA MÉDIA (G) DE MINHOCAS (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) EXPOSTAS A SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE BIOCHAR DO OURIÇO DA CASTANHA DO PARÁ DURANTE UM PERÍODO DE 28 DIAS, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.

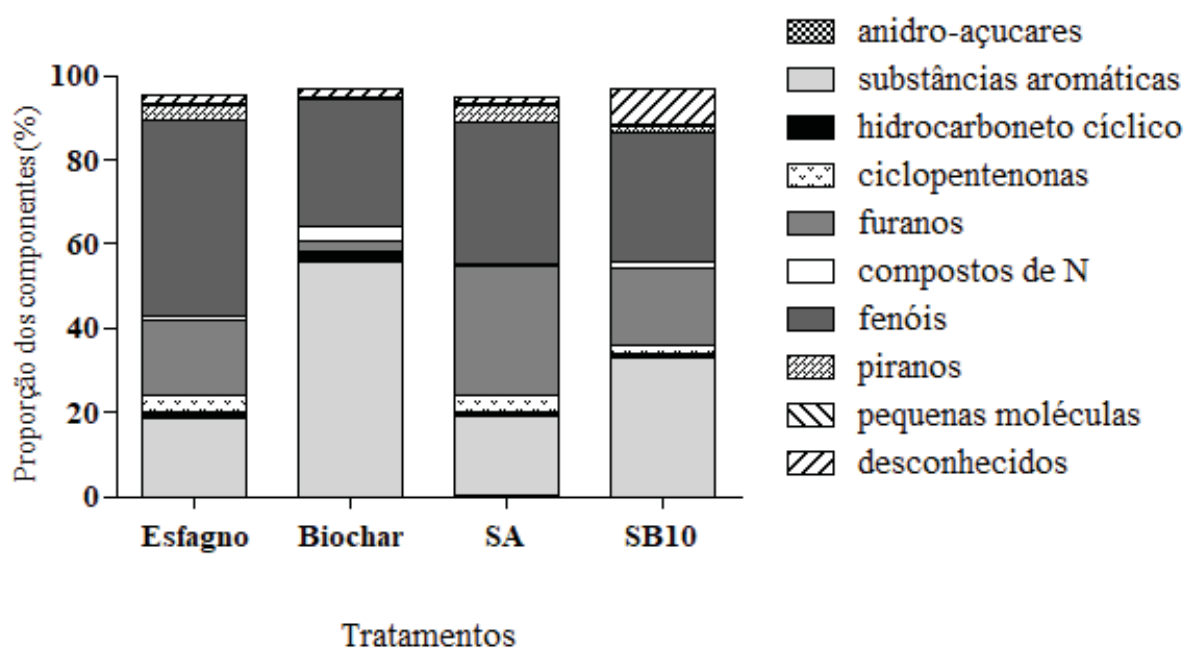
Doses %(v/v)	Dias				
	0	7	14	21	28
0,0	0,511±0.10 ^{ns}	0,464±0.11	0,435±0.12	0,429±0.13	0,384±0.11
2,5	0,393±0.05	0,423±0.08	0,386±0.06	0,389±0.09	0,345±0.08
5,0	0,503±0.20	0,453±0.10	0,425±0.15	0,410±0.04	0,349±0.06
10,0	0,369±0.06	0,431±0.05	0,416±0.08	0,429±0.06	0,393±0.06

2.5.2 Pi-CG-EM NA DETECÇÃO DE BIOCHAR EM SOLO ARTIFICIAL

Na caracterização de amostras de biochar, esfagno, solo artificial (SA) e solo artificial com adição de biochar na dose de 10% (v/v) (SB10) foram encontrados 102 compostos produzidos via pirólise, que podem ser classificados em 9 classes químicas conhecidas: (1) anidro-açúcares, (2) substâncias aromáticas, (3) hidrocarboneto cíclico,

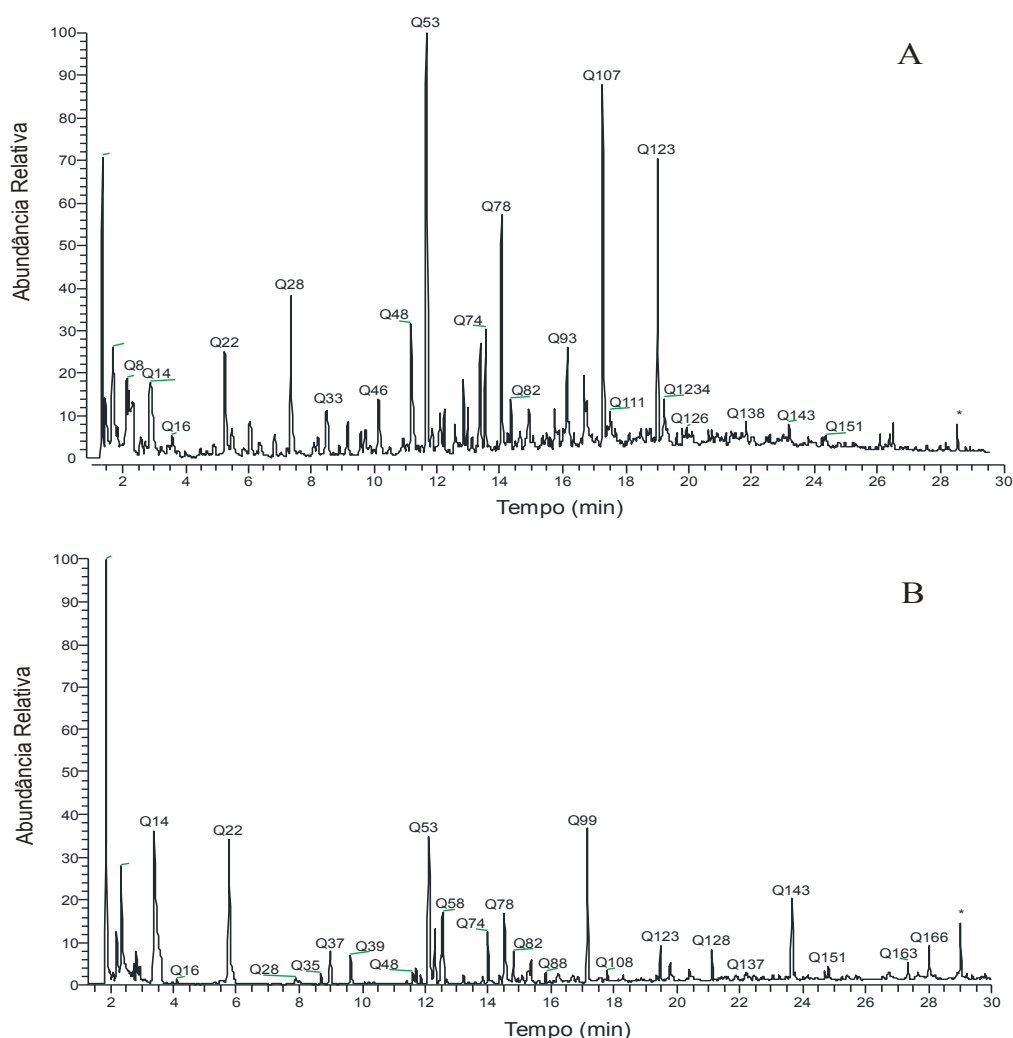
(4) ciclopentanonas, (5) furanos, (6) compostos nitrogenados, (7) fenóis, (8) piranos e (9) pequenas moléculas (Figura 1). As amostras mostraram diferentes distribuições em relação às classes: no esfagno, a principal classe observada foi o fenol bem como no SA, com valores correspondente de 46,8% e 33,4%, diferindo do biochar (30,4%) e do SB10 (30,9%) (Figura 1).

FIGURA 1. PROPORÇÃO DOS COMPONENTES NAS AMOSTRAS DE ESFAGNO, BIOCHAR, SOLO ARTIFICIAL (SA), SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE BIOCHAR 10%(V/V) (SB10).



Os pirogramas das amostras de esfagno e biochar apresentam alguns dos compostos presentes (Figura 2). Os mais abundantes no esfagno foram: furfural (Q28), fenol (Q53), C1-fenol (Q78), 4- isopropenilfenol (Q122) e 4-vinilfenol (107). No biochar predominaram os compostos aromáticos como benzeno (Q14), tolueno (Q22) e naftaleno (Q99), originários da biomassa carbonizada (Kaal et al., 2012). Nas amostras de SA e SB10 os produtos da pirólise mais abundantes foram o furfural, phenol e o 5-methyl-2-furaldehyde, com uma maior abundância de 5-methyl-2-furaldehyde (em SB10), possuindo uma semelhança com as amostras de esfagno.

FIGURA 2. PIROGRAMAS DAS CORRENTES TOTAIS DE ÍONS (CTI) PARCIAIS DAS AMOSTRAS DE ESFAGNO (A) E BIOCHAR (B). NÚMEROS ACIMA REFEREM-SE: Q8 (2,3 - BUTANEDIONA), Q14 (BENZENO), Q16 (2,5 - DIMETIL - FURANO), Q22 (TOLUENO), Q28 (FURFURAL), Q33 (C2 - BENZENE), Q35 (C3 - FURANO), Q37 (ACETOXIACETONA), Q39 (1,3,5,7 - CICLOOCTATETRAENO), Q46 (C2 - CICLOPENTANONE), Q48 (5-METIL-2-FURALDEÍDE), Q53 (FENOL), Q58 (BENZOFURANO), Q74 (C1-FENOL_I1), Q78 (C1-FENOL_I3), Q82 (GUAIACOL), Q88 (C2-PHENOL_I2), Q93 (C2-PHENOL_I5), Q99 (NAFTALENO), Q107 (4-VINILFENOL), Q108 (C2 - BENZOFURANO_I2), Q111 (5-HIDROXIMETILFURFURAL), Q123 (C1 - NAFTALENO), Q124 (4-VINILGUAIACOL), Q126 (SERINGOL), Q128 (BIFENIL), Q137 (C1 - SERINGOL), Q138 (ISOEUGENOL (TRANS)), Q143 (DIBENZOFURANO), Q151 (FLUORENO), Q163 (9 (H) - FLUOREN - 9 - ONA), Q166 (FENATRENO), * (PLASTIFICANTE).



No esfagno os fenólicos produzidos via pirólise são constituintes de uma macroestrutura (pseudo-lignina) caracterizada principalmente pelos seguintes monômeros: C2-fenóis, 4-vinil-fenol e 4-isopropenilfenol, com uma menor contribuição do guaiacol (NAUMOVA et al., 2013, Figura 2). O 4-isopropilfenol foi

detectado devido à presença da razão massa carga (m/z 134), sendo esse um bioindicador do esfagno (HALMA et al., 1984, BOON et al., 1986, VAN SMEERDIJK; BOON, 1987). Na amostra de biochar estiveram presentes as principais unidades derivadas da degradação da lignina, compostas principalmente de C1-guaiacol, C1-syringol, C2-guaiacol, indicando a preservação de parte da lignina do ouriço da castanha do Pará no biochar (DEL RÍO et al., 2005; ROWELL, 2005). Essa preservação ocorre uma vez que a temperatura no processo de pirólise na formação do biochar foi baixa (350 °C) (KAAL et al., 2012).

O aumento nas contribuições relativas de benzeno, tolueno, naftaleno, benzofurano e benzonitrila nas amostras de biochar se deve a pirólise da parte aromatizada (KAAL; RUMPEL, 2009), gerando um produto enriquecido nesses hidrocarbonetos aromáticos (DE LA ROSA, 2007). A presença de aromáticos nas amostras de biochar (55,6%) é indicativo da sua aromatização, e a abundância desses produtos na amostra SB10 pode ser um indicativo da presença do biochar. Por exemplo, na amostra SB10 há um aumento na abundância de produtos da classe aromática (32,8%) com relação ao esfagno (18,9%) e SA com (19,1%, Figura 1). Assim como a benzonitrila, outros produtos aromáticos contendo nitrogênio foram identificados, como o (E)-cinamonitrila, indol e C1-indol_I1. Esses compostos aromáticos contendo nitrogênio estão presentes em estruturas carbonizadas seguindo a mesma tendência dos hidrocarbonetos aromáticos (KAAL et al., 2012), podendo ser indicativo para biochar no SB10, sendo que a quantidade de composto nitrogenados foram maiores no biochar (3,2%) que no SB10 (1,2%, Figura 1).

Os carboidratos (e.g. celulose e hemicelulose) estiveram representados pelas classes anidro-açúcar, ciclopentanona, pirano e furano (Figura 1). O 4-hidroxi-5,6-diidro-(2H)-piran-2-ona é um importante marcador de hemicelulose contendo xilose, importante nas ligações cruzadas entre microfibras de celulose e a macromolécula de lignina (POUWELS et al., 1989). Os anidro-açúcares foram detectados em quantidades muito pequenas, podendo estar relacionados à presença de celulose nas amostras (POLETTO et al., 2012). Essa baixa quantidade pode estar relacionada também a uma mudança na impressão digital desses carboidratos após pirólise, sendo convertido em furano através da eliminação de uma molécula de água para formar moléculas menores como os furanos (CORDELLA et al., 2012). Os valores mais elevados de furano estavam presentes nas amostras de SA (30,9%), SB10 (18,4%) e esfagno (17,9%, Figura

1). Em relação às ciclopentanonas, estas estiveram presentes em maiores quantidades no esfagno e no SA, (ambos com 4,0%), seguido do SB10 (1,9%). A presença do composto nessas amostras pode estar relacionada ao arranjo anatômico das fibras de hemiceluloses e celulose presentes no esfagno. Já no biochar, não foi detectada a presença desta classe, provavelmente devido à maior suscetibilidade a degradação das fibras do ouriço da castanha do Pará durante a produção do biochar, produzindo menos ciclopentanonas na caracterização via pirólise.

Os compostos produzidos via pirólise e que possuem valores de correlação acima de 0,7 são importantes componentes na separação das amostras e consequentemente modelados pela ACP (Figura 3). Dessa forma, esses compostos foram estudados individualmente buscando identificar sua capacidade de atuar como biomarcadores das fontes de matéria orgânica de interesse fornecidas às minhocas no experimento (esfagno e biochar). Para tanto, verificamos via análise estatística univariada os compostos produzidos via pirólise significativos na diferenciação do biochar e do esfagno, e nesse último aqueles que seriam importantes na distinção entre ele e os solos com e sem biochar (SB10 e SA, respectivamente) (Tabela 2). Com esse critério os compostos tolueno (Q22), guaiacol (Q82) e seringol (Q126) não seriam indicadores de biochar nas amostras, assim como o composto ciclohexadiene (Q13) não poderia ser um biomarcador de esfagno. Portanto, o biochar apresenta os seguintes compostos produzidos via pirólise como característicos de sua macro-estrutura nos solos: 9(H)-fluoren-9-ona, benzeno, benzonitrila, bifenil, C1-guaiacol, C1-seringol, C2-guaiacol, dibenzofurano e naftaleno (Tabela 2).

FIGURA 3. (A) SCORES DA ACP DAS AMOSTRAS DE BIOCHAR, ESFAGNO, SOLO ARTIFICIAL (SA) E SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE 10% (V/V) DE BIOCHAR (SB10). (B) LOADINGS DE CORRELAÇÃO DOS PRODUTOS DE PIROLISE DETECTADOS NAS AMOSTRAS. Q13 (CICLOHEXADIENO), Q14 (BENZENO), Q22 (TOLUENO), Q41 (3-METIL-2-CICLOPENTAN-1-ONA), Q47 (2,3-DIIDRO-5-METIL-FURAN-2-ONA), Q55 (BENZONITRILA), Q66 (2-HIDROXI-3-METIL-2-CICLOPENTAN-1-ONA), Q69 (C3- FURANO), Q73 (D#1), Q82 (GUAIACOL), Q88 (C2-FENOL_I2), Q99 (NAFTALENO), Q101 (C1-GUAIACOL), Q107 (VINILFENOL), Q118 (C2-GUAIACOL), Q122 (4-ISOPROPENILFENOL), Q126 (SERINGOL), Q128 (BIFENIL), Q137 (C1-SERINGOL), Q143 (DIBENZOFURANO), Q163 (9 (H) - FLUOREN-9-ONA).

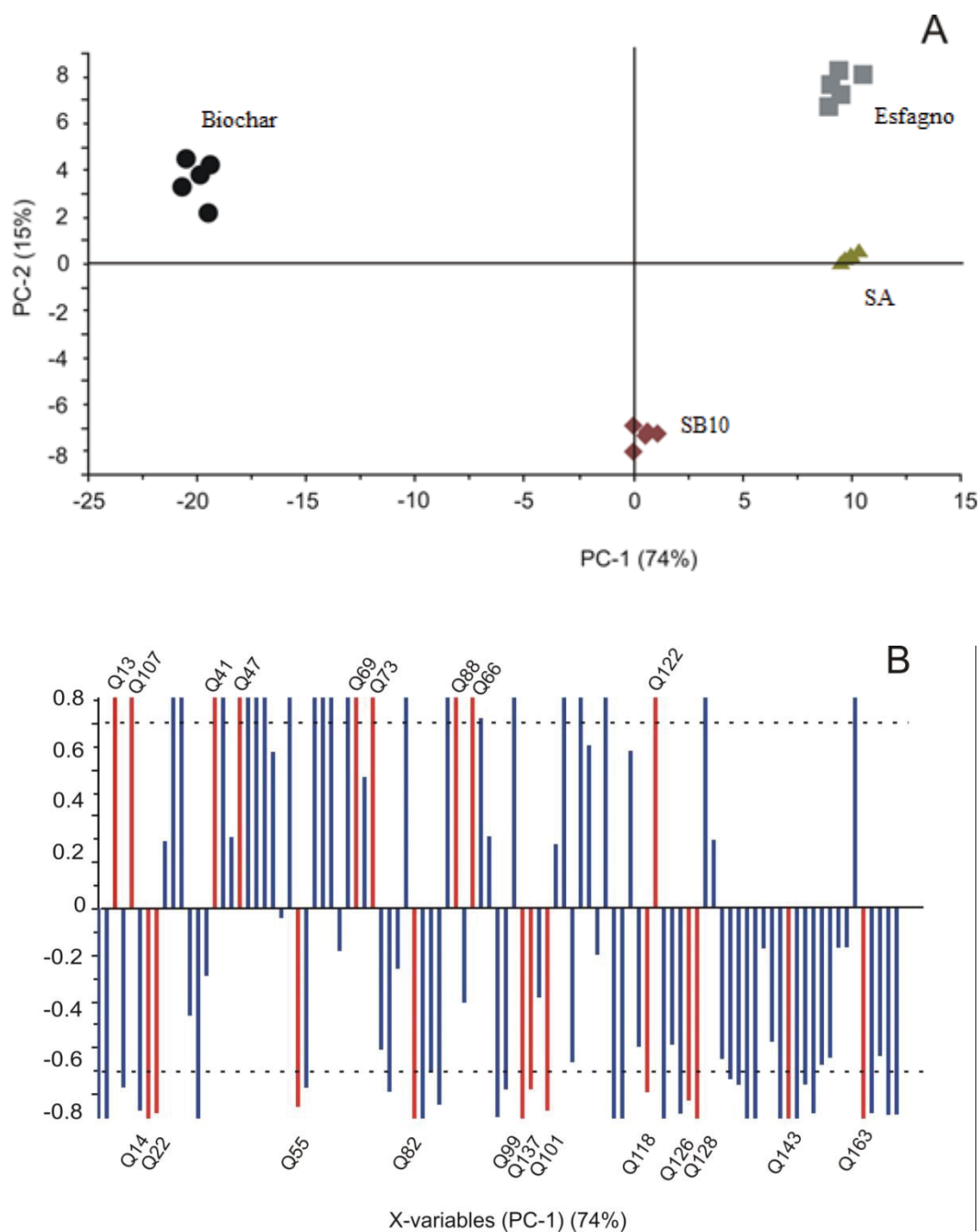


TABELA 2 ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS DIFERENTES COMPOSTOS DA PI-GC-EM DO ESFAGNO, BIOCHAR, SOLO ARTIFICIAL SEM (SA) E COM 10% (V/V) DE BIOCHAR (SB10).

RI	Substancia	Marcaador	m/z	Esfagno (%)	Biochar (%)	SA (%)	SB10 (%)
Q66	2-hidroxi-3-metil-2-ciclopentan-1-ona	Esfagno	112	1,92a	0,01d	1,25b	0,55c
Q47	2,3-dihidro-5-metil-furan-2-ona	Esfagno	98	1,43a	0,01d	1,11b	0,47c
Q41	3-metil-2-ciclopentan-1-ona	Esfagno	95	0,17a	0,01d	0,15b	0,12c
Q122	4-isopropenifenol	Esfagno	134	9,06a	0,01d	4,99b	3,15c
Q163	9(H)-fluoren-9-ona	Biochar	180	0,01c	0,78a	0,15	0,34b
Q14	benzeno	Biochar	78	2,22c	9,55a	1,82c	3,81b
Q55	885,2 benzonitrila	Biochar	103	0,11c	2,39a	0,01d	0,50b
Q128	1387,0 bifetil	Biochar	154	0,49c	1,87a	0,26	1,00b
Q101	1179,5 C1-guaiacol	Biochar	138	0,22b	1,40a	0,46c	0,30b
Q137	1443,2 C1-syringol	Biochar	168	0,01c	1,89a	0,01c	0,34b
Q118	1275,6 C2-guaiacol	Biochar	152	0,20b	0,52a	0,25	0,01c
Q88	1136,1 C2-phenol_I2	Esfagno	122	0,29a	0,01d	0,17b	0,13c
Q69	1035,6 C3-furan	Esfagno	110	0,34a	0,01d	0,25b	0,21c
Q13	674,2 ciclohexadieno	-	77	0,60bc	2,36a	0,43c	0,90b
Q143	1529,1 dibenzofurano	Biochar	168	0,36d	6,00a	0,69c	2,47b
Q82	1098,7 guaiacol	-	124	0,36b	2,33a	0,13c	0,45b
Q99	1189,4 naftaleno	Biochar	128	1,64c	13,43a	1,92	4,81b
Q73	1046,3 D#1	Esfagno	128	1,62a	0,01c	0,00	0,39c
Q126	1348,7 seringol	-	154	0,17b	2,87a	2,20	0,40b
Q22	762,6 tolueno	-	91	4,99b	9,34a	2,35	4,81b
Q107	1216,7 vinil-fenol	Esfagno	65	1,56a	0,01d	0,68b	0,38c

Valores médios seguidos de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si p<0,05.

O bioindicador esfagno 4-isopropenilfenol foi evidenciado nas amostras de SA e SB10 (Tabela 2), haja visto que esses solos foram formados pela mistura de *Sphagnum*, areia e caulim. Assim, as quantidades relativas de 4-isopropenilfenol podem ser usadas para identificar a presença de *Sphagnum* nas amostras analisadas. Outros compostos produzidos via pirólise e pertencentes as classes dos fenóis e furanos, como 2-hidroxi-3-metil-2-ciclopentan-1-ona, 2,3-dihidro-5-metil-furan-2-ona, 3-metil-2-ciclopentan-1-ona, C2-fenol_I2, C3-furano, também são indicativos do esfagno e podem ser consideradas marcadores da presença da turfa (Tabela 2).

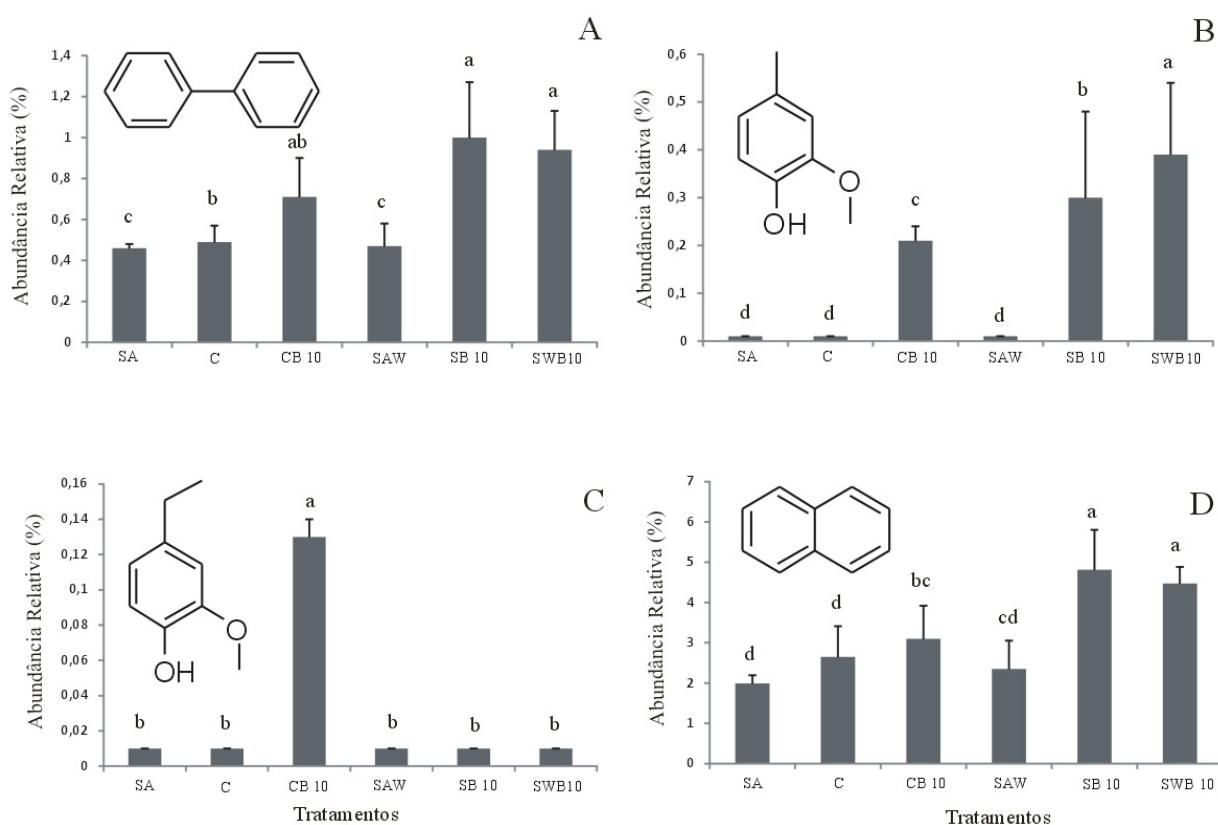
Na análise dos componentes principais (ACP) os dois primeiros eixos (CP1 e CP2) explicam 89% da variação total do conjunto de dados (Figura 3). O CP1 explicou 74% da variabilidade dos dados e permitiu separar o biochar das demais amostras, enquanto a CP2 explicou 15% da variância total dos dados, e separou o SB10 das demais amostras (Figura 3A). A ACP também identificou os componentes detectados que mais contribuíram para cada um dos eixos, descrevendo a variação nas composições das diferentes amostras. Os valores positivos em CP1, que indica os produtos da pirólise que caracterizam as amostras de esfagno e SA foram mais influenciados pelos compostos ciclohexadieno (Q13), 4-vinil-fenol (Q107), 3-metil-2-ciclopentan-1-ona (Q41), C3-furano (Q69), D#1 (Q73), C2-fenol_I2 (Q88), 2-hidroxi-3-metil-2-ciclopentan-1-ona (Q66) e 4-isopropenilfenol (Q122) (Figura 3B). Esses compostos pertencem às classes de fenol, furano e ciclopentanona. Os compostos detectados com maior abundância nas amostras de biochar, que contribuíram para a variação no eixo negativo do CP1 foram benzeno (Q14), tolueno (Q22), benzonitrila (Q55), guaiacol (Q82), naftaleno (Q99), C1-seringol (Q137), C1-guaiacol (Q101), C2-guaiacol (Q118), seringol (Q126), bifenil (Q128), dibenzofurano (Q143) e 9(H)-fluoren-9-ona (Q163) (Fig. 3B), produtos da pirólise pertencentes as classes dos aromáticos e fenóis. As amostras de SA e SB10 apresentaram maior similaridade com as amostras de esfagno (Figura 3A).

2.5.3 INTERAÇÃO ENTRE BIOCHAR E MINHOCAS *P. corethrurus*

A partir da identificação dos biomarcadores do biochar produzido via pirólise (Tabela 2), e através da análise estatística univariada verificou-se que nem todos os compostos indicadores do biochar são relevantes na diferenciação entre (C) e (CB10),

sendo que somente os compostos bifenil, C1-guaiacol, C2-guaiacol e o naftaleno são significativamente diferentes ($p < 0,05$, Figura 4).

FIGURA 4. ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS COMPOSTOS BIFENIL (A) C1-GUAIACOL (B), C2-GUAIACOL (C), E NAFTALENO (D) NAS DIFERENTES AMOSTRAS. SA (SOLO ARTIFICIAL), C (COPRÓLITO DE MINHOCAS), CB10 (COPRÓLITO DE MINHOCAS PRESENTES NO TRATAMENTO COM ADIÇÃO DE 10% (V/V) DE BIOCHAR), SAW (SOLO ARTIFICIAL COM PRESENÇA DE MINHOCAS), SB10 (SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE BIOCHAR (10% V/V), SWB10 (SOLO ARTIFICIAL COM ADIÇÃO DE 10% (V/V) DE BIOCHAR NA PRESENÇA DE MINHOCAS). LETRAS MINÚSCULAS DISTINTAS EM CIMA DAS BARRAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI $P < 0,05$.



O Bifenil e o naftaleno indicativos do biochar são compostos formados principalmente pela degradação térmica da lignina durante a pirólise da biomassa (BUGG, 2012). Na Figura 4A, é possível observar que o biomarcador bifenil está presente em maior abundância relativa nos tratamentos SB10 e SWB10, seguido do tratamento CB10. A presença desse biomarcador nos tratamentos é indicativo da adição

do biochar nesses solos SB10 e SWB10, bem como comprovação da ingestão do biochar pelas minhocas em CB10. Podemos observar também que o tratamento CB10 não diferiu estatisticamente do C, embora esse seja diferente de SB10 e SWB10, mostrando que apesar da presença do biochar, o tratamento CB tem grande similaridade com o tratamento C. O naftaleno apresentou dados semelhantes ao bifenil, no qual foi verificado que os tratamentos SB10 e SWB10 tiveram maior abundância relativa do composto (Figura 4D), corroborando com a detecção do biochar dentro das amostras. O segundo tratamento que apresentou maior abundância relativa foi o CB10 diferindo significativamente de C. Novamente, a presença desse composto no CB10 é um indicativo da ingestão de biochar pelo organismo durante o experimento. Essa ingestão também ficou evidente na coloração mais escura dos coprólitos coletados das minhocas presentes no tratamento com biochar.

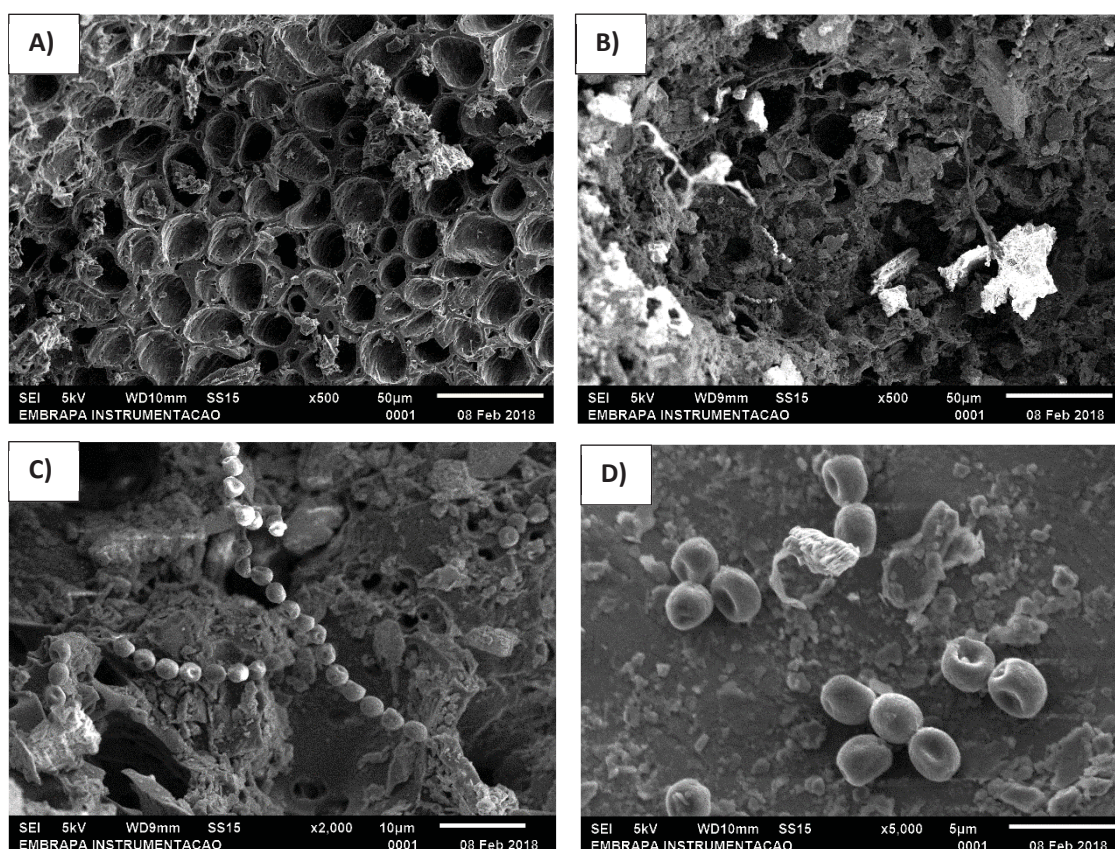
Em relação a substância C1-guaiacol, foi verificada maior abundância relativa nas amostras de SWB10, seguidas da SB10 e CB10 (Figura 4B). Nas amostras de S, C e SAW não foi detectada a presença dessa substância, que é produzida através das reações de despolimerização (fragmentação) dos constituintes das estruturas de lignina degradadas que permaneceram no biochar após tratamento térmico na sua produção (MOHAN et al., 2006; HUBER et al., 2006). Sua presença no CB10, apesar de em menor quantidade que nos tratamentos SWB10 e SB10, é mais um indicativo da ingestão do carvão pelas minhocas. Em relação ao C1-guaiacol, é interessante notar que no tratamento SWB10 (i.e. com presença de minhocas), observou-se maior abundância relativa do composto que no tratamento SB10 (i.e. sem adição do organismo). Esse resultado pode ser uma evidência da seletividade da minhoca em ingerir uma fração do biochar com menores teores de lignina.

Outro composto representante do biochar, o qual é originário da parte da lignina preservada e que apresentou diferença entre os diferentes tratamentos, foi o C2-guaiacol (Figura 4C). A maior abundância relativa foi observada no tratamento CB10, que pode estar relacionada ao efeito de concentração nos coprólitos das minhocas presentes nos solos com adição de biochar, e assim como o C1-guaiacol esse pode ser devido à incapacidade das minhocas de digerir essa substância aromática.

2.5.4 MORFOLOGIA DO BIOCHAR APÓS PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL DE minhocas *P. corethrus* (MEV)

Nas imagens geradas com auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varredura é possível ver a morfologia do biochar antes da passagem pelo trato intestinal das minhocas (Figura 5A). O biochar apresenta uma superfície altamente porosa, formada de microtubos paralelos em forma de colmeias, com alguns dos poros sendo bloqueados por partículas finas. Já após passar pelo trato intestinal das minhocas, é possível observar uma modificação estrutural na superfície porosa do biochar (Figura 5B). Essa modificação pode ser atribuída à abrasão do carvão no interior do intestino, além da ação das enzimas digestivas e atividade microbiana. Essa última foi possível observar pela presença de bactérias na superfície do biochar após passagem pelo trato intestinal (Figura 5 C e D).

FIGURA 5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM BIOCHAR DO OURIÇO DA CASTANHA DO PARÁ; A) BIOCHAR ANTES DE PASSAR PELO TRATO INTESTINAL DAS MINHOCAS *P.corethrurus*, AUMENTO DE 500X B) BIOCHAR APÓS PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL DAS MINHOCAS, AUMENTO 500X; C E D) PRESENÇA DE MICROORGANISMOS EM BIOCHAR APÓS PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL, AUMENTO DE 2000 E 5000 X;



2.6 DISCUSSÃO

As minhocas possuem a capacidade de influenciar na fertilidade dos solos, através de sua contribuição direta e indireta na criação de estruturas orgânicas, como bioporos e agregados biogênicos, afetando a mineralização microbiana da matéria orgânica, o ciclo de nutrientes (CURRY et al., 2007), e a atividade enzimática do solo (PAZ-FERREIRO et al., 2014). Isso também pode ocasionar mudanças drásticas nas comunidades microbianas dentro da drilosfera ou mesmo no solo como um todo (BROWN, 1995). No presente ensaio, as minhocas ingeriram carvão e esse, juntamente com as partículas do solo, foi misturado com o muco secretado no esôfago, submetido a abrasão na moela muscular das minhocas (HAYES, 1983), e posteriormente excretado na forma de coprólitos.

A formação dos poros de diversos diâmetros no biochar é em decorrência do processo de pirólise na sua produção. De acordo com Dehkhoda et al. (2013), o biochar apresenta uma rede extremamente complexa de poros, canais e superfície fibrosa. Grande parte da porosidade observada no biochar é decorrente da resistência das estruturas da biomassa, como paredes celulares e vasos condutores. De forma geral a decomposição térmica da celulose e hemicelulose evidenciou a permanência das paredes celulares, que são compostas também de lignina (LEE et al., 2013). A liberação de material volátil também contribuiu para diminuição de massa e formação de poros. O aumento da temperatura possibilita derretimento, fusão e quebras que modificam as estruturas originais da matéria-primas ocasionando a formação da porosidade (DOWNIE et al., 2009). Os poros presentes no biochar contribuem grandemente como habitat para a microbiota do solo, e retenção de água (MÉNDEZ et al., 2013).

A estrutura do carvão é um refúgio físico ideal para os microrganismos, em função de sua grande área superficial específica e característica porosa, alterando a atividade e estrutura da comunidade microbiana (ATKINSON et al., 2010; STEINBEISS et al., 2009; GÓMEZ et al., 2014). A passagem do biochar pelo trato intestinal das minhocas ocasionou alterações físicas em sua estrutura, provavelmente em função da abrasão do solo e biochar na moela das minhocas, além de promover a colonização microbiana do biochar. As minhocas têm efeito estimulante nas enzimas do solo, devido à produção de muco intestinal, que fornece carbono facilmente assimilável para os microrganismos, favorecendo a atividade microbiana (BROWN et al., 2000), o que pode afetar as propriedades bioquímicas e estruturais do biochar com o tempo.

Dessa forma, a minhoca peregrina *P. corethrurus* pode ser um agente de incorporação de carvão vegetal nos solos TPI, os quais após passarem pelo seu trato intestinal alteram as características físicas e microbianas do biochar, podendo influenciar na gênese das TPIs.

As minhocas são seletivas na escolha de seus alimentos (CURRY; SCHMIDT, 2007), sendo que essa escolha se baseia, entre outras coisas, nas propriedades bioquímicas do solo ingerido (NEILSON; BOAG, 2003), no tamanho (LOWE; BUTT, 2003), na idade (SATCHELL, 1967) e na população microbiana presente no solo. Em estudos de laboratório realizados por Liebeke et al. (2015), verificou-se um aumento na produção de certos metabólitos ativos no intestino das minhocas, chamadas de “drilodefensinas”, com objetivo de proteger o organismo (i.e., expelindo) dos efeitos nocivos dos alimentos com alto teor de polifenóis (por exemplo, lignina). Em nosso estudo, a maior abundância de polifenóis (C1-guaiacol e C2-guaiacol) e a ingestão do biochar pelas minhocas, pode ser um indício de que elas afetaram esse composto, permanecendo em maior abundância no solo ou quando ingeridos seriam expelidos ou acumulados em células das minhocas.

Contudo, nosso trabalho corrobora com o de Topoliantz e Ponge (2003) com relação a ingestão de biochar por *P. corethrurus* (Figura 4). No entanto, parecem não dar preferência à ingestão do biochar, pois somente 4 dos 9 biomarcadores de biochar foram detectados em seus coprólitos (Figura 4). A ingestão de biochar pode ser acidental, mas também pode estar associada a uma ingestão seletiva em busca de um incremento em sua dieta. O biochar após a passagem pelo trato intestinal possui características químicas diferentes daquele não ingerido: a fração do biochar contendo lignina é concentrada no biochar, uma vez que os compostos fenólicos (i.e. C1-e C2-guaiacol) possuem diferenças bem maiores do que aqueles que indicam a fração aromatizada do biochar (i.e. naftaleno e bifenil).

O biochar pode conter elementos potencialmente tóxicos para os animais, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (SPOKAS et al., 2012; OLESZCZUK et al., 2013), compostos orgânicos que apresentam dois ou mais anéis aromáticos condensados em suas estruturas e que são altamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (LIANG et al., 2010). A presença destes hidrocarbonetos no biochar pode representar um risco potencial à qualidade biológica dos solos. Contudo, a presença desses no biochar de ouriço da castanha de Pará não está em níveis tóxicos para as minhocas *P. corethrurus*.

2.7 CONCLUSÃO

O biochar não apresentou toxicidade para as minhocas mesmo na maior dose. A técnica de pirólise acoplado à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas (Pi-CG-EM) se mostrou ferramenta eficiente na detecção de biochar nos solos artificiais estudados. Os compostos bifenil, C1-guaicol, C2-guaiacol e naftaleno foram detectados e indicam que o biochar foi ingerido pelos organismos. Alterações na composição química, estrutural e atividade microbiana foram evidenciadas no biochar após passagem pelo trato intestinal das minhocas.

2.8 REFERÊNCIAS

ATKINSON, C.J.; FITZGERALD, J.D.; HIPPS, N.A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and Soil**, v. 337, p. 1-18, 2010.

BENITES, V.M.; TEIXEIRA, W.G.; REZENDE, M.E.; PIMENTA, A.S. Utilização de carvão e subprodutos da carbonização vegetal na agricultura: aprendendo com as Terras Pretas de Índio. *In*: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. I. (Eds), **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009, p. 285-296.

BLOUIN, M.; HODSON, M.E.; DELGADO, E. A.; BAKER, G.; BRUSSAARD, L.; BUTT, K.R.; DAI J; DENDOOVEN, L.; PERES, G.; TONDOH, J.E.; CLUZEAU, D.; BRUN, J.J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. **Eur. J. Soil Sci**, v. 64, p. 161–182, 2013.

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 Soil Biology**, v. 36, p. 177–198, 2000.

BROWN, G.G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant Soil**, v.170, p. 209–231, 1995.

CORDELLA, M. Bio-oils from biomass slow pyrolysis: A chemical and toxicological screening. **Journal of Hazardous Materials**, v. 232, p. 26-35, 2012.

CUNHA, T.J.F.; NOVOTNY, E. H; MADARI, B.E; BENITES, V.M.; MARTINETO, L.; SANTOS, G.A. O carbono pirogênico. *In*: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. I. (Eds.), **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009, p. 263-284.

CURRY, J.P.; SCHMIDT, O. The feeding ecology of earthworms-a review. **Pedobiologia**, v. 50, p. 463–477, 2007

DEHKHODA, A.M.; ELLIS, N. Biochar-based catalyst for simultaneous reactions of esterification and transesterification. **Catalysis Today**, v. 207, p. 86-92, 2013.

DEL RÍO, J.C.; GUTIÉRREZ, A.; HERNANDO, M.; LANDÍN, P.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, A.T. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, p. 110-115, 2005.

DOWNIE, A.; CROSKY, A.; MUNROE, P. Physical properties of biochar. *In*: Lehmann, J., Joseph, S. (eds), Biochar for environmental management science and technology. **Earthscan**, p. 13–32, 2009.

ECKMEIER, E.; GERLACH, R.; SKJEMSTAD, J.O.; EHRMANN, O.; SCHMIDT, M.W.I. Only small changes in soil organic carbon and charcoal concentrations found one year after experimental slash-and-burn in a temperate deciduous forest. **Biogeosci. Discuss**, v. 4, p. 595–614, 2007.

GASKIN, J.W.; SPEIR, R.A.; HARRIS, K.; DAS, K.C.; LEE, R.D.; MORRIS, L.A.; FISHER, D.S. Effect of peanut hull and pine chip biochar on soil nutrients, corn nutrient status, and yield. **Agronomy Journal**, v. 102, p. 623-633, 2010.

GLASER, B.; BIRK, J.J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (Terra Preta de Índio). **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 82, p. 39–51, 2012.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. *In*: REES, R. M., BALL, B. C., CAMPBELL, C. D., WATSON, C. A. (eds.), **Sustainable management of soil organic matter**, p. 190-194, 2001.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. Black carbon in soils: the use of benzenecarboxylic acids as specific markers. **Org. Geochem.**, v. 29, p. 811–819, 1998.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The 'Terra Preta' phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, v. 88, p. 37-41, 2001.

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 219-230, 2002.

GÓMEZ, J.D.; DENEK, K.; STEWART, C.E.; ZHENG, J.; COTRUFO, M.F. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. **Eur. J. Soil Sci.**, n. 65, p. 28-39, 2014.

HALMA, G.; DAM, D.; VAN HAVERKAMP, J.; WINDIG, W.; MEUZELAAR, H.L.C. Characterisation of an oligotrophic-eutrophic peat sequence by pyrolysis-mass

spectrometry and conventional analysis methods. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 7, p. 167-183, 1984.

HUBER, G.W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 4044-4098, 2006.

KAAL, J.; SCHNEIDER, M.P.; SCHMIDT, M.W. Rapid molecular screening of black carbon (biochar) thermosequences obtained from chestnut wood and rice straw: A pyrolysis-GC/MS study. **Biomass Bioenergy**, v. 45, p. 115-129, 2012.

LATTAUD, C.; ZHANG, B.G.; LOCATI, S.; ROULAND, C. Activities of the digestive enzymes in the gut and in tissue culture of a tropical geophagous earthworm, *Polypheretima elongata* (Megascolecidae). **Soil Biol. Biochem**, v.29, p. 335-339, 1997.

LAVELLE, P. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. **Adv. Ecol. Res.**, v.27, p. 93-132, 1997.

LEE, Y.J.; PARK, C.; RYU, K.S.; GANG, W.; YANG, Y.; PARK, J.; JUNG, S. Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500 °C. **Bioresour Technol**, v. 148, p. 196-201, 2013.

LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for environmental management: an introduction. *In: Lehmann, J., Joseph, S. (Ed.), Biochar for environmental management: science and technology.* Earthscan, London, 2009, p. 1-9.

LEHMANN, J. Bio-energy in the black. **Ecology Environment**, v. 5, p. 381-387, 2007.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, v. 41, p. 206–213, 2010.

LOWE, C.N.; BUTT, K.R. Influence of food particle size on inter- and intra-specific interactions of *Allolobophora chlorotica* (Savigny) and *Lumbricus terrestris*: The 7th international symposium on earthworm ecology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 574-577, 2003.

MAJOR, J.; RONDON, M.; MOLINA, D.; RIHA, S.J.; LEHMANN, J. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and Soil**, v. 333, p.117-128, (2003).

MASULILI, A.; UTOMO, W.H.; SYECHFANI, M.S. Rice husk biochar for rice based cropping system in acid soil 1. The characteristics of rice husk biochar and its influence on the properties of acid sulfate soils and rice growth in West Kalimantan, Indonesia. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, p. 39-47, 2010.

MELO, T.O.; TOMASI, J.D.C.; PIRES, O.A.B.; MARQUES, F.A.; HANSEL, F.A. Simultaneous pyrolysis and trimethylsilylation with N-methyl-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide for the characterisation of lignocellulosic materials from kraft pulping. **Holzforschung**, v. 72, p. 851-862, 2018.

MÉNDEZ, A.; GÓMEZ, A.; PAZ-FERREIRO, J.; GASCÓ, G. Effects of sewage sludge biochar on plant metal availability after application to a Mediterranean soil. **Chemosphere**, v. 89, p.1354–1359, 2012.

MOHAN, D.; PITTMAN, C.U.; STEELE, J.R. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. **Energy Fuels**, v. 20, p. 849-889, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEILSON, R.; BOAG, B. Feeding preferences of some earthworm species common to upland pastures in Scotland. **Pedobiologia**, v. 47, p. 1-8, 2003.

OLESZCZUK, P.; JOSKO, I.; KUSMIERZ, M. Biochar properties regarding to contaminants content and ecotoxicological assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 375-382, 2013.

Organisation for economic Cooperation and development (OECD). Guia para testes Químicos, OECD 207. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.

PAZ-FERREIRO, J.; FU, S.; MÉNDEZ, A.; GASCÓ, G. Interactive effect of biochar and the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on plant productivity and soil enzyme activity. **J. Soil Sediments**, v. 14, p. 483–494, 2014.

Pietikäinen, J.; Kiikkilä, O.; Fritze, H. Charcoal as habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. **Oikos**, v. 89, p. 231- 242, 2000.

POLETO, M.; ZATTERA, A.J.; FORTE, M.M.C; SANTANA, R.M.C. Thermal decomposition of wood: influence of wood components and cellulose crystallite size. **Bioresour. Technol.**, 2012.

POUWELS, A.D.; EIJKEL, G.B.; BOON, J. Curie-point pyrolysis-capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. **J. Anal. Appl. Pyrolysis**, v. 14, p. 237-280, 1989.

Rowell, R.M.; Pettersen, R.; Han, J.S.; Rowell, J.S.; Tshabalala, M.A. Cell Wall Chemistry. In: Rowell, R.M. (ed) **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. Taylor & Francis Group, New York, 2005.

Satchell, J.E.; Lowe, D.G. Selection of leaf litter in *Lumbricus terrestris*. In: Graff, O., Satchell, J.E. (eds) **Progress in soil biology**. North Holland Publishing, Amsterdam, p. 102–119, 1967.

SPOKAS, A.; BAKER, M.; REICOSKY, C. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. **Plant Soil**, v. 333, p. 443-452, 2012.

STEINBEISS, S.; GLEIXNER, G.M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. **Soil Biol. Biochem.**, v. 41, p. 1301-1310, 2009.

TOPOLIANTZ, S.; PONGE, J.F. Burrowing activity of the geophagous earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) in the presence of charcoal. **Appl. Soil Ecol.**, v.23, p. 267–271, 2003.

VAN SMEERDIJK, D.G.; BOON, J.J. Characterisation of subfossil *Sphagnum* leaves, rootlets of Ericaceae and their peat by pyrolysis-high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 11, p. 377-402, 1987.

3 CAPÍTULO II: EFEITO DA PASSAGEM PELO TRATO INTESTINAL DAS MINHOCAS *P. corethrurus* NA FERTILIDADE DO SOLO E CARACTERIZAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO DOS COPRÓLITOS

3.1 RESUMO

As minhocas são organismos considerados engenheiros do ecossistema pois afetam direta ou indiretamente a disponibilidade de recursos no solo. Suas galerias e coprólitos são estruturas biogênicas que causam alteração nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, sendo importantes para a formação e manutenção de sua fertilidade. No trato intestinal desses organismos estão presentes microrganismos envolvidos em importantes processos do solo, tais como fixadores de nitrogênio, produtores de hormônios de crescimento vegetal e solubilizadores de fosfato. Devido a ingestão de materiais minerais e orgânicos pelas minhocas, seus coprólitos podem conter maiores quantidades de nutrientes do que o solo ingerido. Além disso, a espécie *Pontoscolex corethrurus* produz e secreta carbonato de cálcio (CaCO_3), alterando a disponibilidade de diversos nutrientes para as plantas nos coprólitos. Apesar do já conhecido efeito das minhocas sobre a disponibilidade de nutrientes, pouco se sabe sobre seus efeitos na disponibilidade de Ca, e sua interação com fontes de P e pH do solo. O presente estudo teve como objetivos: verificar o efeito das minhocas na disponibilidade de nutrientes em solo com e sem adição de corretivos após passagem pelo seu trato intestinal; caracterizar o carbonato de cálcio produzido pelas glândulas calcíferas de *P. corethrurus*; e avaliar o impacto de diferentes níveis de condutividade elétrica do solo sobre o desenvolvimento das minhocas. Encontrou-se que as minhocas afetaram a disponibilidade de nutrientes no solo com e sem adição de corretivos, levando a aumentos principalmente no pH e nos teores de Ca e P após passagem do solo pelo trato intestinal. Também encontramos cálcio nos espectros de EDS das glândulas calcíferas, bem como nos coprólitos, indicando a produção e liberação de CaCO_3 influenciando na disponibilidade de nutrientes do solo. Altos níveis de condutividade elétrica (acima de 2 mS cm^{-1}) foram prejudiciais às minhocas *P. corethrurus*.

Palavras-chave: biomineralização, disponibilidade de nutrientes, glândulas calcíferas, condutividade elétrica.

3.2 ABSTRACT

Earthworms are considered ecosystem engineers, as they directly or indirectly affect the availability of resources in the soil. Their burrows and casts cause changes in the soil chemical and biological properties, being important for the formation and maintenance of soil fertility. The digestive tract of these organisms has microorganisms involved in important soil processes, such as nitrogen fixers, producers of plant growth hormones and phosphate solubilizers. By ingesting mineral and organic particles earthworms increase nutrient contents in their casts. Furthermore, the species *Pontoscolex corethrurus* can produce and secrete calcium carbonate (CaCO_3), changing the availability of various plant nutrients. Despite their well-known effects on nutrient

availability, little is known of the impact of earthworms on Ca availability, and the interaction with sources of P and soil pH. In the present study we aimed to: verify the effect of earthworms on the nutrient availability in soil with and without correctives, after gut passage; characterize the calcium carbonate produced by the calcified glands of *P. corethrurus*; verify the impact of different soil electrical conductivity values on earthworm development. We found that earthworms affected nutrient availability in soil with and without correctives, with major increases in pH values and Ca and P contents after gut passage. Calcium was observed in the EDS spectra of the the calciferous as well as in the casts, indicating production and release of CaCO_3 that influences the availability of soil nutrients. High levels of electrical conductivity (over 2 ms cm^{-1}) were harmful to *P. corethrurus*.

Keywords: biomineralization, nutrient availability, calciferous glands, electrical conductivity.

3.3 INTRODUÇÃO

As minhocas representam de 40% a 90% da biomassa da macrofauna dos solos tropicais (FRAGOSO et al., 1999), e são considerados organismos prestadores de serviços essenciais aos ecossistemas (BLOUIN et al., 2013). Muitos autores consideram esses organismos “engenheiros do ecossistema” (LAVELLE, 1988; JOUQUET et al., 2006), pois afetam a estrutura do solo (interferindo na oxigenação, porosidade e infiltração de água), e suas propriedades químicas e biológicas (decomposição da matéria orgânica, ciclagem e disponibilidade de nutrientes, populações e atividade microbiana), alterando a disponibilidade de recursos para outros organismos (LAVELLE, 2006; BLOUIN et al., 2013).

Ao se alimentar de partículas de solo juntamente com resíduos orgânicos, as minhocas fragmentam e homogeneizam o material ingerido na moela e intestino, adicionando muco e enzimas, aumentando assim a área de superfície para a ação microbiana (MEDINA-SAUZA et al., 2019; KRISHNAMOORTHY; VAJRANABHAI, 1986; BERTRAND et al., 2015; LAVELLE et al., 1995). Há também reorganização de partículas, e possíveis efeitos sobre a transformação de minerais (BAROIS et al., 1993; BARTHOD et al., 2020; BLANCHART et al., 1990; SHIPITALO et al., 1989). As partículas ingeridas e processadas são devolvidas ao solo na forma de coprólitos de minhocas com bactérias ativas e altas taxas de mineralização iniciais. Desta forma, as minhocas alteram a estrutura das comunidades microbianas do

solo, estimulando a decomposição e a mineralização da matéria orgânica e de nutrientes essenciais às plantas (LAVELLE et al., 2004; BROWN et al., 2000, BROWN et al., 1995; BROWN et al., 1999).

Além disso, muitas espécies de minhocas, incluindo a *Pontoscolex corethrurus*, sintetizam e secretam carbonato de cálcio (CaCO_3) (CANTI; PIEARCE, 2002; KALE; KRISHNAMOORTHY, 1980). A produção de carbonato de cálcio amorfo (CaCO_3), ocorre em um órgão especializado das minhocas, as glândulas calcíferas (DARWIN, 1881; CANTI; PIEARCE, 2002). Nessas glândulas é formado um líquido leitoso que compreende micro-esférulas amorfas de CaCO_3 . Acredita-se que essas micro-esférulas se cristalizam para formar grânulos de calcita, aragonita e valerita (GAGO-DUPORT et al., 2008; LEE et al., 2008). Os grânulos de calcita são transferidos das glândulas para o esôfago da minhoca, e a partir daí movem-se para a parte final do intestino e podem ser expulsos nos coprólitos (VERSTEEGH et al., 2017). Portanto, a passagem do solo pelo trato intestinal das minhocas pode ter um efeito importante sobre o potencial de hidrogênio (pH) e a disponibilidade de diversos nutrientes para as plantas, e consequentemente sobre a fertilidade dos solos (LEE, 1985). Porém, a biologia de muitas espécies ainda é pouco conhecida, e o papel das glândulas calcíferas de *P. corethrurus* ainda não é bem conhecido (KALE; KRISHNAMOORTHY, 1980; GAGO-DUPORT et al., 2008; CANTI et al., 2002). Além disso, apesar de haver bastante informação sobre seus efeitos na disponibilidade de P no solo (SUAREZ et al., 2003; COULIS et al., 2014; PRAKASH et al., 2010; BROSSARD et al., 1996; SHARPLEY et al., 1976, LE BAYON et al., 2009; LE BAYON; MILLERET, 2009), os efeitos da minhoca *P. corethrurus* sobre a disponibilidade de Ca, e sua interação com fontes de P e pH do solo, ainda são pouco conhecidos.

Mas as minhocas não somente afetam as condições edáficas, elas também são sensíveis às condições físico-químicas e biológicas do solo, podendo ser úteis na indicação de mudanças em suas propriedades (KORBOULEWSKY et al., 2016; DA SILVA et al., 2016; DUARTE et al., 2014). Desta forma, esses organismos são frequentemente utilizados como indicadores da perturbação ambiental, da contaminação do solo, de sua qualidade e potencial produtivo (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010). Nesse sentido, uma das propriedades do solo pouco avaliadas enquanto aos impactos sobre as minhocas é a condutividade elétrica (RAIESI et al., 2020), que pode ser afetada pelo uso de fertilizantes e outros corretivos (ABREU et al., 2000).

Com base nisso, o presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito das minhocas na disponibilidade de nutrientes do solo natural e com adição de corretivos, após passagem pelo seu trato intestinal, e a caracterização do carbonato de cálcio produzido pelas glândulas calcíferas de *P. corethrurus*, bem como constatar os valores de condutividade elétrica do solo que causam efeito negativo sobre o desenvolvimento das minhocas.

3.4 MATERIAL DE MÉTODOS

3.4.1 COLETA E PREPARO DO SOLO

O solo utilizado no experimento foi um Latossolo Amarelo coletado no município de Paraopeba - MG, seco ao ar, e peneirado a 2 mm. A capacidade de campo foi medida seguindo metodologia de Anderson e Ingram (1993), para ajuste da umidade do solo nos tratamentos.

3.4.2 ENSAIO 1

Montou-se um experimento inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e 5 repetições, totalizando 80 unidades experimentais. Os tratamentos avaliados foram: a) solo a pH natural; b) solo com adição cálcio a pH natural (Solo+Ca); c) solo com adição de fósforo a pH natural (Solo+P); d) solo com cálcio e fósforo a pH natural (Solo+Ca+P); e) solo com adição de cálcio a pH 6,0 (Solo+Ca+pH6,0); f) solo com adição de fósforo a pH 6,0 (Solo+P+pH6,0); g) solo com cálcio e fósforo a pH 6,0 (Solo+Ca+P+pH6,0); h) solo natural a pH 6,0 (Solo+pH6,0). O fósforo foi adicionado ao solo na forma de fosfato dipotássico na dose de 2000 mg dm³ de P, e o Ca na forma de sulfato de cálcio, na dose de 80 mmolc dm³ de Ca. Para correção do pH utilizou-se óxido de magnésio.

As espécies adultas (cliteladas) de *P. corethrurus* foram coletadas na área experimental da Embrapa Florestas em Colombo, PR. Após a coleta, os animais foram mantidos no Latossolo de Paraopeba, MG em condições de laboratório, a 22 °C para aclimação dos mesmos por pelo menos uma semana, até a montagem do experimento.

O experimento foi realizado no laboratório de Ecologia da Embrapa Florestas. Colocaram-se 160 gramas do solo de cada tratamento em caixas Gerbox, formando uma

fina camada de solo de aproximadamente 1,5 cm de espessura. Foi ajustada a umidade para 60% da capacidade de campo.

Foram adicionadas cinco minhocas adultas por unidade experimental, cada uma pesando em média 0,40 g. Os recipientes foram acondicionados em incubadora onde permaneceram por 60 dias, com temperatura constante de 20 °C. Semanalmente foi feita a pesagem das minhocas nos diferentes tratamentos em balança analítica (0,01g), e verificada a sobrevivência dos indivíduos adicionados. Havendo mortalidade das minhocas, essas foram retiradas e substituídas por novos indivíduos adultos de peso e tamanho equivalente (média 0,40 g). Semanalmente, também se coletaram os coprólitos superficiais, e amostras de solo controle para análise química, seguindo a metodologia descrita por Marques e Motta (2004). As amostras foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira de 20 cm de diâmetro e malha de 2 mm, para obtenção de TFSA.

Foram realizadas a determinação do pH CaCl_2 0,01 mol L⁻¹, H + Al estimado pelo pH SMP, Alumínio trocável (Al^{+3}) foi extraído com solução KCl 1 mol⁻¹ e quantificado por titulometria. O fósforo disponível foi determinado pelo método de extração com solução de Mehlich⁻¹, o cálcio e magnésio (Ca^{2+} e Mg^{2+}), extraído com solução KCl 1 mol⁻¹ e potássio (K^+) pelo método de extração com solução de Mehlich⁻¹ e quantificado por fotometria de chama. Com os resultados das análises, foi possível calcular a soma de bases (SB)=Ca+Mg+K, capacidade de troca de cátions (T)=SB+Al+H, saturação por bases (V%)= 100 S/T e saturação por alumínio (m%)= 100 Al/S+Al, conforme Embrapa (2011).

Também foi realizada a análise de condutividade elétrica nos solos dos diferentes tratamentos. Para essa determinação, os solos foram lavados com água deionizada e filtrados. Subsequentemente, a água de filtragem foi recolhida para posterior leitura em condutivímetro de bancada.

3.4.3 ENSAIO 2

Nesse experimento, optou-se por usar outras doses e fonte de fósforo (para evitar problemas de condutividade elétrica), e escolheram-se 12 tratamentos com 5 repetições, com e sem minhocas, totalizando 120 unidades experimentais. Os tratamentos avaliados foram os mesmos do ensaio 1, mas o fósforo adicionado ao solo foi na forma de fosfato de cálcio, na dose de 500 mg dm³ de P. O Ca foi adicionado também na forma de sulfato de cálcio, para alcançar a concentração de 80 mmol_c dm³ de Ca. Para correção

do pH, utilizou-se óxido de magnésio. Também foram avaliados: solo com adição de farinha de osso a pH 6,0 (Solo+FO+pH6,0); solo com adição de farinha de espinho de peixe a pH6,0 (Solo+E+pH6,0); solo com adição de farinha de osso a pH natural (Solo+FO); solo com adição de farinha de espinho de peixe a pH natural (Solo+E). A farinha de osso e farinha de espinho de peixe foram adicionadas na dose equivalente a 500 mg dm^{-3} de P. As doses de fósforo e cálcio foram determinadas com base em teores desses elementos relatados em solos de Terra Preta de Índio (TPI) encontrados na literatura (SEGALLA, 2017, LIMA et al., 2009; FALCÃO et al., 2009).

O experimento foi realizado no laboratório de Ecologia da Embrapa Florestas. Colocaram-se 160 gramas do solo de cada tratamento em caixas Gerbox, formando uma fina camada de solo de aproximadamente 1,5 cm de espessura, para facilitar o recolhimento dos coprólitos na superfície. Foi ajustada a umidade para 60% da capacidade de campo. Foram adicionadas cinco minhocas adultas por unidade experimental, cada uma pesando em média 0,5 g. Os recipientes foram acondicionados em incubadora, onde permaneceram por 60 dias, a temperatura constante (20 °C). As minhocas encontradas no final do experimento foram quantificadas e pesadas em balança analítica (0,01 g).

Para a realização das análises, os coprólitos foram coletados a cada semana, após a instalação do experimento. As duas primeiras coletas de coprólitos foram descartadas, por se tratar do expurgo do solo original. Foram coletadas, também, amostras de solo dos tratamentos controle (sem minhocas) para análise química. Os coprólitos foram secos ao ar durante um período de 10 dias, e logo após, armazenados a temperatura ambiente até posterior análise química. A análise química de rotina dos solos controle e dos coprólitos foi realizada seguindo metodologia descrita em Marques e Motta (2004).

Determinou-se o pH em $\text{CaCl}_2 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, H + Al pelo pH SMP, alumínio trocável (Al^{+3}) extraído com solução $\text{KCl } 1 \text{ mol}^{-1}$ e quantificado por titulometria. O fósforo disponível foi determinado pelo método de extração com solução de Mehlich⁻¹, o cálcio e magnésio (Ca^{2+} e Mg^{2+}), extraído com solução $\text{KCl } 1 \text{ mol}$ e o potássio (K^{+}) pelo método de extração com solução de Mehlich⁻¹ e quantificado por fotometria de chama. Com os resultados das análises foi possível calcular a soma de bases (SB)=Ca+Mg+K, capacidade de troca de cátions (T)=SB+Al+H, saturação por bases (V%)= 100 S/T e saturação por alumínio (m%)= 100 Al/S+Al , conforme Embrapa (2011). Não houve suficiente amostra de coprólito de cada unidade experimental para realizar análise química separadamente de cada unidade experimental, então se analisaram amostras

compostas, combinando os coprólitos das cinco unidades experimentais de cada tratamento.

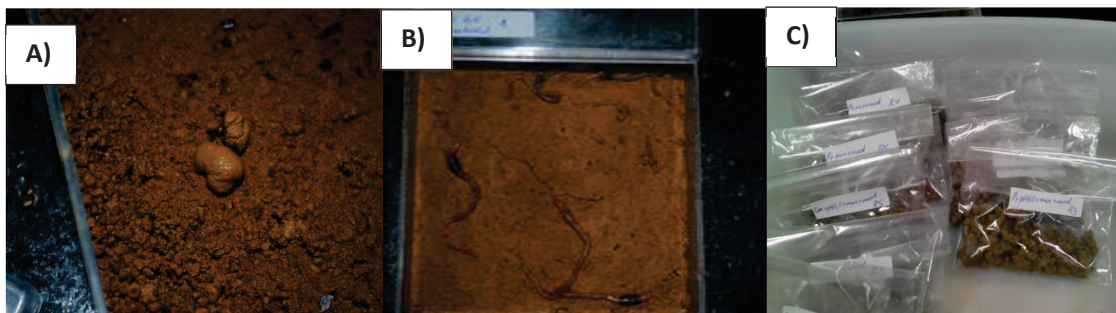
Amostras de solo dos tratamentos sem adição de corretivos (SN), bem como os coprólitos produzidos nesse tratamento (CP) foram desidratadas em liofilizador, posteriormente montadas sobre stubes e recobertos com ouro, em um sistema de pulverização no equipamento da marca Balzers MED 010, com tempo de exposição de 180 segundos e corrente de 50mA. Posteriormente, os stubs foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura da marca LEO Evo 40. As amostras foram também analisadas por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), num aparelho JEOL 7000F Analytical SEM, com detector de raios X da Thermo Electron, usando uma tensão de 15kV. Ambos aparelhos estão localizados na Empresa Instrumentação Agropecuária em São Carlos-SP.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 ENSAIO 1

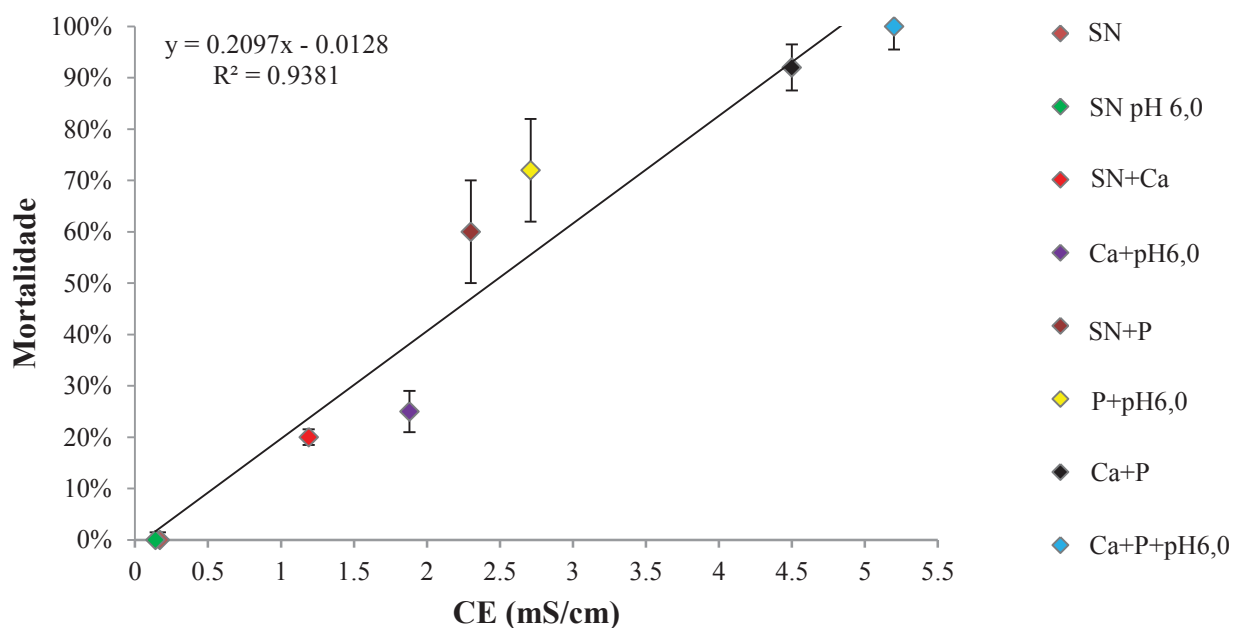
Após uma semana da montagem do Ensaio 1, nos tratamentos sem adição de corretivos foi observada a presença de galerias e coprólitos na superfície do solo, indicando sobrevivência e alta atividade das minhocas (Figura 6 A). Porém, nos recipientes com adição de P (fosfato dipotássico) observou-se alta mortalidade das minhocas, que já estavam em estado de decomposição e colonizadas por fungos (Figura 6 B). Portanto, realizou-se a coleta de amostras de solos de cada tratamento para análise química e de condutividade elétrica (CE).

FIGURA 6. A) PRESENÇA DE COPRÓLITOS NA SUPERFÍCIE DOS SOLOS SEM ADIÇÃO DE P B) MORTALIDADE DE MINHOCAS OBSERVADA NOS TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE P (FOSFATO DIPOTÁSSICO); C) COPRÓLITOS E SOLOS COLETADOS DURANTE O EXPERIMENTO.



As minhocas presentes no solo natural, sem adição de corretivos (SN) e no solo natural com pH 6,0 (SN+pH6,0), não apresentaram mortalidade, sendo observado ainda incremento no peso das minhocas de 20% (SN) e 26% (SN+pH 6,0), após um mês de experimento. A CE desses solos apresentava valores médios de 0,17 mS/cm para SN e 0,14 mS/cm para SN+pH 6,0 (Figura 7). Nos tratamentos solo com adição de cálcio em pH natural (SN+Ca) e em pH 6,0 (SN+Ca+pH6,0) foi observada mortalidade de 20% das minhocas e a CE desses tratamentos apresentaram valores médios de 1,20 mS cm⁻¹ e 1,88 mS cm⁻¹.

FIGURA 7. RELAÇÃO ENTRE A CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS SOLOS (CE MS/CM) E A MORTALIDADE DE MINHOCAS (%) NOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (SN); SOLO NATURAL+pH6,0 (SN+pH6,0), SOLO+CA (SN+CA), SOLO+CA+pH6,0 (CA+pH6,0), SOLO+P (SN+P), SOLO+P+pH6,0 (P+pH6,0), SOLO+CA+P (CA+P), SOLO+CA+P+pH6,0 (CA+P+pH6,0).



Em relação aos tratamentos solo com adição de fósforo a pH natural (SN+P) e pH 6,0 (P+pH6,0) foi observada mortalidade de 60% e 72% dos indivíduos. Nesses tratamentos a CE média foi de 2,5 mS cm⁻¹ e 2,7 mS cm⁻¹, respectivamente. Finalmente, nos tratamentos com adição de Ca e P (Ca+P) e Solo+Ca+P+pH6,0 (Ca+P+pH6,0),

houve mortalidade de 92 a 100%, e encontraram-se valores de CE de 4,5 e 5,2 mS cm⁻¹. Após a mensuração da CE dos diferentes tratamentos foi realizada análise química dos solos, e os valores estão expressos na Tabela 3.

3.5.2 QUÍMICA DO SOLO

O solo natural utilizado no experimento, sem adição de corretivos, apresentou acidez muito alta, com valores médios de pH_{CaCl₂} de 4,22 (Tabela 3). Já nos solos com adição de MgO foi verificado incremento nos valores de pH, com pH de 6,20 no tratamento (Solo+pH 6,0), 7,12 no tratamento com adição de Ca mais MgO (Solo+Ca+pH6,0), 7,42 nos tratamentos com adição de P e MgO e 7,32 nos solos com adição de Ca, P e MgO. A adição de sulfato de cálcio nos tratamentos Solo+Ca, Solo+Ca+pH6,0, Solo+Ca+P e Solo+Ca+P+pH 6,0 aumentou o pH em cloreto de cálcio e o teor de cálcio trocável e reduziu o Al⁺³ trocável e o H⁺+Al⁺³. Também verificou-se aumento na SB, com adição do sulfato de cálcio.

Em relação aos teores de cálcio, houve aumento de 33 vezes nos tratamentos com adição de sulfato de cálcio (Solo+Ca), 26 vezes nos tratamentos com adição do sulfato de cálcio e MgO (Solo+Ca+pH6,0), 23 e 13 vezes, respectivamente, nos tratamentos com adição do sulfato de cálcio juntamente com fosfato dipotássico a pH natural e pH 6,0 (Solo+Ca+P e Solo+Ca+P+pH 6,0), em relação ao solo controle.

Observou-se também aumento nos teores de Mg nos tratamentos com correção de pH (Solo+Ca+pH 6,0, Solo+P+pH6,0 e Solo+Ca+P+pH 6,0) em função da disponibilidade do elemento no corretivo (MgO).

Nos tratamentos com adição do fosfato de cálcio (Solo+P, Solo+P a pH6,0 e Solo+Ca+P em pH6,0) observou-se aumento no P disponível, particularmente nos solos com correção de pH, em função da redução no processo de adsorção/precipitação do P no solo. Também se observou grande aumento nos teores de K, após a aplicação do adubo fosfatado, por esse apresentar em sua fórmula duas moléculas do elemento (K₂HPO₄) (Tabela 3)

TABELA 3. ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM OU SEM ADIÇÃO DE P, CA, E AJUSTE OU NÃO DO PH A 6,0.

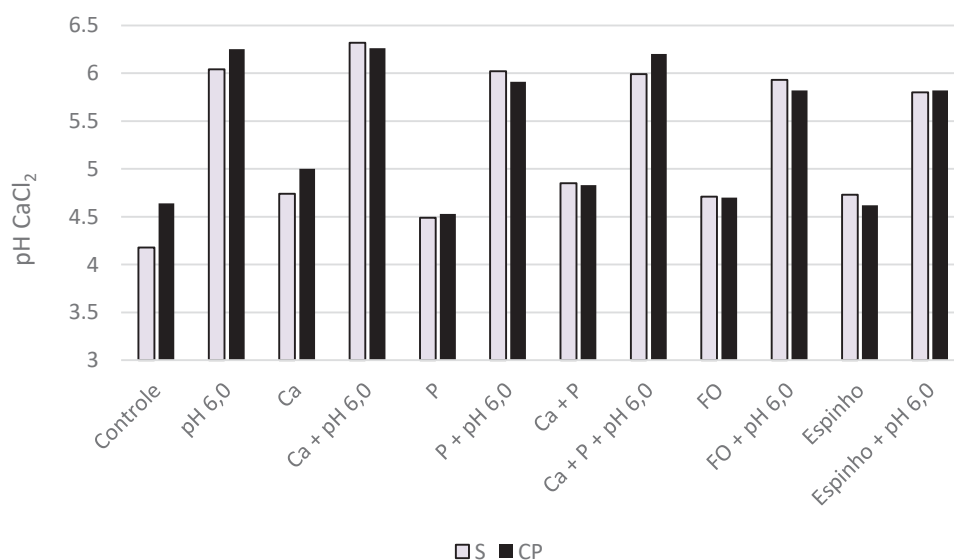
Tratamentos	pH	pH	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	P	C	V
	CaCl ₂	SMP	cmol _c dm ⁻³									
Solo	4,22 f	5,49 e	1,31 a	7,60 a	0,30 e	0,50 a	0,03 c	0,80 f	8,40 e	0,50 c	26,86 b	9,95 f
Solo + pH 6,0	6,20 c	6,77 b	0,00 c	2,90 d	0,20 e	3,80 b	0,02 c	4,10 d	6,90 f	0,00 c	34,56 b	58,47d
Solo + Ca	4,85 e	5,74 d	0,82 b	6,30 b	10,00 a	0,40 f	0,03 c	10,40 b	16,80a	1,80 c	71,76 a	62,04c
Solo + Ca + pH 6,0	7,12b	6,71 b	0,00 c	3,00 d	7,80 b	4,90 a	0,03 c	12,80 a	15,80 b	1,90 c	31,37 b	80,88a
Solo + P	6,36 c	6,87 b	0,00 c	2,70 d	0,70 e	0,50 f	0,90 a	2,50 e	5,10 g	402,4 b	37,74 b	48,00e
Solo + P + pH 6,0	7,42 a	7,10 a	0,00 c	2,30 e	0,10 e	3,20 c	0,91 a	4,70 d	6,90 f	592,0 a	34,22 b	67,16b
Solo + Ca + P	6,00 d	6,34 c	0,07 c	4,00 c	6,80 c	0,60 e	0,67 b	8,30 c	12,30c	452,0 b	32,78 b	67,18b
Solo + Ca + P + pH 6,0	7,32 a	7,14 a	0,00 c	2,20 e	3,90 d	2,90 d	0,72 b	7,60 c	9,80 d	588,0 a	33,76 b	77,69a

pH em CaCl₂ (relação solo:solução de 1:2,5); H + Al estimado pelo pH SMP; Al (titulometria), Ca e Mg (espectrofotometria absorção atômica) extraídos com KCl 1 M; P e K extraído com Mehlich-1, determinados por colorimetria e espectrofotômetro de emissão por chama; C através de oxidação por dicromato. SB = Soma de bases, T= Capacidade de troca de cátions a pH 7,0; P = Fósforo extraído por Mehlich ; C = carbono orgânico total; V = saturação por bases; m= Saturação de Al. Valores médios seguidos de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si p<0,05.

3.5.3 ENSAIO 2

No Ensaio 2 não houve mortalidade das minhocas nos diferentes tratamentos. Após 60 dias de coleta semanal dos coprólitos das minhocas, realizou-se a análise química dos solos, e os coprólitos das minhocas presentes nos tratamentos solo natural (CP), solo natural com pH 6,0 (CP+pH6,0), solo com adição de Ca (CP+Ca), e solo com adição de Ca e P a pH 6,0 (CP+Ca+P+pH 6,0) apresentaram aumento de pH em relação aos solos controles de cada tratamento (Figura 8, Tabela 4).

FIGURA 8. VALORES DE PH CaCl_2 DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *P. corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM PH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (CA), SOLO COM ADIÇÃO DE CA A pH 6,0 (CA+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA E P (CA+P), SOLO COM ADIÇÃO DE CA, P A pH6,0 (CA+P+pH6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A PH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).



Foram observadas reduções no alumínio trocável (Al^{+3}) nos coprólitos das minhocas presentes no solo natural (CP), solo com adição de Ca (CP+Ca), solo com adição de P (CP+P), solo com adição de Ca e P a pH 6,0 (CP+Ca+P+pH6,0), solo com adição de farinha de osso (CP+FO) e solo com adição de farinha de osso a pH6,0 (CP+FO+pH6,0) (Tabela 4).

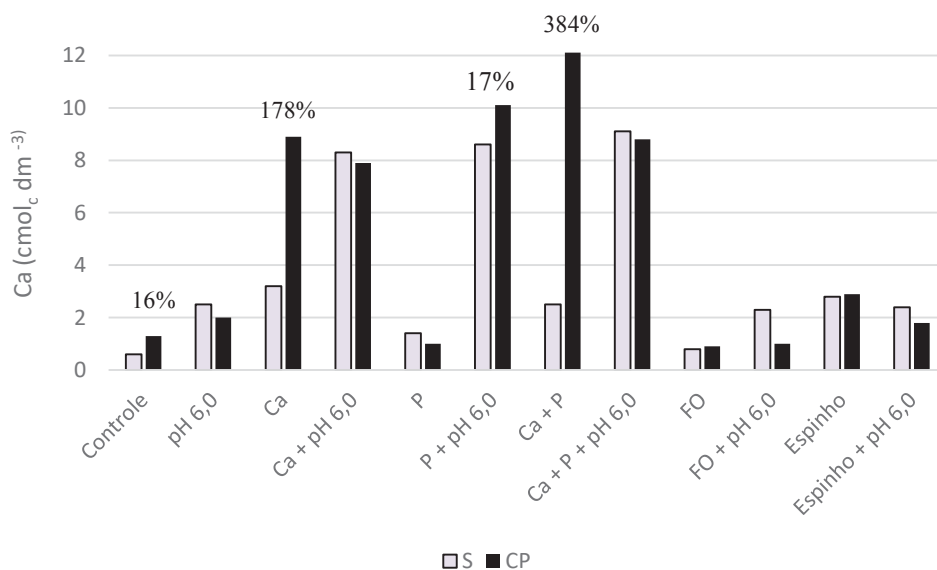
TABELA 4. ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO E DOS COPRÓLITOS (CP) DE MINHOCAS *P. corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM OU SEM ADIÇÃO DE P, CA, FARINHA DE OSSO (FO) E ESPINHA DE PEIXE (E), AJUSTADO OU NÃO A PH A 6,0. AUMENTOS OU REDUÇÕES ACIMA DE 15% ENTRE OS COPRÓLITOS E OS TRATAMENTOS, ESTÃO SINALIZADAS EM NEGRITAS.

	pH	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	C
	SMP	cmol _c dm ⁻³				g dm ⁻³		
Solo	5,64	1,98	7,1	0,5	0,023	1,12	8,22	18,40
CP	5,67	1,25	7,1	0,8	0,020	2,12	9,22	18,40
S+ pH 6,0	6,78	0,11	2,7	1,2	0,018	3,72	6,42	18,40
CP+ pH 6,0	6,73	0,10	3,0	7,4	0,021	9,42	12,42	20,10
S + Ca	5,80	0,95	5,8	0,8	0,017	4,01	9,81	18,40
CP + Ca	6,01	0,50	4,6	0,6	0,019	9,52	14,12	20,10
S + Ca + pH 6,0	6,86	0,08	2,5	1,6	0,019	9,91	12,41	26,90
CP + Ca + pH 6,0	6,83	0,10	2,7	1,8	0,021	9,72	12,42	26,90
S+ P	5,69	1,49	6,2	0,7	0,01	2,12	8,32	20,10
CP + P	5,54	1,24	7,2	0,5	0,023	1,52	8,72	44,50
S + P + pH 6,0	6,71	0,13	3,0	1,6	0,020	10,22	13,22	18,40
CP + P + pH 6,0	6,53	0,13	3,4	1,2	0,020	11,32	14,72	25,10
S+ Ca + P	6,86	0,76	2,7	0,5	0,015	3,01	5,71	20,10
CP + Ca + P	5,78	0,73	5,8	0,8	0,018	12,92	18,72	20,10
S + Ca + P + pH 6,0	6,76	0,16	3,0	1,5	0,019	15,62	18,62	18,40
CP+ Ca + P + pH 6,0	6,72	0,09	3,0	1,7	0,021	10,52	13,52	18,40
S + FO	5,75	1,04	6,2	0,4	0,032	1,23	7,43	33,80
CP + FO	5,70	0,98	6,2	0,5	0,033	1,43	7,63	33,80
S + FO + pH 6,0	6,65	0,14	3,2	0,6	0,028	2,92	6,12	32,00
CP + FO + pH 6,0	6,50	0,05	3,4	0,9	0,031	1,93	5,33	32,00
S+ E	5,74	0,96	6,2	1,2	0,033	4,13	10,33	26,90
CP + E	5,57	1,32	6,7	1,2	0,039	4,14	10,84	25,10
S + E+ pH 6,0	6,46	0,11	3,7	1,6	0,033	4,03	7,73	33,80
CP + E + pH 6,0	6,45	0,10	3,9	1,5	0,032	3,33	7,23	35,50

pH em CaCl₂ (relação solo:solução de 1:2,5); H + Al estimado pelo pH SMP; Al (titulometria), Ca e Mg (espectrofotometria absorção atômica) extraídos com KCl 1 M; P e K extraído com Mehlich-1, determinados por colorimetria e espectrofotômetro de emissão por chama; C através de oxidação por dicromato. SB = Soma de bases, T= Capacidade de troca de cátions a pH 7,0; P = Fósforo extraído por Mehlich; C = carbono orgânico total; V = saturação por bases; m= Saturação de Al.

Também verificou-se um aumento de 2 vezes nos teores de cálcio nos coprólitos das minhocas presentes no solo natural (CP), de 3 vezes nos coprólitos presentes no solo com adição de Ca (CP+Ca), de 1,2 vezes no solo com adição de P a pH 6,0 (CP+P+pH6,0) e de 5 vezes nos coprólitos das minhocas presentes no solo com adição de Ca e P (CP+Ca+P) (Figura 9).

FIGURA 9. TEORES DE Ca^{+2} DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *P. corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM pH 6,0 (PH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (CA), SOLO COM ADIÇÃO DE CA A PH 6,0 (CA+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A PH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA E P (CA+P), SOLO COM ADIÇÃO DE CA E P A pH6,0 (CA+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A PH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).

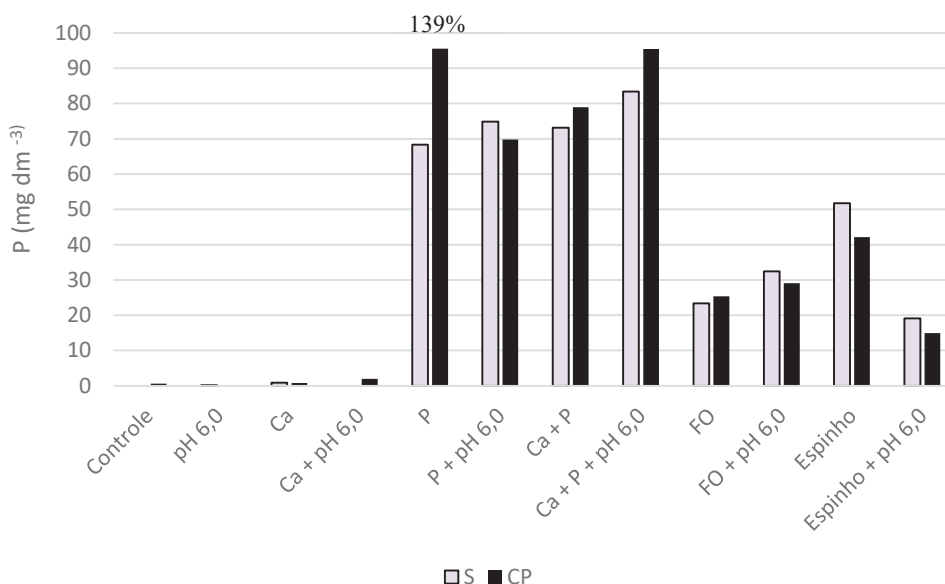


Os aumentos observados nos teores de Ca dos coprólitos foram relativamente maiores nos coprólitos presentes no solo com adição de corretivos, do que no solo natural. Os teores de magnésio também aumentaram nos coprólitos das minhocas presentes no solo natural (CP) e solo natural a pH 6,0 (CP+pH6,0). Nos teores de potássio não foram observadas alterações após passagem pelo trato intestinal. A soma

de bases aumentou nos coprólitos das minhocas presentes nos tratamentos: CP; CP+pH6,0; CP+Ca; CP+P+pH6,0; CP+Ca+P e CP+FO (Tabela 4).

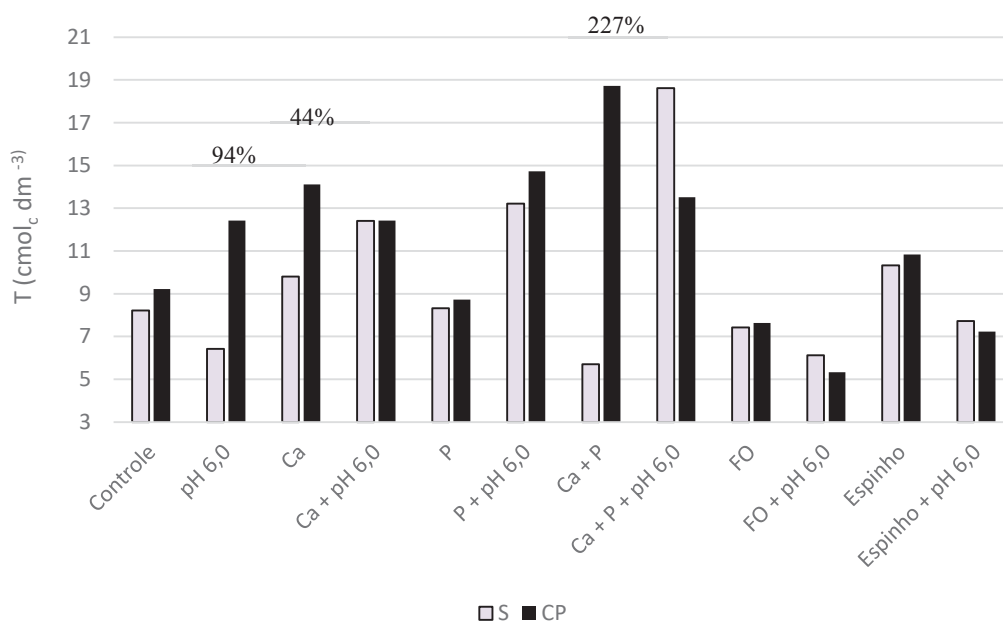
Em relação ao fósforo, os coprólitos das minhocas presentes no solo natural (CP), solo com adição de Ca a pH 6,0 (CP+Ca+pH6,0), solo com adição de fósforo (CP+P), solo com adição de Ca e P (CP+Ca+P), solo com adição de Ca P a pH 6,0 (CP+Ca+P+pH6,0), e solo com adição de farinha de osso (CP+FO) apresentaram maiores teores de P quando comparados aos solos controles, sem adição de minhocas (Figura 10).

FIGURA 10. TEORES DE P DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *P. corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM PH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (Ca), SOLO COM ADIÇÃO DE CA A pH 6,0 (Ca+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA E P (Ca+P), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca E P A pH6,0 (Ca+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A pH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).



O C orgânico nos coprólitos foi maior somente no solo natural com adição de P (CP+P). Já os valores de CTC a pH 7,0 (T) e saturação por bases (V%) apresentaram aumento nos coprólitos dos tratamentos: CP, CP+pH6,0,CP+Ca e CP+P+pH6,0.(Figura 11).

FIGURA 11. VALORES DE CTC A pH 7,0 (T) DO SOLO (S) E DOS COPRÓLITOS (CP) DAS MINHOCAS *P. corethrurus* DOS DIFERENTES TRATAMENTOS: SOLO NATURAL (CONTROLE), SOLO NATURAL COM PH 6,0 (pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA (Ca), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca A pH 6,0 (Ca+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE P (P), SOLO COM ADIÇÃO DE P A pH 6,0 (P+pH6,0), SOLO COM ADIÇÃO DE CA E P (Ca+P), SOLO COM ADIÇÃO DE Ca E P A pH6,0 (Ca+P+pH 6,0), SOLO COM FARINHA DE OSSO (FO), SOLO COM FARINHA DE OSSO A PH6,0 (FO+pH6,0), SOLO COM ESPINHO DE PEIXE (ESPINHO) E SOLO COM ADIÇÃO DE ESPINHO A pH6,0 (ESPINHO+pH6,0).

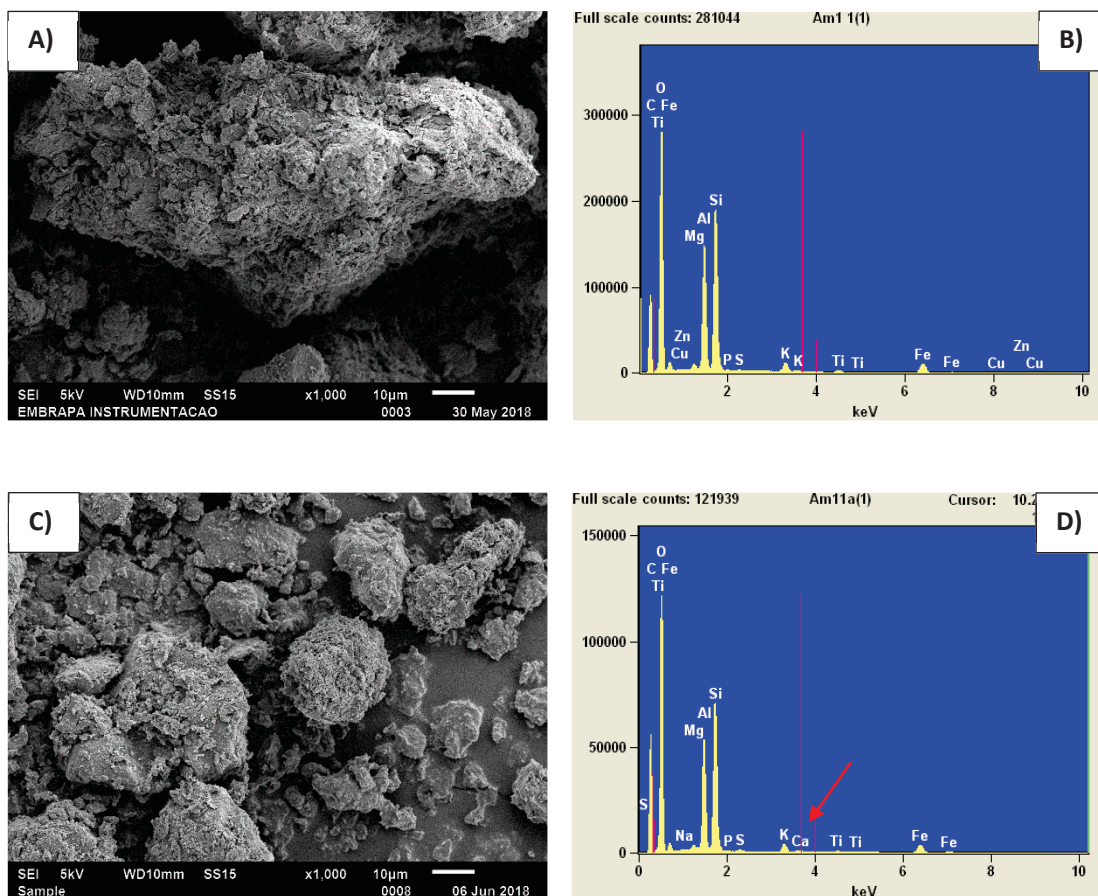


As imagens da microscopia eletrônica de varredura e da espectroscopia de energia dispersa da amostra de solo sem adição de minhocas se encontram na Figura 12 A e B. No espectro da amostra do solo original (controle) é possível observar vestígios dos elementos C, O, Fe, Ti, Si, Al, Mg, Zn, Cu, P, S, K. Já nas Figura 12 C e D, o MEV e EDS da amostra de coprólitos das minhocas, apresentam os elementos C, O, Fe, Ti, Si,

Al, Mg, Na, P, S, K, Ca. A principal característica que diferenciou os coprólitos do solo controle foi a presença de Ca no espectro.

Nas imagens realizadas por meio de MEV, com aumento de 50x (Figura 13 A), é possível ver a morfologia externa de um dos 3 pares das glândulas calcíferas retiradas do corpo das minhocas. Após a captura da imagem externa da glândula calcífera, realizou-se uma secção transversal e leitura do espectro de EDS da parte interna da glândula calcífera (Figura 13 B). Nessa, é possível observar a presença dos elementos C, O, N, Ti, Na, Zn, Cu, Mg, Al, Si, P, S bem como um pico de Ca.

FIGURA 12. A) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AMOSTRAS DE SOLO SEM ADIÇÃO DE MINHOCAS; B) ESPECTRO DE EDS DA AMOSTRA DE SOLO SEM ADIÇÃO DE MINHOCAS; C) AMOSTRAS DE COPRÓLITOS DAS MINHOCAS *P. corethrurus*; D) ESPECTRO DE EDS DOS COPRÓLITOS DAS MINHOCAS.

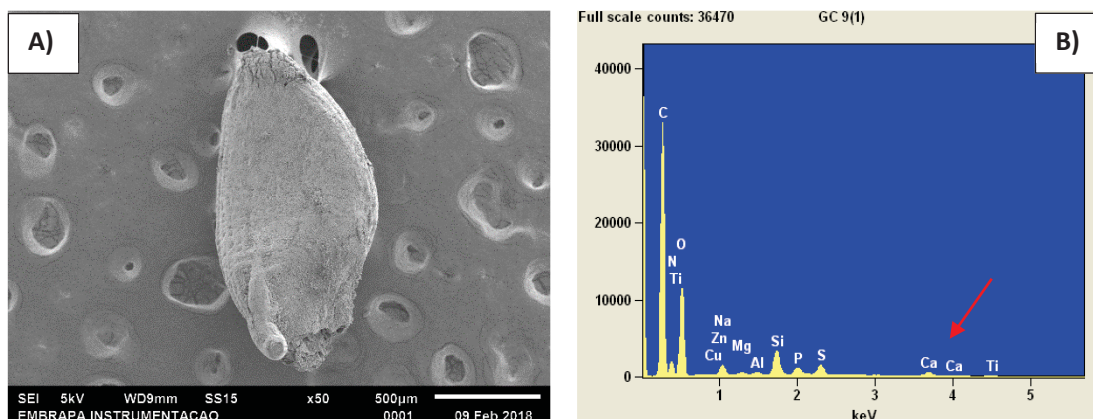


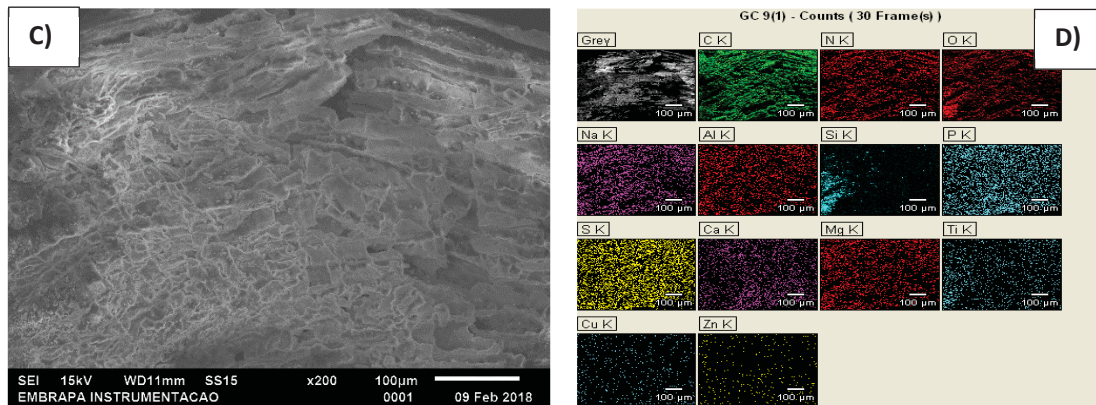
3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 MORTALIDADE DAS MINHOCAS E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS SOLOS (ENSAIO 1)

A salinidade é expressa pela CE da fase líquida do solo (solução do solo), e quanto maior a quantidade de sais, maior a CE observada. Segundo EMBRAPA (1999), o solo é considerado salino quando a CE é maior que 4 mS cm^{-1} (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Já as culturas vegetais respondem diferentemente aos valores de condutividade elétrica, sendo que os efeitos da salinidade para as plantas são negligenciáveis entre 0 e 2 mS cm^{-1} ; de 2 a 4 mS cm^{-1} pode ocorrer restrição do desenvolvimento de algumas culturas, de 4 a 8 mS cm^{-1} muitas culturas diminuem a produção, e de 8 a 16 mS cm^{-1} só algumas plantas produzem satisfatoriamente (KLAR, 1988). Contudo, em relação aos organismos do solo, em especial as minhocas, não existem dados sobre os valores de condutividade tolerável; apenas estudos mostrando relações entre a condutividade elétrica e a abundância de minhocas em situações de campo (JOSCHKO et al., 2010; SCHIRRMANN et al., 2016; LARDO et al., 2015).

FIGURA 13. A) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA PARTE EXTERNA DA GLÂNDULA CALCÍFERA RETIRADA DO SEGMENTO 9 DAS MINHOCAS *P. corethrurus*; B) ESPECTRO DE EDS DA PARTE INTERNA DA GLÂNDULA CALCÍFERA; C) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA PARTE INTERNA DA GLÂNDULA CALCÍFERA; D) SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS NO ESPECTRO DE EDS DA GLÂNDULA CALCÍFERA DAS MINHOCAS.





A salinização do solo é um problema em muitas partes do mundo, mas solos salinos geralmente ocorrem em terras irrigadas (AYARS; TANJI, 1999) em zonas semi-áridas ou áridas. A salinização primária é um fenômeno natural que envolve o acúmulo de sais através de processos naturais, devido ao alto teor de sal nos materiais originais ou nas águas subterrâneas (OWOJORI et al., 2008). Já a salinização secundária ocorre frequentemente como consequência do excesso de irrigação, causado pelo manejo inadequado das instalações de irrigação, más condições de drenagem interna do solo ou irrigação com água de baixa qualidade (YUAN et al., 2007).

O processo de salinização do solo afeta o rendimento das culturas e a biota do solo, levando a perdas econômicas. Também tem influência sobre o crescimento e a sobrevivência de microrganismos (LIPPI et al., 2000, YUAN et al., 2007), plantas (RAMOLIYA et al., 2004, KADUKOVA; KALOGERAKIS, 2007) e animais do solo (HOBEL et al., 1992). Sabe-se também que a distribuição e abundância de minhocas são influenciadas pela salinidade do solo em vários ecossistemas (LEE, 1985). Contudo, há pouca informação sobre o impacto da salinidade nas minhocas em diferentes solos (SHARIF et al., 2015; KRUPUKEE et al., 2016), sendo que não existem diretrizes da qualidade do solo para os invertebrados edáficos.

Para a espécie *P. corethrurus*, houve mortalidade das minhocas a partir de 1.2 mS cm⁻¹ (Figura 2), sendo que nos tratamentos com adição de Ca e P em pH natural e pH6,0 (Solo+Ca+P e Solo+Ca+P+pH6,0) a mortalidade foi de 92 e 100%, com valores de CE de 4,5 e 5,2 mS cm⁻¹, respectivamente. Raiesi et al. (2020) observaram mortalidade de 70% com a espécie *Eisenia fetida* em valores de CE acima de 4 mS cm⁻¹, e Owojori et al. (2008), encontraram doses letais (LD50) para *E. fetida* e *Aporrectodea caliginosa* em condutividades bem mais baixas (0,75 e 1,15 mS cm⁻¹, respectivamente. Contudo, houve rejeição ao solo por essas espécies em condutividades

bem menores (0,52 e 0,26 mS cm⁻¹ para ambas espécies, respectivamente), e a reprodução das mesmas foi também prejudicada em concentrações também muito mais baixas que as letais (0,29 mS cm⁻¹ para ambas). Como os organismos foram gravemente afetados pelos teores de sais no nosso experimento, não foi possível avaliar sua reprodução, que segundo Bright e Addison, (2002) é o parâmetro mais sensível à salinidade, sendo afetada em concentrações muito inferiores às que afetam o crescimento e a mortalidade. Contudo, maiores esforços deverão ser realizados para determinar o potencial ecotoxicológico da CE, não somente para *P. corethrurus*, mas também para outras espécies de minhocas, dado a escassez de trabalhos sobre o assunto, e o crescente problema de salinização em áreas onde podem ocorrer minhocas (KRUAPUKEE et al., 2016).

A mortalidade das minhocas, não parece ter sido devido a mudanças no pH, cujo valor no solo natural era de 4,22, enquanto que o solo com adição de MgO apresentou valores de pH de 6,20 (Tabela 3). A espécie apresenta tolerância a uma ampla faixa de pH (entre 4,6 e 6,6) como observado por Bernardes et al. (1997), Steffen (2012) e Knapper e Porto (1979), em diversos solos brasileiros. Contudo, no sul do Brasil, ela foi encontrada mais frequentemente em solos com pH<5 (STEFFEN, 2012), sendo que oito dos doze organismos coletados, estavam em solo de pH muito baixo. Mais bem, a mortalidade pode estar associada aos altos valores de sais como K e Ca nos solos com adição desses elementos. Os tratamentos com adição de P apresentaram altos teores de potássio (de 0,67 a 0,91 cmol_c dm⁻³) quando comparado aos solos naturais, devido à aplicação de fosfato dipotássico, que apresenta em sua fórmula duas moléculas de K (K₂HPO₄). A condução de corrente elétrica através do solo se deve à presença de sais livres na solução e íons trocáveis na superfície das partículas, tais como o K (FRIEDMAN, 2005). Desta forma, o aumento da CE observada nos tratamentos com adição do fosfato dipotássico, se deve ao aumento da salinidade da solução atribuído à aplicação das altas doses de adubo mineral (fosfato dipotássico).

A resposta tóxica observada neste estudo não pôde, contudo, ser totalmente explicada pelo alto teores de K na solução, pois nos tratamentos com adição de P concomitante com Ca, foi verificado maior efeito da salinidade com CE superiores (>4,5) e maior mortalidade, sendo que os teores de K foram inferiores aos tratamentos com adição somente de P (Tabela 3). Esse resultado pode ser explicado pelo efeito do Ca na condutividade. Como o tipo de sal envolvido depende da fonte aplicada, é

possível que outros sais além do K possam ser os principais compostos na toxicidade salina. Por exemplo, em estudo realizado em solos salinos em uma fazenda de cana-de-açúcar no Zimbábue, o Ca foi o cátion dominante no solo (RIETZ; HAYNES, 2003), sugerindo que os sais de Ca também podem determinar a toxicidade para os organismos edáficos. Este resultado sugere que os efeitos da salinidade dependem da composição do sal e que o uso de CE do solo somente não é um bom preditor de toxicidade para minhocas. Portanto, na avaliação de risco de solos salinos, seria importante avaliar adicionalmente os íons de sal que estão presentes no solo, para determinar a extensão da toxicidade para os animais do solo (OWOJORI et al., 2008).

Desta forma a diminuição da sobrevivência observada nos solos com maior condutividade elétrica ($CE \geq 2,3$) pode ser atribuída ao efeito direto do estresse osmótico nas minhocas bem como o efeito indireto sobre a microbiota do solo (JUAN et al., 2012; OWOJORI; REINECKE, 2014; BOYRAHMADI; RAIESI, 2018). O excesso de sais na solução ocasiona disponibilidade reduzida de água devido ao baixo potencial osmótico (WONG et al., 2008; MAVI et al., 2012). Portanto, nosso estudo mostrou que as minhocas podem ser afetadas negativamente em valores de CE consideradas seguras para muitas plantas. Para a proteção dos organismos do solo contra a salinidade, é necessário realizar mais estudos com organismos em diferentes níveis, representando uma maior amplitude de animais pertencentes à biota do solo. Os resultados também chamam a atenção aos potenciais perigos à fauna edáfica da aplicação de grandes quantidades de adubos contendo sais, a solos com baixo poder tampão e baixo teor de matéria orgânica.

3.6.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COPRÓLITOS (ENSAIO 2)

Os coprólitos de *P. corethrus* apresentaram aumento de pH em relação aos solos controle em vários tratamentos, mesmo onde houve ajuste do pH para 6. Esse aumento pode ser atribuído à excreção de carbonato de cálcio pelas glândulas calcíferas da minhoca, após o solo ser ingerido (VERSTEEGH et al., 2014). A minhoca *P. corethrus* pertence a família Rhinodrilidae, e apresenta três pares de glândulas calcíferas de forma tubular paniculada nos segmentos 7, 8 e 9 (RIGHI, 1990). Muitos autores têm encontrado aumento no pH dos coprólitos de minhocas, quando comparados ao solo de origem (CLAUSE et al., 2016; FIUZA et al., 2011, HMAR;

RAMANEIJAM, 2014). Essa mudança no pH pode ser explicada pela fisiologia de cada espécie estudada, sendo relacionada comumente à presença de glândulas calcíferas.

A partir dos primeiros trabalhos de Darwin (1881), várias hipóteses foram propostas em relação a produção de carbonato de cálcio nas glândulas calcárias. Briones et al. (2008) propôs que as glândulas seriam responsáveis por eliminar o excesso de cálcio da dieta, através da fixação de dióxido de carbono (CO_2) para formar CaCO_3 . Essa liberação de carbonato de cálcio, por sua vez, age na neutralização de ácidos húmicos ingeridos na serapilheira, tornando-a mais nutritiva (BRIONES et al., 2007). Foi sugerido que a secreção de CaCO_3 aumenta com a ingestão de alimentos ácidos (DARWIN, 1881; HARRINGTON, 1899), no entanto, não foi observada diminuição na atividade das glândulas de minhocas que vivem em solos alcalinos (BAL, 1977). Segundo Claparède (1869), as concreções minerais (CaCO_3) poderiam ajudar a triturar os alimentos na moela, enquanto Michaelsen, (1928) sugeria que a função primária seria na absorção de alimentos. Outra sugestão interessante é a de Puytorac e Pinon (1960) e Chapron (1971), de que a glândula poderia ter um papel importante na regulação da água no corpo, atuando como uma barreira para reduzir a perda de água. Essa ideia levou M'Dowall (1926) a concluir que a presença de glândulas calcíferas nos oligoquetos seria uma adaptação evolutiva à existência em habitats terrestres aeróbicos. Alguns estudos mais recentes supõem que as glândulas estejam relacionadas com a regulação de pH e concentrações de CO_2 nos fluidos corporais (VERSTEEGH et al., 2014).

A presença de glândulas calcíferas, além de influenciar no pH, também pode aumentar os teores de Ca disponível nos coprólitos (EDWARDS; BOHLEN, 1996). Em nosso ensaio, observou-se aumento no teor de Ca nos coprólitos presentes em 6 tratamentos, mesmo quando houve adição de Ca. O aumento no teor de Ca, assim como Mg nos coprólitos de minhocas tem sido observado por diversos autores (FIUZA et al., 2011; QUADROS et al., 2002; MATERECHERA et al., 1998; HULUGALLE; EZUMAH, 1991). O acréscimo no teor de Ca pode estar relacionado com a liberação de carbonato de cálcio pelas glândulas calcíferas, ocasionando aumento de pH e na disponibilidade de Ca nos coprólitos.

Além do efeito da liberação de carbonato de cálcio nos teores de Ca dos coprólitos, as minhocas podem aumentar o teor do elemento nos coprólitos devido essencialmente ao processo de concentração da fertilidade. As minhocas tendem a ser

seletivas na escolha de seus alimentos (CURRY; SCHMIDT, 2007), e sua escolha de dieta é baseada, principalmente, nas propriedades bioquímicas do resíduo e partículas de solo (NEILSON; BOAG, 2003), bem como no tamanho (LOWE; BUTT, 2003), idade (SATCHELL, 1967) e população microbiana do resíduo e solo (COOKE; LUXTON, 1980; MOODY et al., 1995). Desta forma, algumas espécies de minhocas ingerem restos vegetais mais ricos em Ca, ou partículas de solo mais ricas em nutrientes, ocasionando a concentração dos nutrientes em seus coprólitos, aumentando assim a fertilidade dos mesmos. Esse efeito de concentração ficou evidente nos teores de Ca dos coprólitos presentes nos solos com adição de corretivos, onde foi verificado incremento superior aos teores encontrados nos coprólitos presentes em solo natural (Figura 4). Contudo, curiosamente, quando houve uso de fontes naturais de Ca, como o espinho de peixe e a farinha de osso, foi observado o contrário, com uma diminuição dos teores de Ca nos coprólitos (espinho+pH6,0 e FO+pH6,0). Nesse caso, a presença de Ca na forma de osso moído (apatita) parece ter tido um efeito inverso na disponibilização de Ca disponível nos coprólitos, e as minhocas não tiveram efeito estimulante mineralizador no Ca presente nos ossos.

Os efeitos das minhocas na disponibilidade de P no solo já é bem conhecida (LE BAYON; MILLERET, 2009), e López-Hernández et al. (1993), relataram aumento de 2,7 vezes no P solúvel nos coprólitos de *P. corethrurus*. No nosso ensaio, houve aumento nos teores de P nos coprólitos em vários tratamentos. Esse aumento pode ser atribuído ao processo de mineralização da matéria orgânica ocorrida no interior do trato intestinal das minhocas, convertendo o nutriente em formas mais disponíveis para as plantas (GHOSH et al., 1999). Os microrganismos presentes no intestino da minhoca também desempenham papel importante, através da transformação de compostos fosfatados, por meio de reações de solubilização do fósforo inorgânico e da mineralização do fósforo orgânico formando, assim, o fosfato solúvel (BERTON et al., 1997; PRAKASH et al., 2010). Além disso, as minhocas fragmentam e homogeneizam o material ingerido através da ação muscular, adicionando muco e enzimas, aumentando assim a área de superfície para a ação microbiana. Bayon e Binet (2006) verificaram que a incorporação de MO feita pelas minhocas e a construção de galerias, aumentou a atividade das fosfatases, em função do enriquecimento de C e N nos túneis (muco e uréia), e também pela entrada de O₂, que aumentaram a atividade microbiana.

As minhocas também são responsáveis por aumentar a atividade de fosfatase alcalina no solo, sendo que algumas espécies produzem essas enzimas no intestino,

sendo excretada também nos coprólitos (VINOTHA et al., 2000). Como resultado do aumento da atividade de fosfatases, ocorre diminuição do P orgânico e aumento no P inorgânico, sendo o conteúdo de P total inalterado na maioria dos casos (BAYON; BINET, 2006). Finalmente, o aumento de P disponível nos coprólitos pode também ser atribuído às mudanças no complexo de sorção, induzidas pela competição entre ortofosfatos e os grupos carbóxilo das glicoproteínas, liberadas no muco, produzidas no intestino das minhocas (LÓPEZ-HÉRNANDEZ et al., 1993).

Outro elemento com teores frequentemente afetados nos coprólitos é o K (HMAR; RAMANUJAM, 2014; QUADROS et al., 2002; MATERECHERA et al., 1998; BASKER et al., 1993). Contudo, em nosso ensaio observou-se diferença no teor desse elemento em apenas dois tratamentos (CP+P e CP+Ca+P). O aumento na disponibilidade desse elemento nos coprólitos pode ser devido ao efeito de concentração. As minhocas são seletivas em sua alimentação, tendem a escolher partículas de solo com propriedades bioquímicas superiores e maior população microbiana (CURRY; SCHMIDT, 2007), ocasionando a produção de coprólitos com maiores teores de nutrientes em relação ao solo ingerido.

As diferenças no carbono orgânico nos coprólitos depende grandemente das fontes de alimento das minhocas, sendo que as espécies endogeicas podem ter efeitos contrastantes, dependendo de se mostram ingestão seletiva de partículas mais ricas em matéria orgânica, como as argilas (BAROIS et al., 1999). A espécie *P. corethrurus* pode fazer seleção de partículas em alguns solos (por ex., solos mais arenosos), e em outras ocasiões não (DUARTE et al., 2014). No nosso caso, sendo um solo altamente argiloso e siltoso, houve aumento no teor de C nos coprólitos em apenas um tratamento.

Além disso, o C nos coprólitos pode estar em formas mais ou menos estáveis, dependendo do tipo de coprólito excretado; os coprólitos de espécies compactantes (BLANCHART et al., 1997) tendem a ser mais estáveis e poderiam servir como sequestradores potenciais de C em longo prazo (ZHANG et al., 2013; MARTIN et al., 1992). Já os coprólitos de espécies descompactantes são mais soltos e menos resistentes à desagregação e, portanto, o C presente nos mesmos é menos estável (BOSSUYT et al., 2005; BERNARD et al., 2012). Contudo, o C nos coprólitos também é dependente dos processos de estimulação da atividade microbiana no intestino e no coprólito, o que também é altamente variável dependendo da espécie, mas razoavelmente bem conhecido para *P. corethrurus* (BAROIS; LAVELLE, 1986; CHAPUIS-LARDY et al., 2010; MEDINA-SAUZA et al., 2019). *P. corethrurus* é uma espécie compactante, que

produz coprólitos com alta densidade (CHAUVEL et al., 1999; BAROIS et al., 1999), além de alta atividade microbiana, o que facilita a mineralização de P e N (PASHANASI et al., 1992; CHAPUIS-LARDY et al., 1998), e emissão de CO₂ e N₂O através de uma interação positiva (*priming effect*) com os microorganismos (BERNARD et al., 2012; BRAGA et al., 2016).

O C ingerido pelas minhocas permanece nos excrementos, aumentando as taxas de mineralização dos nutrientes por um curto período de tempo, até os coprólitos começarem a secar e, então, a decomposição da matéria orgânica, a mineralização de nutrientes, e a atividade microbiana tende a estabilizar (MARTIN et al., 1992), atingindo muitas vezes, níveis inferiores aos observados no solo não ingerido (BROWN et al., 2000). Essa sequência de acontecimentos é importante para a ciclagem de MO, estoque de C no solo, e para formação dos macro e microagregados (LAVELLE et al., 2006).

A CTC, a soma de bases e a saturação por bases foi aumentada nos coprólitos de *P. corethrurus* em muitos dos tratamentos, mas em alguns houve efeito contrário. Normalmente, o aumento na disponibilidade de cátions nos coprólitos aumenta a soma de bases, assim como a CTC e V%. Esses aumentos levam, frequentemente, à colonização de raízes das plantas nos coprólitos, que se beneficiam dos nutrientes mais disponíveis. Sendo assim, constatamos que *P. corethrurus* tem papel importante na disponibilidade de nutrientes, em especial nos dois mais abundantes nutrientes encontrados nos solos TPI: P e Ca, e que os efeitos positivos para ambos esses nutrientes foram maiores, especialmente nos tratamentos contendo adição dos mesmos. Isso mostra que as minhocas possuem um efeito potencializador na disponibilização desses nutrientes, quando eles estão presentes em maior quantidade no substrato/solo ingerido. Também, mostra o potencial das minhocas *P. corethrurus* como bioestimuladoras da fertilidade do solo e do crescimento vegetal em TPIs, assim como na construção de Terra Preta Nova (SOMBROEK et al., 2003; MADARI, et al 2004), algo que merece maior esforço de pesquisa.

3.6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSA (EDS) DOS COPRÓLITOS

A formação de carbonato de cálcio nas glândulas calcíferas das minhocas é um caso notável de biomineralização (GAGO-DUPORT et al., 2008), embora o mecanismo específico envolvido na produção de carbonato de cálcio por minhocas permaneça desconhecido. O carbonato de cálcio encontrado nas minhocas está presente predominantemente na forma de calcita, mas também como aragonita, vaterita e carbonato de cálcio amorfo (GAGO-DUPORT et al., 2008; LEE et al., 2008). Segundo Lambkin et al. (2011), a taxa de produção de grânulos de carbonato de cálcio apresenta variação significativa entre minhocas e entre tipos diferentes de solos. No entanto, eles verificaram que a dissolução da calcita no solo aumenta em pH ácido. Portanto, dificilmente em solos muito ácidos como aquele utilizado aqui (e também de muitos solos brasileiros), será possível encontrar grânulos de carbonato de cálcio, proveniente das glândulas das minhocas.

Contudo, as glândulas esofágicas onde os grânulos são precipitados inicialmente não têm contato direto com o solo. Posteriormente ocorre um “vazamento” do material presente dentro das glândulas para o solo, provavelmente quando o esfíncter se abre e um grânulo é expelido (LAMBKIN et al., 2011), ocasionando alterações no pH e nos teores de Ca no solo.

As imagens de MEV e EDS do solo sem adição de minhocas não apresentou o elemento Ca, mas esse esteve presente nos coprólitos. A presença desse elemento no coprólito é um forte indicativo da liberação de carbonato de cálcio através das glândulas calcíferas das minhocas *P. corethrurus*. O espectro de EDS da parte interna da glândula calcífera também apresentou o elemento Ca, comprovando assim a capacidade das glândulas calcíferas dessa espécie em produzir e liberar ao solo carbonato de cálcio. As células secretoras produzem uma suspensão concentrada de carbonato de cálcio (CaCO_3), comumente chamado de "fluido leitoso", que passa adiante para as bolsas esofágicas onde precipita como concreções de carbonato de cálcio, sendo então liberado no intestino e finalmente no solo (GAGO-DUPORT et al., 2009), alterando suas propriedades químicas.

As minhocas da espécie *P. corethrurus* produzem CaCO_3 e são comumente encontradas em solos de TPI, representando cerca de 42% dos indivíduos coletados nos solos antrópicos (CUNHA et al., 2016). Considerando a alta biomassa que essas minhocas podem representar nesses solos, e sua capacidade de produzir e liberar

CaCO₃, podemos inferir que estes organismos podem ter importante papel na ciclagem de C e Ca no solo, bem como na alteração do pH das TPIs.

3.7 CONCLUSÃO

As minhocas apresentaram importante efeito positivo sobre a disponibilidade de vários nutrientes no solo natural e com adição de corretivos, com aumento principalmente nos valores de pH e nos teores de Ca e P, após passagem pelo trato intestinal. Nos espectros de EDS das glândulas calcíferas foram detectados picos de Ca, bem como nos coprólitos das minhocas, indicando a produção e liberação de CaCO₃ aos solos, fator que influenciou na disponibilidade de nutrientes.

3.8 REFERÊNCIAS:

ANDERSON, J.M.; INGRAM, J. Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods. Oxford: CAB International, 1993.

AYARS, J.E.; TANJI, K.K. Effects of drainage on water quality in arid and semi arid lands. In: Skaggs, R.W., van Schilfgaarde, J. (Eds.), **Agricultural Drainage**. ASA-CSSASSSA, Madison, p. 831–867, 1999.

BAL, L. The formation of carbonate nodules and intercalary crystals in the soil by the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Pedobiologia**, v. 17, p. 229-240, 1977.

BAROIS, I.; VILLEMEN, G.; LAVELLE, P.; TOUTAIN, F. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. **Geoderma**, v. 56, p. 57- 66, 1993.

BARTHOD, J.; DIGNAC, M.F.; MER, G.L.; BOTTINELLI, N.; RUMPEL, C. How do earthworms affect organic matter decomposition in the presence of clay-sized minerals? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 143, 2020.

BERNARD, L.; CHAPUIS-LARDY, L.; RAZAFIMBELO, T.; RAZAFINDRAKOTO, M.; PABLO, A-L.; LEGNAME, E. Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil, 213–222, 2012.

BERTRAND, M.; BLOUIN, M.; BAROT, S.; CHARLIER, A.; MARCHAND, D.; ROGER-ESTRADE, J. Biocontrol of eyespot disease on two winter wheat cultivars by an anoxic earthworm (*Lumbricus terrestris*). **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 33-41, 2015.

BLANCHART, E.; LAVELLE, P.; SPAIN, A. Effects of the biomass and size of *Millsonia anomala* (Oligochaeta: Acanthodrilidae) on particle aggregation in a tropical

soil in the presence of *Panicum maximum* (Graminae). **Biol. Fert. Soils**, v. 10, p. 113, 1990.

BLOUIN, M.; HODSON, M.E.; DELGADO, E.A.; BAKER, G.; BRUSSAARD, L.; BUTT, K.R.; DAI, J.; DENDOOVEN, L.; PERES, G.; TONDOH, J.; CLUZEAU, D.; BRUN, J.J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. **European Journal of Soil Science**, v. 64, p. 161-182, 2013.

BOYRAHMADI, M.; RAIESI, F. Plant roots and species moderate the salinity effect on microbial respiration, biomass, and enzyme activities in a sandy clay soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, p. 509–521, 2018.

BROSSARD, M.; LAVELLE, P. E. J. Y. LAURENT. Digestion of a vertisol by the endogeic earthworm (*Polypheretima elongata*, Megascolecidae) increases soil phosphate extractability. **European Journal of Soil Biology**, v. 32, p. 107–111, 1996.

BROWN, G.G E DOMINGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – O 3º Encontro Latino Americano de Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zool. Mexicana**, v. 2, p. 1-18, 2010.

BROWN, G.G.; PASHANASI, B.; GILOT, C.; PATRÓN, J.C.; SENAPATI, B.K.; GIRI, S.; BAROIS, I.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; BLAKEMORE, R.J.; SPAIN, A.V.; BOYER, J. Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P. (Eds.). **Earthworm Management in Tropical Agroecosystems**, p. 87-147, 1999.

CANTI, M.G.; PIEARCE, T.G. Morphology and dynamics of calcium carbonate granules produced by different earthworm species. **Pedobiologia**, v. 47, p. 511–521, 2002.

CLAUSE, J.; FOREY, E.; LORTIE, C.J. (2015). Lambert AM. & Barot S. Non-native earthworms promote plant invasion by ingesting seeds and modifying soil properties. *Acta Oecologica* 64, 10–20.

COULIS, M.; BERNARDI, L.; GÉRARD, F.; HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; VILLENEUVE, M.; BLANCHERT, E. Endogeic earthworms modify soil phosphorus, plant growth and interactions in a legume–cereal intercrop. **Plant and Soil**, v. 379, p. 149–160, 2014.

CUNHA, L.; BROWN, G.G.; STANTON, D.W.G.; DA SILVA, E.; HANSEL, F.A.; JORGE, G.; MCKEY, D.; VIDAL-TORRADO, P.; MACEDO, R.S.; VELASQUEZ, E.; JAMES, S.W.; LAVELLE, P.; KILLE, P.; the Terra Preta de Indio Network Soil Animals and Pedogenesis: The Role of Earthworms in Anthropogenic Soils. **Soil Science**, v. 181, p. 110–125, 2016.

DA SILVA, E.; NAHMANI, J.; LAPIED, E.; ALPHONSE, V.; GARNIER-ZARLI, E.; BOUSSERRHINE, N. Toxicity of mercury to the earthworm *Pontoscolex corethrurus* in a tropical soil of French Guiana. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 79-84, 2016.

DARWIN, C. The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. Murray, London, 1881.

DUARTE, A.P.; MELO, V.F.; BROWN, G.G.; PAULETTI, V. Earthworm (*Pontoscolex corethrurus*) survival and impacts on properties of soils from a lead mining site in Southern Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, p. 851–860, 2014.

EMBRAPA, Centro de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 1999, p. 412 .

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N.B. A Fertilidade dos Solos de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. *In*: Teixeira, W. G., Kern, D. C., Madari, B. E., Lima, H. N., Woods, W. I. (eds.). As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 285-296, 2009.

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**, v. 35, p. 723-728, 2011.

FRAGOSO, C.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; SENAPATI, B.K.; JIMENEZ, J.J.; MARTINEZ, M.A.; DECAËNS, T.T. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. *In*: Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P. (Eds.), Earthworm Management in Tropical Agroecosystems. Oxon: CAB International, p. 27-55, 1999.

FRIEDMAN, S.P. Soil properties influencing apparent electrical conductivity: a review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 48, p. 49-54, 2005.

GAGO-DUPORT, L.; BRIONES, M.J.I.; RODRÍGUEZ, J.B.; COVELO, B. Amorphous calcium carbonate biomineralization in the earthworm's calciferous gland: Pathways to the formation of crystalline phases. **Journal of Structural Biology**, v. 162, p. 422–435, 2008.

GUZYTE, G.; SUJETOVIENE, G.; ZALTAUSKAITE, J. Effects of salinity on earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Engineering**, p. 19-20, 2011.

HMAR, L.; RAMANUJAM, S. Earthworm cast production and physico-chemical properties in two agroforestry systems of Mizoram (India). **Trop. Ecol.**, v. 55, p. 77-86, 2014.

HUANG, K.; XIA, H. Role of earthworms mucus in vermicomposting system: Biodegradation tests based on humification and microbial activity. **Science of The Total Environment**, p. 703-708, 2019.

JAMES, S.W.; BARTZ, M.L.C.; STANTON, D.W.G.; CONRADO, A.C.; DUPONT, L.; TAHERI, S.; SILVA, E.; CUNHA, L.; BROWN, G.G. A neotype for *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Clitellata). **Zootaxa**, v. 4545, p. 124-132, 2019.

JOUQUET, P.; DAUBER, J.; LAGERLÖF, J.; LAVELLE, P.; LEPAGE, M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. **Appl. Soil Ecol.**, v. 32, p. 153-64, 2006.

JUAN, T.; WEI, G.; GRIFFLITHS, H. Z. Maize residue application reduces negative effects of soil salinity on the growth and reproduction of the earthworm *Aporrectodea trapezoides*, in a soil mesocosm experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, v.49, p. 46-51, 2012.

KADUKOVA, J.; KALOGERAKIS, N. Lead accumulation from non-saline and saline environment by *Tamarix smyrnensis* Bunge. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. 216–223, 2007.

KALE, R.D.; KRISHNAMOORTHY, R.V. The calcium content of the body tissues and castings of earthworm *Pontoscolex corethrurus*. **Pedobiologia**, v. 20, p. 309-315. (1990).

KLAR, A.E. A água no sistema solo–planta–atmosfera, v. 2, p. 408, 1988.

KNAPPER, C.F.U.; PORTO, R.P. Ocorrência de Oligochaeta nos solos do Rio Grande do Sul. **Acta Biol. Leopoldensia**, v. 1, p. 137-166, 1979.

KORBOULEWSKY, N.; PEREZ, G.; CHAUVAT, M. How tree diversity affects soil fauna diversity: A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 94, p. 94-106, 2016.

KRISHNAMOORTHY, R.V.; VAJRANABAHAIH, S.N. Biological activity of earthworm casts: an assessment of plant growth promoter levels in the casts. Proceedings of the Indian Academy of Sciences. **Animal Sciences**, v. 95, p. 341-351, 1986.

KRUAPUKKEE, A.; BOONTHAIWAI, C.; KAEWJAMPA. Earthworms communities and Activities in Rice Ecosystem under different soil salinity levels in Northeast Thailand. **International Journal of Environmental and Rural Development**, p. 7-2, 2016.

LARDO, E.; PALESE, A.; AROUS, A.; XILOYANNIS, C. Apparent Electrical Conductivity as a Tool for earthworms parameters evaluation in a commercial orchard. **Acta Horticulturae**, 2015.

LAVELLE, P.; CHAUVEL, A.; FRAGOSO, C. Faunal activity in acid soils. In: Date RA, Grundon NJ, Rayment GE, Probert ME, editors. **Plant–Soil Interactions at Low pH: Principles and Management**. 1st ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 201-211, 1995.

LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biol. Fertil. Soils**, v. 3, p. 237-251, 1988.

LAVELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P. E ROSSI, J.-P. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S3-S15, 2006.

LEE, M.R.; HODSON, M.E.; Langworthy, G.N. Crystallization of calcite from amorphous calcium carbonate: Earthworms show the way. **Mineralogical Magazine**, v. 72, p. 257–261, 2008.

LIMA, H.N.; SCHAEFER, C.E.G.R.; KÄMPF, N.; COSTA, M.L.; SOUZA, K.W. Características Químicas e Mineralógicas e a Distribuição de Fontes de Fósforo em Terras Pretas de Índio da Amazônia Ocidental. In: TEIXEIRA, W. G., KERN, D. C., MADARI, B. E., LIMA, H. N., WOODS, W. I. (Ed.). As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009, p. 285-296.

LIPPI, D.; DE PAOLIS, M.R.; DI MATTIA, E.; GREGO, S.; PIETROSANTI, T.; CACCIARI, I. Effect of salinity on growth and starvation—survival of a tropical *Rhizobium* strain. **Biol. Fert. Soils**, v. 30, p. 276–283, 2000.

MADARI, B.E. Research on anthropogenic Dark Earth Soils. Could it be a solution for sustainable agricultural development in the Amazon? In: Glaser, B., Woods, W. I. (Eds.), Amazonian Dark Earths: Explorations in space and time. Berlin: **Springer**, p. 169-181, 2004.

MAVI, M.S.; MARSCHNER, P.; CHITTLEBOROUGH, D.J.; COX, J.W.; SANDERMAN, J. Salinity and sodicity affect soil respiration and dissolved organic matter dynamics differentially in soils varying in texture. **Soil Biol. Biochem.**, v. 45, p. 8–13, 2012.

MICHAELSEN, W.; DIE. Lumbricidenmit besonderer Berücksichtigung der bisher als familie Glossocolecidae zusammengefabter Unterfamilien. Zoologische Jahrbucher Abteilung fur Systematik, **Geographie und Biologie der Tierre**, v. 41, p. 1-398, 1918.

MOODY, S.A.; BRIONES, M.J.I.; PEARCE, T.G.; DIGHTON, J. Selective consumption of wheat straw by earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 1209-1213, 1995.

NEILSON, R.; BOAG, B. Feeding preferences of some earthworm species common to upland pastures in Scotland. **Pedobiologia**, v. 47, p.1–8, 2003.

OWOJORI, O.J.; REINECKE, A.J.; ROZANOV, A.B. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 40, p. 2385–2393, 2008.

OWOJORI, O.J.; REINECKE, A.J. Differences in ionic properties of salts affect saline toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*, v. 83, p. 247-252, 2014.

PRAKASH, M.; BALAMURUGAN, M.; PARTHASARATHI, K.; GUNASEKARAN, G.E.L.; COOPER, L.S.; RANGANATHAN. Anti-ulceral and anti-oxidative properties of earthworm paste of *Lampito mauritii* (Kinberg) on *Rattus norvegicus*. **European Review Medical Pharmacology Science**, v. 11, p. 9-15, 2007.

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*, n. 45, p. 29-39, 2002.

RAIESI, F.; MOTAGLIAN, H.R.; NAZARIZADEH, M. The sublethal lead (Pb) toxicity to the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta) as affected by NaCl salinity and manure addition in a calcareous clay loam soil during an indoor mesocosm experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.190, 2020.

RAMOLIYA, P.J.; PANDEY, A.N. Effect of increasing salt concentration on emergence, growth and survival of seedlings of *Salvadora oleoides* (Salvadoraceae). **J. Arid Environ.**, v. 51, p. 121–132, 2002.

RIETZ, D.N.; HAYNES, R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. **Soil Biol. Biochem.**, v. 35, p. 845-854, 2003.

ROCHA, F.R.F. Influência da salinidade da água de rega na sobrevivência da minhoca. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 81-88, 2007.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. **J. Soils Sedim.**, v. 2, p. 79-84, 2003.

SCHIRRMANN, M.; JOSCHKO, M.; GEBBERS, R.; KRAMER, E.; ZORNER, M.; BAARKUSKY, D.; TIMMER, J. Proximal Soil Sensing – A Contribution for Species Habitat Distribution Modelling of Earthworms in Agricultural Soils? **PlosOne**, 2016.

SEGALLA, R.F. Atributos químicos e físicos de Terras Pretas de Índio e solos adjacentes. 2017 (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná.

SHARIF, S.; SHOAE, A.; MOJAZIAMIRI, B.; FARAHMAND, H. The Effects of Brackish Water on Growth Hormone/Insulin-like Growth Factor-1 Gene Expression of the Caspian Trout, *Salmotrutta caspius* (Kessler, 1877), During the Early Stage of Smoltification. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 46, p. 201-209, 2015.

SHARPLEY, N.A.; SYERS, J.K. Potential role of earthworm casts for the phosphorus enrichment of run off waters. **Soil Biology Biochemistry**, v. 8, p.341-346, 1976.

SHIPITALO, M.J. E PROTZ, R. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. **Geoderma**, v. 45, p. 357-374, 1989.

SOMBROEK, W. Amazonian Dark Earths as carbon stores and sinks In: Lehmann, J. et al (Eds.). Amazonian Dark Earths: origin, properties and management. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p.139:125, 2003.

STEFFEN, G.P.K. Diversidade de minhocas e sua relação com o ecossistema naturais e alterados no estado do Rio Grande do Sul. (Tese de Doutorado). 2012. Universidade FEDERAL DE SANTA MARIA.

SUAREZ, E.R.; PELLETIER, D.M.; FAHEY, T.J.; GROFFMAN, P.M.; BOHLEN, P.; FISK, M.C (EFFECTS of Exotic Earthworms on Soil Phosphorus Cycling in Two Broadleaf Temperate Forests. **Ecosystems**, v. 7, p. 28–44, 2003.

Versteegh, E.A.A.; Black, S.; Hodson, M.E. Carbon isotope fractionation between amorphous calcium carbonate and calcite in earthworm-produced calcium carbonate. **Applied Geochemistry**, v. 78, p. 351-356, 2017.

VINOTHA, S.P.; PARTHASARATHI, K.; RANGANATHAN, L.S. Enhanced phosphatase activity in earthworm casts is more of microbial origin. **Current Science**, v. 79, p.1158-1159, 2000.

WONG, V.N.L.; DALAL, R.C.; GREENE, R.S.B. Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. **Biol Fertil Soils**, 2008.

YUAN, B.; LI, Z.; LIU, H.; GAO, M.; ZHANG, Y. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. **Appl. Soil Ecol.**, v.35, p.319–332, 2007.

4 CAPÍTULO III: MONTAGEM E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE TPI SIMULADO EM CASA DE VEGETAÇÃO: INFLUÊNCIA DOS DIVERSOS COMPONENTES DA TPI NA PRODUÇÃO DE MILHO

4.1 RESUMO

Durante o Holoceno, os seres humanos alteraram profundamente os padrões globais de biodiversidade e dinâmica dos ecossistemas. Os níveis do século XXI de esgotamento de recursos induzidos pelo homem e mudanças climáticas globais são surpreendentemente altos, e as crescentes demandas globais por alimentos e energia estão tornando cada vez mais importante a investigação de formas alternativas e sustentáveis de usar os recursos. Existem vários exemplos de sistemas antigos de uso da terra em paisagens transformadas pelo homem que foram capazes de apoiar milhões de pessoas sem perda aparente de biodiversidade e resiliência do ecossistema. A Terra Preta de Índio é um solo antropogênico, altamente enriquecido com nutrientes pela ação humana, com uma excelente capacidade de sequestro de carbono, produção agrícola e resiliência à desertificação. As TPIs têm sido propostas como um modelo alternativo para uma agricultura sustentável nos trópicos, porém sua gênese envolve longos períodos de tempo e o papel da fauna edáfica e da interação entre os seus diferentes componentes ainda são muito mal compreendidas.

Neste estudo, um experimento fatorial fracionado foi desenvolvido em casa de vegetação, para identificar a influência de cinco componentes importantes presentes nas TPIs (minhocas, biochar, matéria orgânica fresca, cerâmica e espinha de peixe) sobre as características químicas do solo, crescimento e teor de nutrientes nas plantas de milho. A presença de minhocas, matéria orgânica e espinha de peixe tiveram grande efeito sobre as características químicas dos solos bem como no crescimento e teor de nutrientes nas plantas. Esses efeitos benéficos se devem às transformações que ocorrem na química do solo após a passagem pelo trato intestinal das minhocas, assim como aos aportes de nutrientes ocasionados pela adição de matéria orgânica fresca e espinha de peixe. As interações entre esses fatores apresentaram efeito sinérgico sobre o crescimento de plantas e fertilidade do solo, indicando a complexidade dos processos que ocorreram e ocorrem nos solos TPI. Estes resultados ajudam na compreensão do sistema e potencializam a aplicabilidade e replicação de um modelo alternativo e mais sustentável de uso e terra nos trópicos, com crucial importância para o desenvolvimento sustentável da Amazônia.

Palavras-chave: Agricultura sustentável, fatorial fracionado, fertilidade, TPI.

4.2 ABSTRACT

During the Holocene, human beings profoundly altered global patterns of biodiversity and ecosystem dynamics. The 21st century levels of human-induced resource depletion and climate change are surprisingly high and growing global demands for food and energy are

increasingly important in investigating alternative and sustainable ways of using resources. There are several examples of ancient land use systems in man-made landscapes that have supported millions of people without loss of biodiversity and ecosystem resilience. The Amazon Dark Earths are anthropogenic soils highly enriched with nutrients by human action, with an excellent potential for carbon sequestration, agricultural production and resilience to desertification. The ADEs have been proposed as alternative models for sustainable agriculture in the tropics, but their genesis involves long time periods, and the role of soil animals and the interaction between its various components are not well understood.

In this study, a fractional factorial experiment was developed in the greenhouse to identify the influence of five important components present in ADEs (earthworms, biochar, fresh organic matter, ceramics and fishbones) on the chemical soil characteristics, growth and nutrient contents of corn plants. The presence of earthworms, fresh organic matter and fish bones had a major impact on soil chemical characteristics, as well as plant growth and nutrient content. These beneficial effects are due to soil chemical transformations after passing through the intestine of earthworms, as well as the addition of nutrients with fresh organic matter and fish bones. The interactions between these factors had a synergistic effect on plant growth and soil fertility, and highlight the complexity of the processes that occurred and still occur in ADEs. These results also help better understand the system and enhance the applicability and replication of an alternative and more sustainable model of land use in the tropics, of crucial importance for the sustainable development of the Amazon.

Keywords: Sustainable agriculture, fractional factorial, fertility, ADEs.

4.3 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas amazônicos são caracterizados pela baixa fertilidade natural dos solos predominantes, em decorrência da alta umidade e temperatura que ocorre na região, ocasionando a formação de solos altamente intemperizados (GLASER; BIRK, 2012). No entanto em toda Amazônia são encontradas manchas de solos de coloração escuras, normalmente contendo pedaços de cerâmicas, recobrando em sua grande maioria solos caulíníticos, denominados de Terra Preta de Índio (TPI) (FALCÃO et al., 2003).

Estes solos apresentam propriedades contrastantes com a maioria dos solos encontrados na região, com grandes estoques de matéria orgânica (MO) e altos níveis de macro e micronutrientes (GLASER et al., 2001, SEGALLA, 2017), devido ao descarte de resíduos orgânicos feito pelos povos pré-colombianos, responsáveis pela criação desses solos férteis. A alimentação desses povos com mandioca, açaí, talos e folhas, além de produtos animais como mamíferos, peixes, carangueijos e conchas, produziram grande quantidade de resíduos que foram depositados no local (WOOD; MCCANN, 1999). A incorporação de excrementos humanos (ricos em P e N), resíduos animais incluindo ossos de mamíferos e

peixes (ricos em P e Ca), resíduos de cinzas de combustão incompleta (ricos em Ca, Mg, K e P) e biomassa de plantas terrestres e aquáticas (GLASER, 2007), elevaram não somente os teores de MO, mas também a disponibilidade de nutrientes para as plantas, como o P, K, Ca e Mg nas TPIs (KERN, 2001).

O húmus nas TPIs é seis vezes mais estável à decomposição que aquele encontrado nos Latossolos (PABST, 1991). A maior estabilidade da MO é devido ao biocarvão presente nesses solos (SOMBROEK, 1966, SALDARRIAGA; WEST, 1986, GLASER et al., 2000), advindo das fogueiras domésticas dos povos pré-colombianos. A estrutura química do carvão é caracterizada pela presença de compostos aromáticos, responsáveis pela estabilidade prolongada contra a degradação microbiana (GLASER et al., 2007). Contudo, mesmo após oxidação parcial o biochar continua atuando na retenção de nutrientes (GLASER et al., 2001). Além disso, sua estrutura física é altamente porosa garantindo uma maior retenção de água no solo (PIETIKAËINEN et al. 2000). Estudos com a incorporação de biochar no solo tem mostrado importantes efeitos sobre o funcionamento e a fertilidade do solo, dando origem ao conceito de Terra Preta Nova (TPN), e ao desenvolvimento de esforços para aumentar o uso de biochar na agricultura (GLASER et al., 2007). Contudo, a contribuição do biochar depende muito do material de origem (LEHMANN et al., 2009). e alguns autores chamam a atenção à necessidade de cuidar para que não tenha efeitos nocivos sobre a biota do solo, como as minhocas (GOMEZ-EYLES, 2011).

O carvão pirogênico encontrado nos solos das TPIs foi incorporado e processado ao longo dos anos pela biota edáfica, incluindo as minhocas, importantes engenheiros do solo. Através da bioturbação, as minhocas movem as partículas de biochar entre os horizontes do solo, misturando as frações orgânicas e inorgânicas, alterando a porosidade, aeração, e a infiltração de água no solo (BLOUIN et al., 2013). Essa movimentação é frequentemente observada nas TPIs, onde as galerias produzidas pelas minhocas apresentam coloração mais escura sobrepondo os horizontes Bt de coloração mais clara, devido a incorporação da MO e pequenos pedaços de carvão.

Também existem evidências do papel importante das minhocas na disponibilidade de P e Ca, nutrientes encontrados em maior abundância nas TPIs. Coprólitos de minhocas da espécie *Pontoscolex corethrurus* geralmente apresentam níveis mais altos de P orgânico do que solos circundantes e a ingestão seletiva de partículas de solos enriquecidas com P, bem como as alterações nas formas do nutriente após passagem pelo trato intestinal resultam em P

mais disponível no solo. Portanto, as minhocas não são apenas habitantes passivos das TPIs, mas elas também podem participar dos processos pedogenéticos e de fertilidade desses solos (CUNHA et al., 2016).

A presença de cerâmica no solo, indicador importante de assentamentos humanos, e ingrediente essencial da classificação das TPIs, pode ter importantes efeitos sobre a estrutura do solo e os fragmentos de cerâmica podem conter importantes quantidades de nutrientes, como P, Ca e Mg (MARCONDES et al., 2004). Contudo, esses elementos são de liberação mais lenta, e não se sabe se a presença desses fragmentos no solo poderia ter alguma importância para a fertilidade do solo e a produtividade vegetal ao longo de um ciclo de lavoura anual.

O melhor conhecimento dos efeitos dos diversos componentes das TPIs (biochar, cerâmica, matéria orgânica e espinhas de peixe), e sua interação com a fauna edáfica e os microorganismos do solo são importantes para o planejamento de TPNs efetivas e reprodutíveis, visando melhorar a sustentabilidade do uso de solos com baixo potencial agrícola. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da presença de diversos componentes das TPIs (biochar, cerâmica, matéria orgânica e espinhas de peixe), e sua interação com minhocas na fertilidade do solo e na produção vegetal.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 COLETA E PREPARO DO SOLO

O solo utilizado no experimento foi um Latossolo Amarelo com textura argilo-siltosa e baixo teor de C, N e de nutrientes disponíveis, coletado no município de Paraopeba-MG. O solo foi seco, peneirado a 4 mm e armazenado no departamento de solos da UFPR até uso no experimento. Algumas das características químicas principais desse solo se encontram na Tabela 5.

TABELA 5. ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO LATOSSOLO AMARELO USADO NO EXPERIMENTO.

pH	C _{org}	N _{tot}	P	Ca	Mg	K	Al	Cu	Zn	Mn	Argila
CaCl ₂	g dm ⁻³		mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³			mg dm ⁻³		g dm ⁻³		
4,18	18,40	1,78	0,00	0,60	0,50	0,023	1,98	1,36	0,78	2,94	509,60

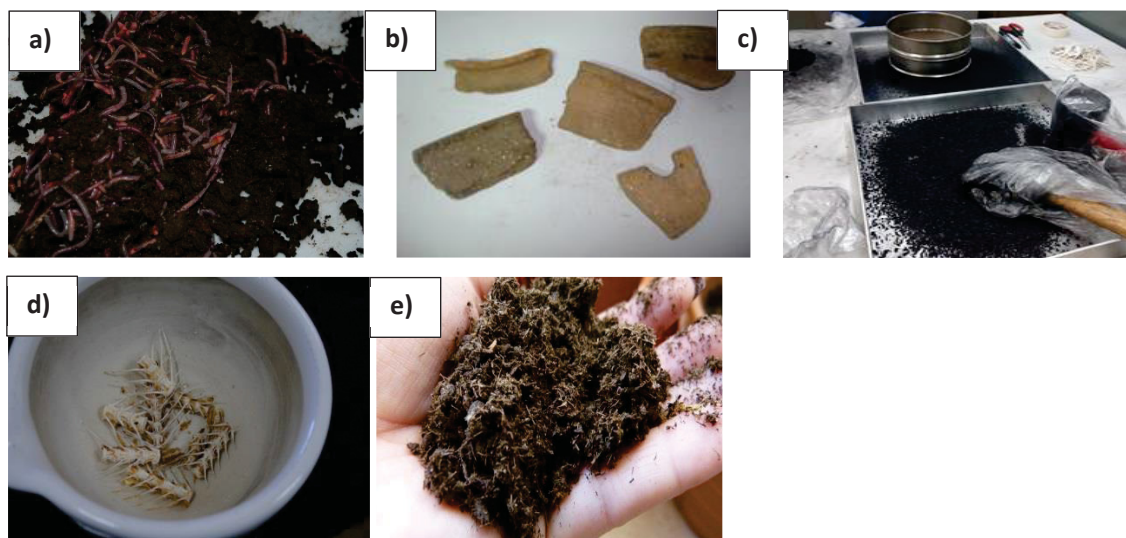
4.4.2 TRATAMENTOS AVALIADOS

Foi instalado um experimento fatorial fracionado para identificar a influência de cinco componentes importantes da TPI (minhocas, biochar, MO, cerâmica e espinha de peixe; Figura 14) sobre as características químicas do solo, crescimento e teor de nutrientes nas plantas de milho. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR. Os ensaios foram realizados seguindo um planejamento fatorial fracionário 2^k , onde os níveis pré-estabelecidos dos fatores foram: a) presença e ausência de 5 indivíduos da minhoca *P. corethrurus* no solo; b) presença e ausência de 10% (m/m) de biochar de ouriço da castanha do Pará (peneirado a 4 mm) no solo; c) presença e ausência de 100 g Kg⁻¹ cerâmica no solo, na forma de fragmentos pequenos de cerâmica comercial; d) presença e ausência de MO fresca (composto de esterco de cavalo), na dose equivalente a 2,6% de C no solo; e) presença e ausência de espinha de peixe moído (peneira 2 mm) no solo, na dose equivalente a 500 mg dm³ de P.

As minhocas foram coletadas em área de *Pinus elliottii* na Embrapa Florestas, em Colombo, PR. Realizou-se o expurgo do solo do local de coleta colocando-as em potes com papel filtro umedecido por 24 h, e posteriormente elas foram transferidas ao solo do experimento, e mantidas por até 2 semanas nesse solo. Antes de inocular cada vaso, novamente realizou-se o expurgo do solo dos intestinos, colocando-as em potes com papel toalha umedecido por 24 h. Em cada vaso, colocaram-se dois indivíduos adultos (com clitelo visível) e três juvenis. Em total, inoculou-se em cada vaso, em média 3,5 g.

A cerâmica foi adquirida em um comércio local em Curitiba, PR, e os vasos de barro foram quebrados em fragmentos de diferentes tamanhos, mas todos menores que 5 cm. O biochar do ouriço de castanha foi obtido através da pirólise lenta (4 h) a 350 °C, na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. O esterco foi obtido a partir de cavalos sem uso recente de antibióticos e anti-helmínticos na Cavalaria da Polícia Militar de Curitiba, e mantido em temperatura ambiente ao abrigo de luz por 30 dias antes de seu uso. As espinhas de peixe foram obtidas de uma peixaria no mercado municipal de Curitiba, secadas em forno a 180 °C e moídas.

FIGURA 14. COMPONENTES PRESENTES NOS SOLOS TPI, UTILIZADOS NO ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO; A) MINHOCAS DA ESPÉCIE *P. corethrurus*; B) FRAGMENTOS CERÂMICOS; C) BIOCHAR DO OURIÇO DA CASTANHA DO PARÁ; D) ESPINHA DE PEIXE; E) ESTERCO EQUINO.



Com o software Action Start 3.1, determinou-se uma matriz com 32 tratamentos e dois níveis (presença/ausência) de cinco fatores, com cinco repetições por ensaio, totalizando 160 unidades experimentais. Os efeitos dos tratamentos simples e de diversas combinações (interação) do fatorial fracionado foram avaliados ao longo de 55 dias após emergência das plantas, usando plantas de milho como modelo.

4.4.3 MONTAGEM DO ENSAIO

Em vasos com capacidade de 5 Kg, foram acondicionados 4 Kg de solo, com os diferentes tratamentos. O delineamento experimental na casa de vegetação foi em blocos inteiramente casualizados, com cinco repetições. Foram plantadas seis sementes de milho (um híbrido comercial DKB 230, resistente a fungos, cigarrinha, etc.), e 10 dias após a emergência, realizou-se o raleio e manteve-se apenas a planta mais alta. A irrigação foi feita continuamente durante a condução do experimento, com água deionizada, procurando-se manter a umidade em torno de 70% da capacidade de campo do solo. Ao longo dos 55 dias após a emergência, avaliou-se cada 7 dias a altura das plantas, além do aspecto visual do estado nutricional e presença de pragas ou doenças, documentadas fotograficamente. Aos 55 dias após a emergência, período em que as plantas de milho dos tratamentos mais

desenvolvidos estavam no estágio de desenvolvimento V10 (antes do pendoamento), foi feita a colheita e avaliação da altura (cm), biomassa da parte aérea e das raízes (g). A análise das propriedades químicas do solo foi feita segundo Marques e Motta (2004) e as minhocas e todos os fragmentos de raízes maiores presentes no solo (visíveis ao olho nu) foram removidas manualmente para avaliar o crescimento das raízes e a população das minhocas. Avaliou-se o comprimento total de raiz (cm), área (cm²), volume (cm³) e diâmetro (mm) do sistema radicular das plantas usando o programa computacional WinRhizo®, acoplado a um Scanner LA1600 (Regent Instruments Inc., Canadá). As minhocas e os casulos encontrados foram lavados em água corrente, e os indivíduos colocados em potes contendo papel toalha para esvaziar o conteúdo intestinal por 24h, e posteriormente pesados em balança analítica (0,001 g).

4.4.3.1 ANÁLISE DO TEOR DE NUTRIENTES NAS PLANTAS

Após a secagem, as plantas foram moídas em um moinho de facas do tipo Willye, para posterior análise dos nutrientes. A análise mineral foi realizada no laboratório de Nutrição de Plantas do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola (DSEA) da UFPR, submetendo as amostras à digestão via seca, em mufla a 500°C, e solubilizadas posteriormente em HCl 3 mol L⁻¹. Os teores dos nutrientes foram determinados por espectrometria de massa com plasma acoplado (ICP – OES). As análises do C e N foram efetuadas por combustão via seca, com auxílio do aparelho VARIO EL III - Elementar®.

4.4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

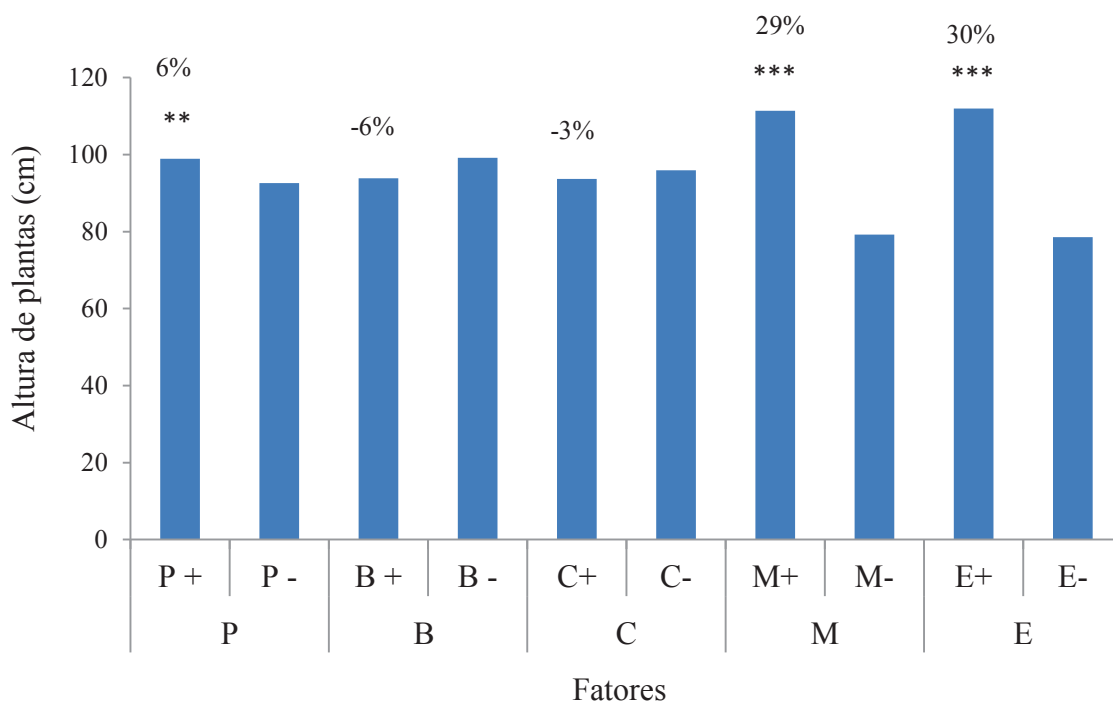
Os efeitos individuais de cada fator das TPI's (minhocas, biochar, MO, cerâmica, espinha de peixe) bem como suas interações, nas variáveis respostas já mensuradas (biomassa das minhocas, altura das plantas, biomassa vegetal, comprimento de raiz, área, diâmetro e volume de raiz, teor de nutrientes nas plantas) foram avaliadas através do modelo linear generalizado (GLM) usando o programa R através da interface studio (RSTUDIO TEAM, 2016).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 CRESCIMENTO DO MILHO

Houve aumento na altura das plantas nos tratamentos com adição das minhocas *P. corethrus* (6%), MO (29%) e espinha de peixe (30%) quando comparado aos tratamentos sem adição dos mesmos (Figura 15).

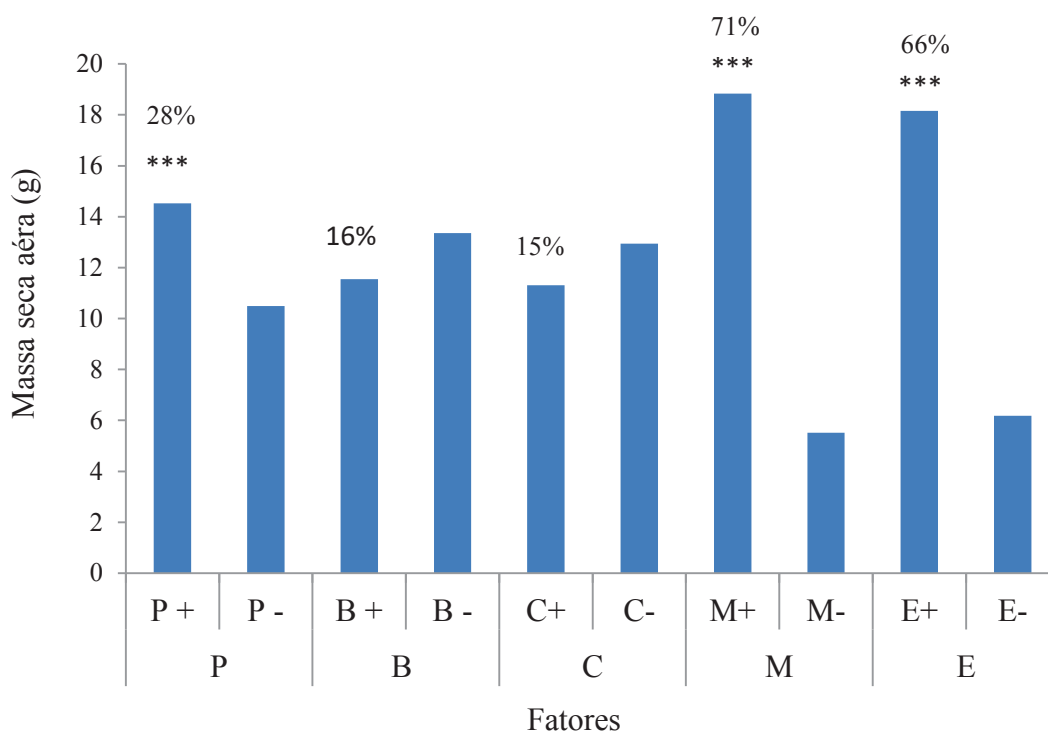
FIGURA 15. ALTURA DAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) MINHOCA *P. corethrus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA - ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



O mesmo comportamento foi observado em relação a massa seca da parte aérea (g), com aumento de 28%, 71% e 66% nos tratamentos com adição de minhocas (P+), MO (M+) e espinha de peixe (E+) (Figura 16). Os tratamentos com adição de biochar (B+) e cerâmica (C+) não influenciaram a altura e massa seca da parte aérea das plantas de milho. Na massa seca de raiz,

houve incremento significativo de 19% com minhocas (P+), 60% com MO (M+) e 62% com espinha de peixe (E+) (Figura 17).

FIGURA 16. MASSA SECA DA PARTE AÉREA (g) DO MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) MINHOCA *P. corethrurus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA- ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



Em relação ao volume de raiz todos os fatores adicionados ao solo proporcionaram incremento, porém somente a presença de minhocas (P+), MO (M+) e espinha de peixe (E+) tiveram efeito significativo (Figura 18). A presença de minhocas foi o fator que mais teve influência sobre o volume de raiz, com acréscimo de 42% em relação aos tratamentos sem adição dos organismos.

FIGURA 17. MASSA SECA DE RAIZ (g) DAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) MINHOCIA *P. corethrurus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MO- ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.

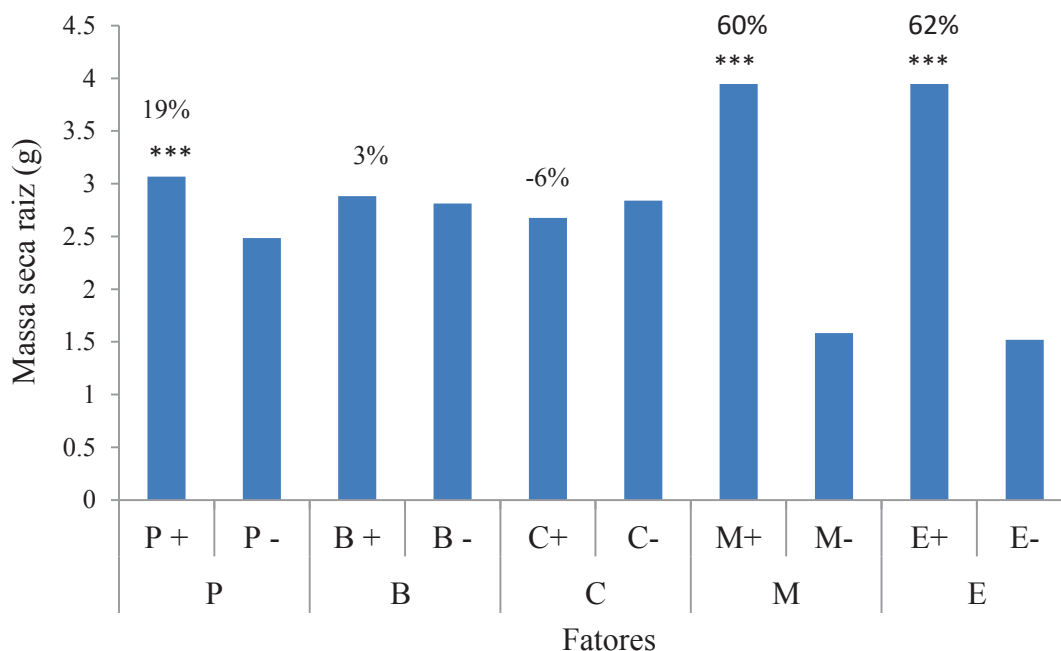
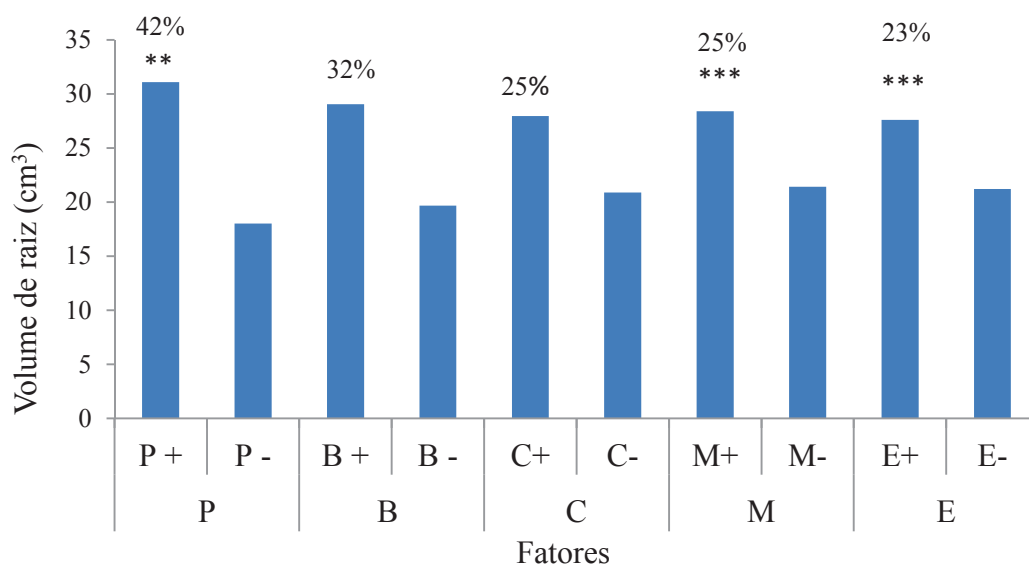


FIGURA 18. VOLUME DE RAIZ (cm^3) DAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (P) MINHOCIA *P. corethrurus*, (B) BIOCHAR, C (CERÂMICA), M (MO- ESTERCO EQUINO) E E (FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE). AS BARRAS EM VERMELHO REPRESENTAM ACRÉSCIMO OU DECRÉSCIMO NO VOLUME DE RAIZ NA PRESENÇA DO FATOR; EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



Um dos resultados que mais chamou a atenção no tratamento com adição de minhocas foi o grande incremento observado na MS (19%) e volume das raízes (42%). No desmonte, observou-se grande quantidade de galerias e coprólitos nos tratamentos com minhocas, em decorrência da intensa atividade de bioturbação dentro dos vasos (Figura 19 A e B).

FIGURA 19. A) PRESENÇA DE COPRÓLITOS NA SUPERFÍCIE DOS VASOS; B) BIOTURBAÇÃO DO SOLO

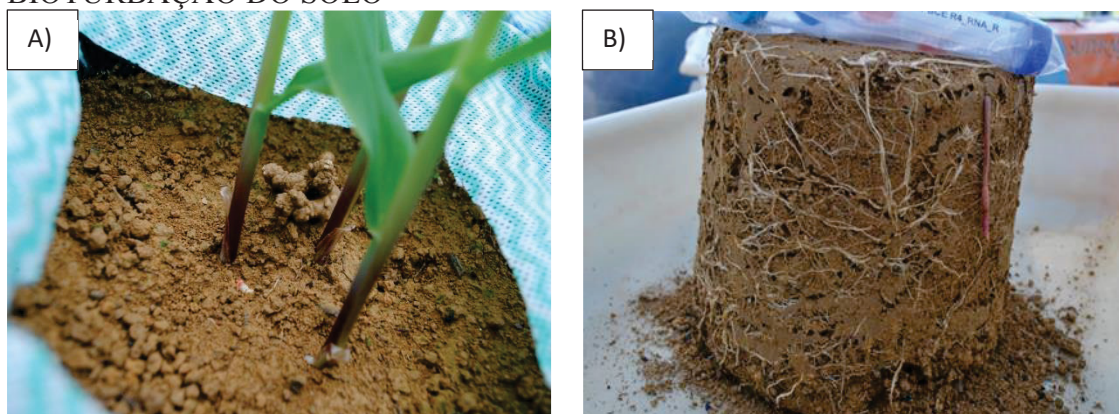
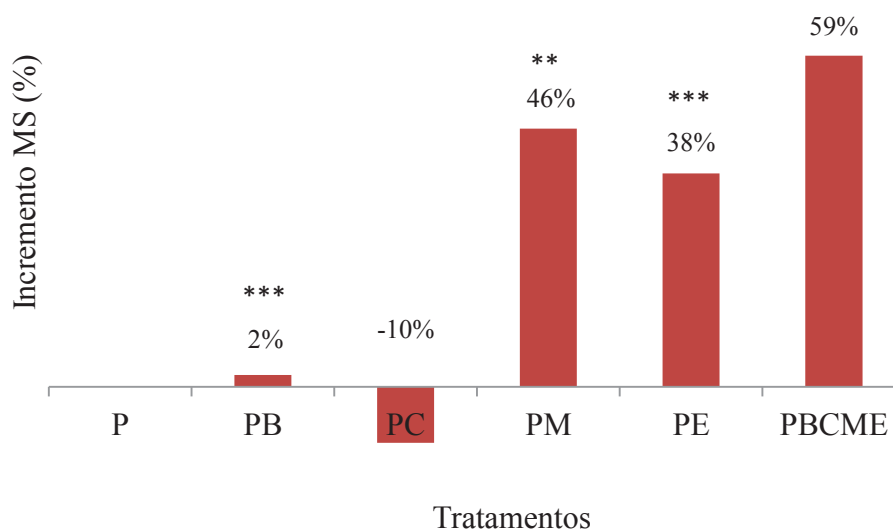


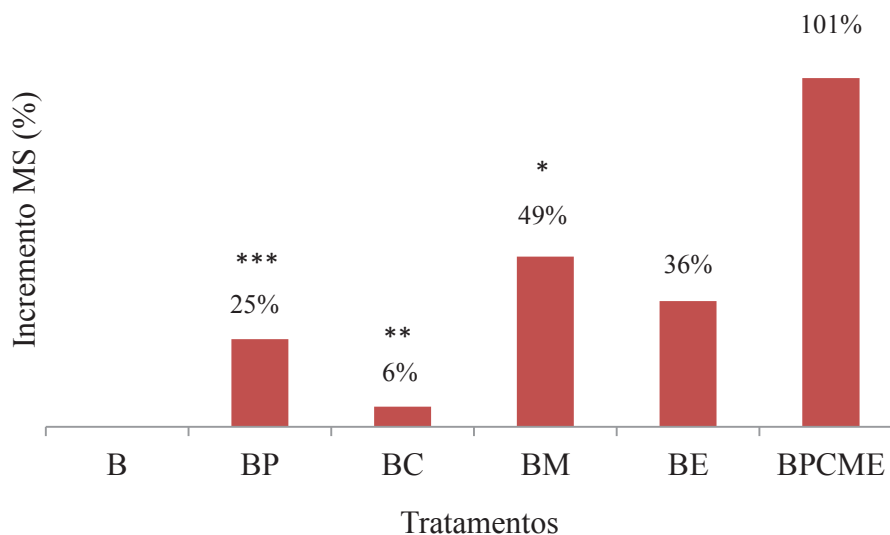
FIGURA 20. INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA DAS PLANTAS DE MILHO NOS TRATAMENTOS COM MINHOCAS *P. corethrus* (P) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; PB (MINHOCA+BIOCHAR), PC (MINHOCA+CERÂMICA); PM (MINHOCA+MO); PE (MINHOCA+ESPINHA DE PEIXE); PBCME (MINHOCA+BIOCHAR+CERÂMICA+MO+ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



Em relação às interações entre os tratamentos com adição de minhocas e demais fatores observou-se aumento na massa seca da planta nos tratamentos com adição de minhocas e biochar (PB), matéria orgânica (PM), farinha de espinha de peixe (PE) e com biochar, cerâmica, MO e espinha de peixe (PBCME) em relação aos tratamentos com adição somente de minhocas (Figura 20).

Nas interações entre os tratamentos com adição de biochar, somente as interações BP, BC e BM tiveram efeito significativo (Figura 21). Houve um acréscimo na massa seca de plantas nos tratamentos com os biochar e minhocas, porém este não diferiu dos tratamentos que tinham somente *P. corethrus*, indicando que o efeito sobre o crescimento de plantas é devido às minhocas, e não ao biochar (Tabela 6). Em contraste, nenhuma das interações dos tratamentos com adição de cerâmica e demais fatores foi significativa (Figura 22).

FIGURA 21. INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA DAS PLANTAS DE MILHO (%) NOS TRATAMENTOS COM BIOCHAR (B) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; BP (BIOCHAR+MINHOCA), BC (BIOCHAR+CERÂMICA); BM (BIOCHAR E MO); BE (BIOCHAR+ESPINHA DE PEIXE); BPCME (BIOCHAR+MINHOCAS+CERÂMICA+MO+ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



Nas interações entre os tratamentos com adição de MO, houve aumento na massa seca das plantas apenas nos tratamentos com adição de minhocas (MP) e espinha de peixe (ME), em relação ao tratamento controle (somente M) (Figura 23).

FIGURA 22. INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA (%) DAS PLANTAS DE MILHO NOS TRATAMENTOS COM CERÂMICA (C) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; CP (CERÂMICA+MINHOCA), CB (CERÂMICA+BIOCHAR); CM (CERÂMICA E MO); CE (CERÂMICA+ESPINHA DE PEIXE); CPBME (CERÂMICA+MINHOCA+BIOCHAR+MO+ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.

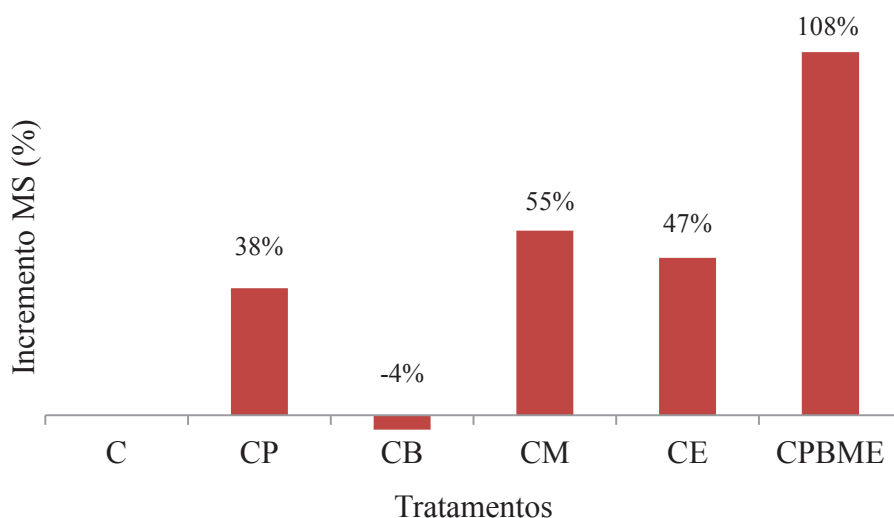
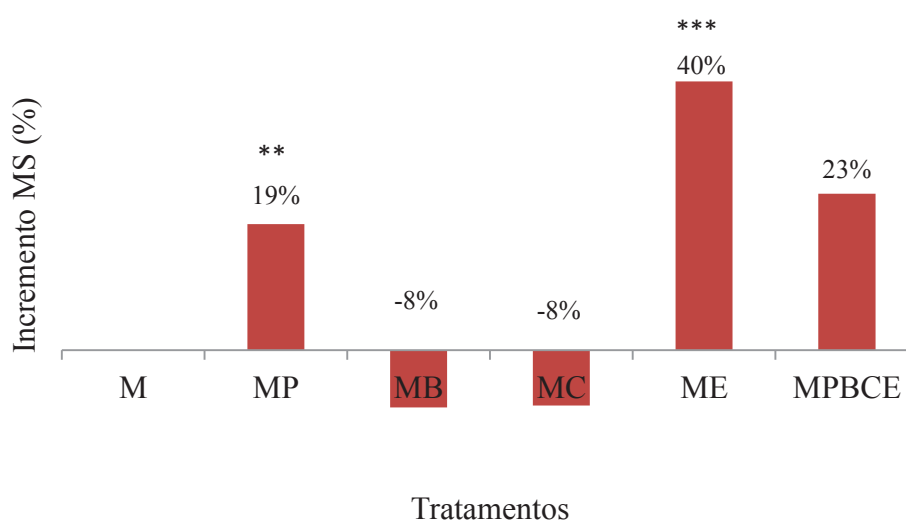


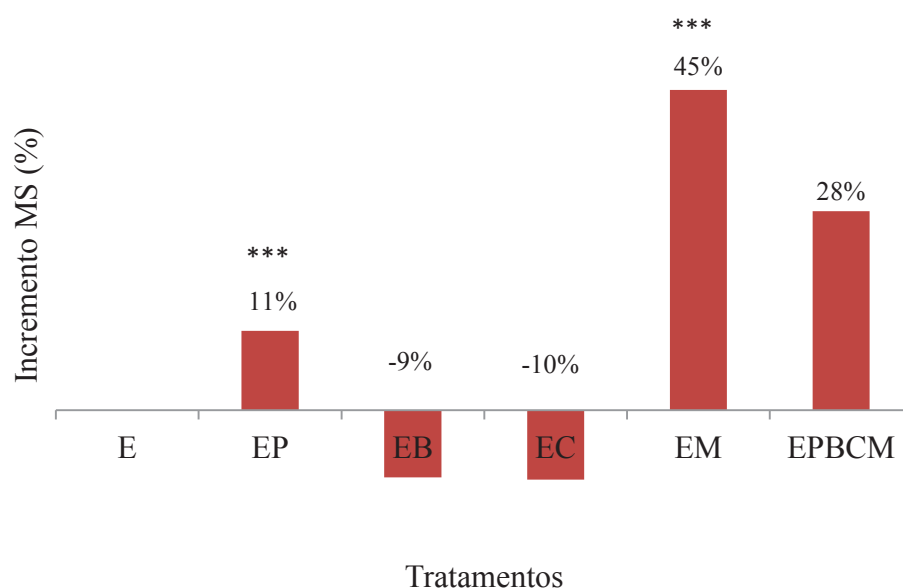
FIGURA 23. INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA (%) DO MILHO NOS TRATAMENTOS COM MO (M) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; MP (MO+MINHOCA), MB (MO+BIOCHAR); MC (MO+CERÂMICA); ME (MO+ESPINHA DE PEIXE); MPBCE (MO+MINHOCA+BIOCHAR+CERÂMICA+ESPINHA DE PEIXE). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



Verificou-se aumento (19%) na massa seca de plantas nos tratamentos com minhocas (MP) (Figura 23), porém esse não diferiu significativamente dos tratamentos que tinham somente MO. Portanto o maior efeito na produção se deve ao esterco, e não às minhocas.

A farinha de espinha de peixe aumentou todos os parâmetros de crescimento avaliados nas plantas de milho: +30% na altura de plantas, +66% na massa seca parte aérea, +62% na massa seca de raiz e +23% no volume de raiz (Figuras 2, 3, 4 e 5). Em relação às interações entre os tratamentos com adição de espinha, apenas as interações EP e EM foram significativas (Figura 24).

FIGURA 24. INCREMENTO NA MASSA SECA PARTE AÉREA (%) DO MILHO NOS TRATAMENTOS COM ESPINHA DE PEIXE (E) E SUAS RESPECTIVAS INTERAÇÕES; EP (MINHOCA+ESPINHA DE PEIXE), EB (ESPINHA DE PEIXE+BIOCHAR); EC (ESPINHA DE PEIXE+MO); EM (ESPINHA DE PEIXE+MO); EPBCM (ESPINHA DE PEIXE+MINHOCA+BIOCHAR+CERÂMICA+MO). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$



4.5.2 NUTRIENTES NAS PLANTAS

Observaram-se aumentos significativos nos teores médios de nitrogênio (N) nas plantas somente nos tratamentos com adição de MO (M) e espinha de peixe (E), com incremento de 20% e 29% (Figura 25). Já para o fósforo, houve aumento nos teores com a

adição de M (38%), E (27%) e P (24%). O teor de fósforo nas plantas (Figura 26) também aumentou com a adição de cerâmica e MO (CM) e nos tratamentos com adição de minhocas e espinha de peixe (PE), MO e espinha (ME), minhocas biochar e espinha (PBE), biochar MO e espinha de peixe (BME).

O potássio aumentou nos tratamentos com M (27%) e E (23%), e os tratamentos com adição de biochar e cerâmica (BC), MO e espinha de peixe (ME), minhocas biochar e espinha de peixe (PBE) apresentaram interação significativa em relação aos teores de K nas plantas de milho (Figura 27). Em relação aos teores de cálcio observou-se aumento significativo de 14% somente com adição MO (M) (Figura 28). Nos teores de magnésio houve aumento significativo de 13% nos tratamentos com adição de minhocas (P+) e de 7% nos tratamentos com adição de espinha de peixe (E+) (Figura 29).

FIGURA 25. VALORES MÉDIOS DE NITRÔGENIO (N) NAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL). P (MINHOCAS *P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATÉRIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.

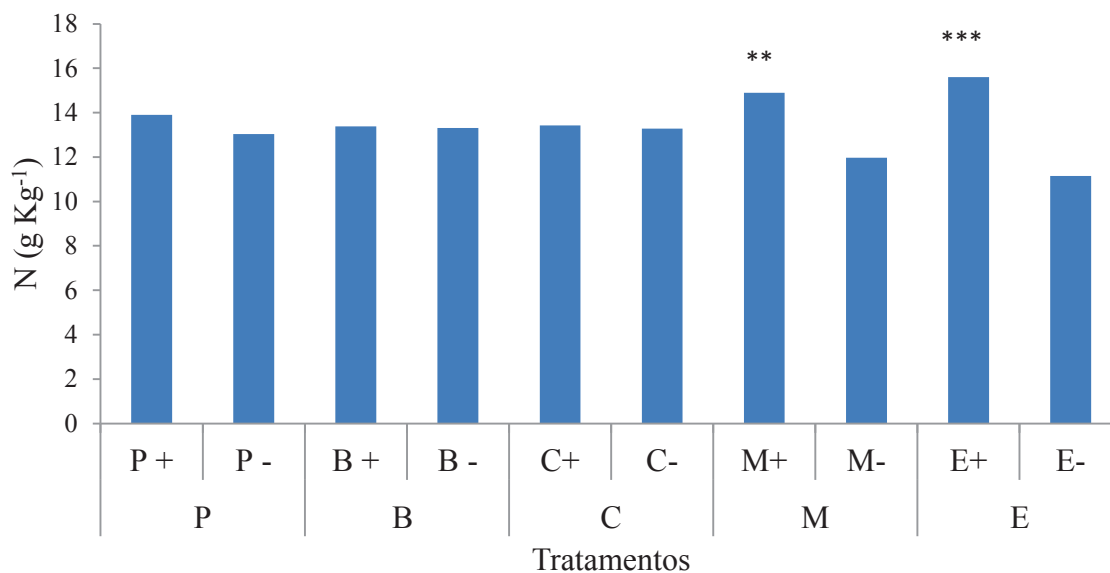


FIGURA 26. VALORES MÉDIOS DE FÓSFORO NAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL).; P (MINHOCAS *P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATERIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.

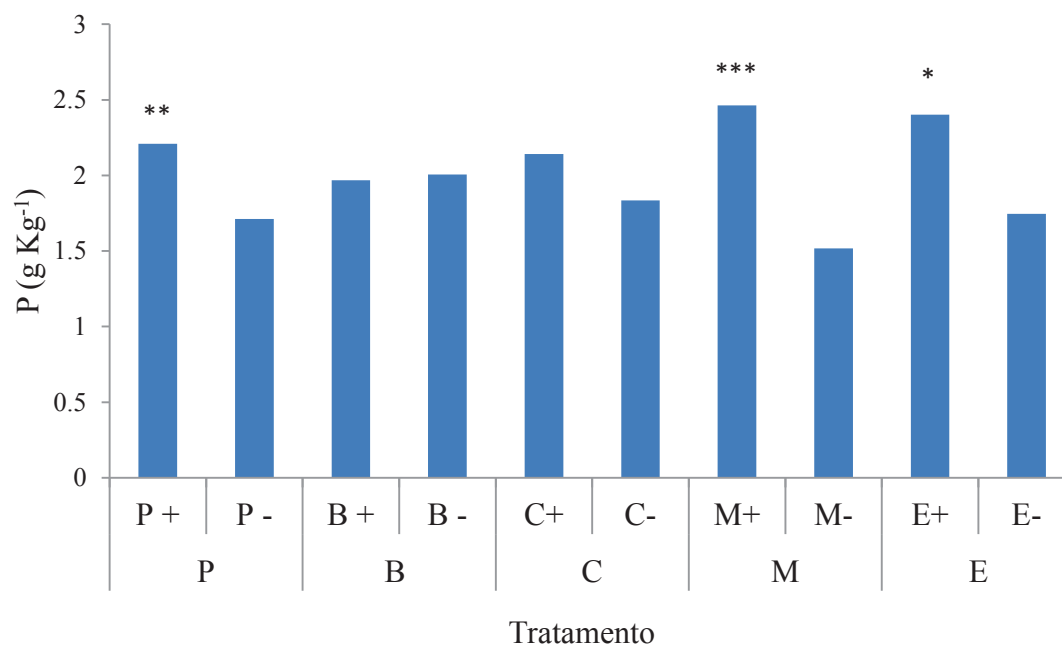


FIGURA 27. VALORES MÉDIOS DE POTÁSSIO NAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL). P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATERIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.

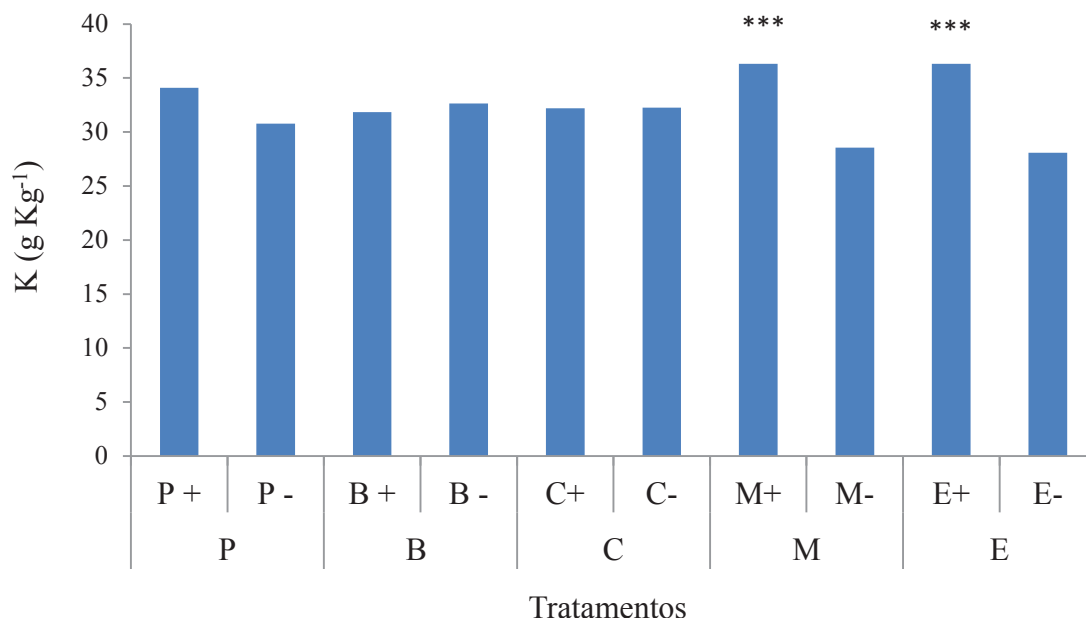


FIGURA 28. VALORES MÉDIOS DE CÁLCIO NAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS (BARRAS EM AZUL). P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MO), E (ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.

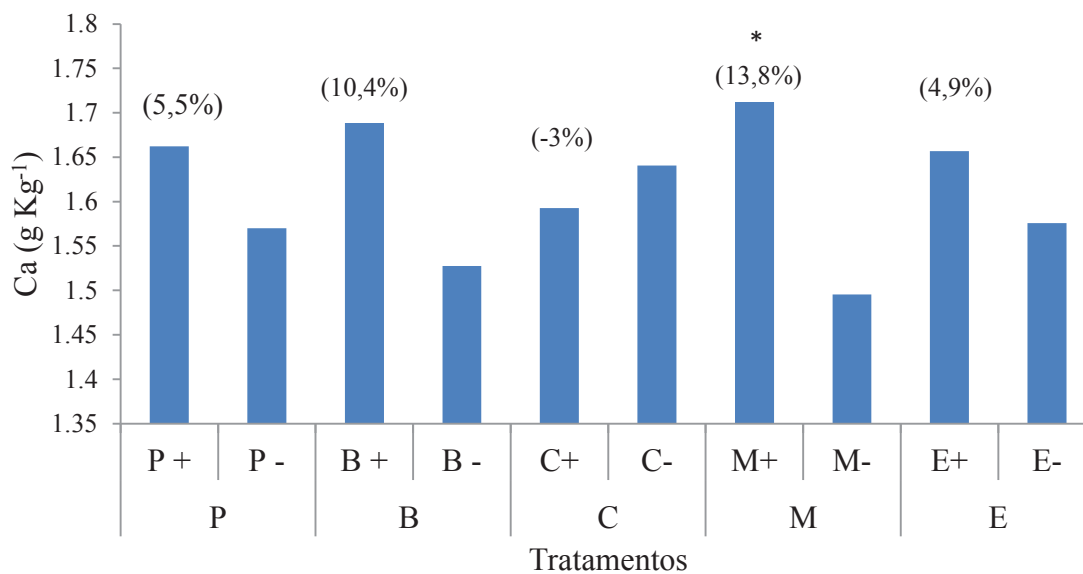
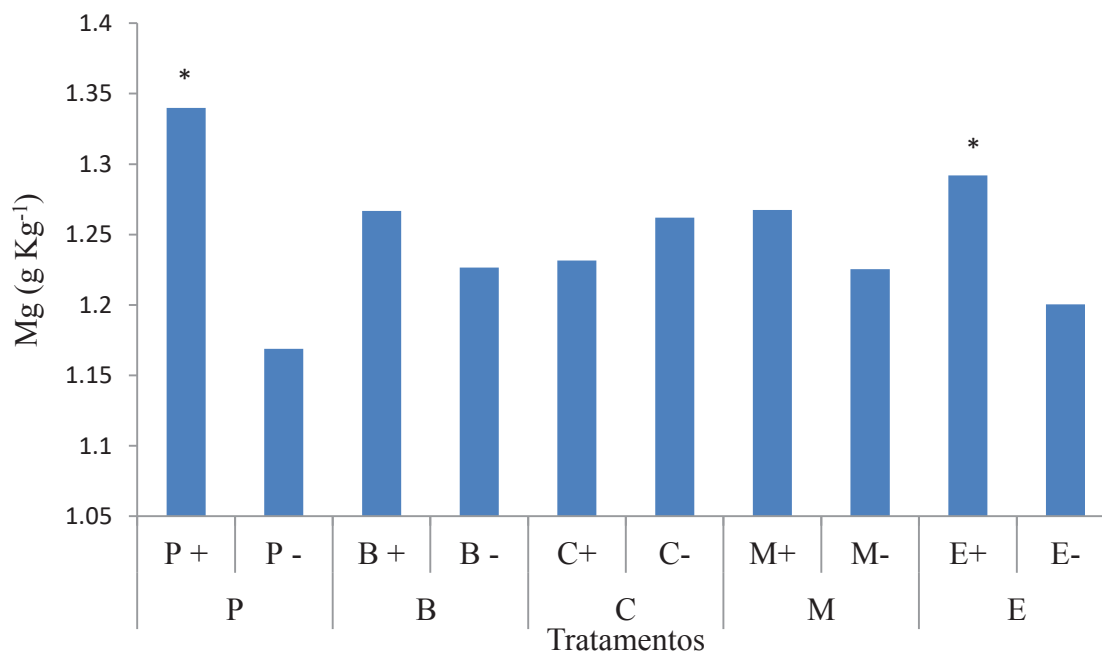


FIGURA 29. VALORES MÉDIOS DE MAGNÉSIO NAS PLANTAS DE MILHO NA PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DOS DIFERENTES FATORES AVALIADOS E PORCENTAGEM DE GANHO; P (*P. corethrurus*), B (BIOCHAR), C (CERÂMICA), M (MATERIA ORGÂNICA), E (ESPINHA DE PEIXE). EFEITO SIGNIFICATIVO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ E *** $p < 0,001$.



4.5.3 ANÁLISE QUÍMICA DOS SOLOS

Na Tabela 6 estão representados os valores médios de química dos solos com adição dos diferentes componentes (P – minhocas *P. corethrurus*, B – Biochar, C – Cerâmica, M – MO, E – espinha de peixe), bem como suas interações. Nos tratamentos com adição das minhocas (P) foi observado aumento do pH CaCl₂ e diminuição do Al³⁺ e acidez potencial (H+Al) em relação aos vasos sem minhocas. Também se verificaram aumentos de 19% nos teores de Ca, 38% no Mg, 80% de P e 7% no C. Nos tratamentos com adição de biochar (B) houve alteração significativa somente no teor de C no solo. Nos solos com adição de cerâmica (C) foi observada redução da acidez potencial (H+Al), e para os demais atributos não houve alteração significativa.

Nos tratamentos com adição de MO (M) houve um aumento de aproximadamente 0,40 unidades no pH CaCl₂ e SMP, e diminuição da acidez potencial (H+Al) e Al³⁺, além de um aumento de 67% no Ca, 3 vezes nos valores de Mg e K e 4 vezes nos teores de P. Os valores

de SB, C, T e V% também aumentaram. Nos tratamentos com adição de farinha de espinha de peixe (E) não encontraram-se alterações significativas nos valores de pH CaCl_2 e Al^{3+} , mas houve diminuição na acidez potencial (H+Al). Os teores de Ca e Mg no solo tiveram aumento de 23% e 18%, respectivamente, mas não houve efeito no K. Observou-se, também, aumento de 80% nos teores de P, 20% no C e 33% na saturação por bases (V%). A SB e T também aumentaram.

Nas interações PB (minhocas+biochar) houve aumento nos valores de CTC pH 7,0 (T), nos teores de P e na acidez potencial, causando uma concomitante diminuição na saturação por bases (Tabela 6). A interação PC (minhocas+cerâmica) apresentou efeito significativo nos teores de Ca e Mg (redução) quando comparado aos solos com adição somente dos fragmentos cerâmicos, mas ao mesmo tempo, um aumento nos teores de P.

Com adição de minhocas e MO (PM) houve acréscimo no pH CaCl_2 , SMP, Ca e Mg, P e V%. O P apresentou aumento de 4 vezes em relação aos tratamentos com adição somente de minhocas e somente de MO, e 10 vezes comparado aos tratamentos sem esses fatores.

TABELA 6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SOLOS APÓS ADIÇÃO DOS DIFERENTES FATORES E SUAS INTERAÇÕES: MINHOCA (P), BIOCHAR (B), MO (M), CERÂMICA(C) E ESPINHA DE PEIXE (E).

	pH CaCl ₂	pH SMP	Al ³⁺	H+Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺ cmol _c dm ⁻³	K ⁺	SB	T	P mg/dm ⁻³	C g dm ⁻³	V %
P												
<i>P. corethrus</i>												
Presença	4,32a	5,47ns	0,97b	7,40b	1,54a	0,77a	0,040ns	2,35a	10,72a	9,46a	33,02a	25,05a
Ausência	4,22b	5,47	1,20a	8,82a	1,29b	0,56b	0,036	1,89b	9,55b	5,26b	31,03b	21,23b
B												
Biochar												
Presença	4,23ns	5,45ns	1,08ns	7,70ns	1,40ns	0,66ns	0,036ns	2,10ns	9,73ns	16,62ns	33,33a	22,60ns
Ausência	4,26	5,48	1,07	8,30	1,41	0,66	0,040	2,12	10,54	16,62	29,34b	23,40
C												
Cerâmica												
Presença	4,30ns	5,51ns	1,06ns	7,59b	1,49ns	0,72ns	0,040ns	2,25ns	9,84ns	14,97ns	30,26ns	21,16ns
Ausência	4,19	5,42	1,11	8,52a	1,32	0,61	0,037	2,07	10,41	14,65	32,01	24,81
M												
Matéria Orgânica												
Presença	4,46a	5,70a	0,61b	6,43b	1,76a	0,99a	0,050a	2,81a	9,17b	17,65a	32,36a	28,85a
Ausência	4,03b	5,23b	1,53a	9,66a	1,05b	0,33b	0,021b	1,41b	11,08a	5,01b	29,91b	17,39b
E												
Farinha de espinho												
Presença	4,29ns	5,52ns	1,05ns	7,45b	1,55a	0,72a	0,034ns	2,31a	10,57a	14,52a	34,68a	25,90a
Ausência	4,20	5,41	1,10	8,66a	1,26b	0,61b	0,042	1,91b	9,69b	8,09b	28,95b	19,44b
P x B												
P(+)/B(+)	4,14ns	5,36ns	1,16ns	8,00ab	1,25ns	0,53ns	0,035ns	1,83ns	9,83ab	29,61a	32,22ns	19,29bc
P(+)/B(-)	4,22	5,43	1,17	9,44a	1,29	0,60	0,037	1,91	11,56a	14,85b	31,97	22,32c
P(-)/B(+)	4,21	5,41	0,97	7,21b	1,51	0,78	0,035	2,32	9,36b	3,22c	33,62	25,36ab
P(-)/B(-)	4,33	5,56	0,94	7,37b	1,53	0,74	0,042	2,32	9,55b	2,93c	32,19	24,05a
P x M												
P(+)/M(+)	4,37b	5,64b	0,79b	6,70c	1,57b	0,83b	0,050a	2,45b	9,15b	31,68a	30,05ns	26,05ab
P(+)/M(-)	3,97c	5,15c	1,57a	10,68a	0,98c	0,29c	0,023b	1,30d	11,99a	7,05b	31,24	16,00c
P(-)/M(+)	4,56a	5,77a	0,44c	6,17c	1,95a	1,16a	0,061a	3,18a	9,19b	7,62b	30,53	31,65a
P(-)/M(-)	4,15c	5,38c	1,37a	8,32b	1,23c	0,50c	0,026b	1,77c	10,09b	3,04c	30,20	17,41b

TABELA 6. CONTINUAÇÃO

	pH CaCl ₂	pH SMP	Al	H+Al	Ca	Mg cmol _c dm ⁻³	K	SB	T	P mg/dm ⁻³	C g dm ⁻³	V %
B x M												
B(+)/M(+)	4,38a	5,59a	0,58b	6,20b	1,72a	0,98a	0,051a	2,76a	8,81b	27,83a	35,08a	31,19a
B(+)/M(-)	3,97b	5,18b	1,55a	9,01a	1,04b	0,33b	0,022b	1,39b	10,41a	5,01b	30,76a	13,47c
B(-)/M(+)	4,44a	5,68a	0,63b	6,51b	1,76a	0,98a	0,058a	2,80a	9,31b	6,78b	33,17a	25,7ab
B(-)/M(-)	3,99b	5,16b	1,48a	10,08a	1,04b	0,33b	0,021b	1,40b	11,48a	4,88b	24,62b	20,54b
P x E												
P(+)/E(+)	4,25ab	5,49ns	1,15ns	7,58b	1,49a	0,62a	0,031ns	2,15a	9,74b	25,70a	30,12ab	26,31a
P(+)/E(-)	3,99b	5,17	1,18	9,58a	1,43a	0,48b	0,041	1,56b	11,14a	10,02b	30,42ab	15,37b
P(-)/E(+)	4,33ab	5,55	0,95	7,33b	1,61a	0,81a	0,039	2,47a	9,64b	12,58b	27,79b	26,88a
P(-)/E(-)	4,21a	5,40	0,96	7,28b	1,03b	0,71ab	0,042	2,18a	9,46b	3,11c	35,37a	22,66a
M x E												
M(+)/E(+)	4,49a	5,72a	0,59b	6,34c	1,93a	1,10a	0,054a	3,08a	9,27b	22,50a	25,88b	29,96a
M(+)/E(-)	4,33a	5,55a	0,63b	6,36c	1,56b	0,86a	0,055a	2,48b	8,85b	12,49ab	33,85a	27,06a
M(-)/E(+)	3,97b	5,17b	1,50a	8,38b	1,14c	0,32b	0,015c	1,48c	9,87b	6,86bc	31,55ab	19,46a
M(-)/E(-)	3,97b	5,14b	1,54a	10,81a	0,95d	0,34b	0,028b	1,32c	12,13a	3,54c	32,79a	11,52b
C x E												
C(+)/E(+)	4,33ns	5,53ns	1,02ns	7,51b	1,63a	0,76ns	0,036ns	2,43a	9,94b	24,07a	26,02b	20,68b
C(+)/E(-)	4,16	5,37	1,07	7,48b	1,32ab	0,65	0,042	2,02ab	9,51b	5,74b	34,40a	21,13b
C(-)/E(+)	4,15	5,38	1,06	7,22b	1,44a	0,66	0,032	2,14ab	9,21b	4,86b	31,11ab	31,73a
C(-)/E(-)	4,14	5,33	1,10	9,62a	1,16b	0,54	0,041	1,75b	11,37a	10,25ab	32,13a	17,28b

TABELA 6. CONTINUAÇÃO

	pH CaCl ₂	pH SMP	Al	H+Al	Ca	Mg cmol _c dm ⁻³	K	SB	T	P mg/dm ⁻³	C g dm ⁻³	V %
P x C												
	4,23ns	5,46ns	1,20ns	7,90b	1,32b	0,58b	0,037ns	1,94b	9,84b	26,46a	29,78ns	19,64b
C	4,11	5,34	1,19	9,36a	1,22b	0,52b	0,033	1,78b	11,15a	11,15a	31,22	24,81b
	4,25	5,48	1,13	7,73b	1,47a	0,74a	0,032	2,25a	9,98b	3,38b	21,67	13,00ab
P	4,18	5,38	0,99	7,33b	1,38ab	0,67ab	0,038	2,08ab	9,26b	2,97b	31,74	26,75a
B x C												
	4,21ns	5,40ns	1,03ns	7,27ns	1,49ns	0,73ns	0,038ns	2,26ns	9,53ns	24,14a	33,05ns	23,39ab
C	4,14	5,37	1,10	7,95	1,27	0,59	0,035	1,89	9,69	8,69b	32,79	21,26ab
	4,27	5,50	1,06	7,75	1,45	0,69	0,039	2,19	9,95	5,26b	27,36	18,20b
B	4,14	5,32	1,13	8,96	1,27	0,57	0,038	1,88	10,85	6,16b	30,17	25,76a
P x C x M												
	4,40bc	5,66b	0,79b	6,64c	1,67ab	0,89ab	0,050a	2,61b	9,25b	45,5a	26,14ab	27,07a
M	3,88d	5,00c	1,52a	8,72b	0,93d	0,25d	0,023b	1,21c	9,93b	7,03cd	31,83ab	11,63b
	4,43c	5,35b	0,75b	6,43c	1,40bc	0,73b	0,047a	2,18b	8,61b	16,97b	32,34ab	23,85a
C	3,88d	5,05c	1,54a	12,13a	0,99d	0,32cd	0,022b	1,34c	13,47a	6,74bc	29,15ab	19,61b
	4,64a	5,83a	0,30d	5,88c	2,12a	1,29a	0,067a	3,49a	9,37b	3,79de	25,73b	29,69a
P	3,88d	5,06c	1,47a	8,27b	1,14cd	0,40c	0,017b	1,56c	9,84b	3,03e	35,50a	14,94b
	4,26b	5,43b	0,56c	6,15c	1,70ab	0,98ab	0,053a	2,73ab	8,59b	3,29e	33,64ab	32,00a
	3,91d	5,07c	1,38a	8,15b	0,99d	0,33cd	0,022b	1,34c	9,49b	2,51e	28,34ab	20,22a
P x B x E												
	4,11ns	5,28ns	1,07ns	6,98b	1,50a	0,60ns	0,03ns	2,13ab	9,11b	42,44a	30,79ab	22,68ab
E	3,98	5,19	1,20	8,65ab	0,96b	0,45	0,04	1,45b	10,1ab	15,3b	32,12ab	15,00b
	4,20	5,45	1,19	7,84b	1,43a	0,63	0,03	2,08ab	9,92b	6,85b	27,91ab	28,83ab
B	4,00	5,16	1,17	10,52a	1,12ab	0,51	0,04	1,67ab	12,20a	9,78b	28,73ab	15,75b
	4,12	5,27	0,93	7,10b	1,53a	0,78	0,04	2,35a	9,16b	3,13c	31,76ab	26,60a
P	4,11	5,30	0,97	6,99b	1,42a	0,75	0,04	2,20a	9,18b	3,17c	33,89a	22,93ab
	4,32	5,55	0,97	7,29b	1,63a	0,83	0,04	2,50a	9,79b	3,47c	22,92b	26,25a
	4,13	5,26	0,91	7,24b	1,38a	0,64	0,05	2,06ab	9,30b	2,90c	35,17a	21,32ab

TABELA 6. CONTINUAÇÃO

	pH	pH SMP	Al	H+Al	Ca	Mg	K	SB	T	P	C	V
P x B x C x M												
	4.49b	5.72ab	0.72bc	6.35f	1.77abd	0.90ab	0.05abc	2.72ab	9.07c	87.72a	35.76a	29.79a
M	3.37e	4.42c	1.37a	7.30bc	0.61e	0.25df	0.03be	0.88e	8.18bc	4.25d	30.19ac	9.01ac
	3.94d	5.13b	0.75bc	6.13ef	1.30ae	0.62be	0.04abd	1.9bcd	8.09c	17.35b	33.10a	21.83a
C	3.71e	4.87c	1.50a	9.72b	0.89e	0.28df	0.02cde	1.19e	10.91b	9.57bc	25.93ac	11.49ac
	4.31d	5.61b	0.87b	6.93df	1.58abcd	0.89abc	0.05abc	2.51ad	9.44c	3.38d	16.52c	24.35c
B	3.69e	4.78c	1.48a	8.44bc	0.89e	0.20f	0.02cde	1.12e	9.56bc	9.70bc	32.21a	10.69a
	3.96cd	5.10b	0.69bc	6.16ef	1.38ae	0.77abc	0.05ab	2.20ad	8.36c	15.05b	28.64ac	23.70ac
P	4.08e	5.26c	1.59a	14.79a	1.12de	0.37ef	0.02ae	1.51de	16.30 ^a	3.64cd	32.71ac	28.55ac
	4.24a	5.31a	0.26d	5.36f	1.96a	1.26a	0.06a	3.27a	8.63c	3.53d	30.3ab	34.21ab
	3.68e	4.85c	1.50a	7.75bde	1.13de	0.35ef	0.02de	1.50de	9.25bc	3.00d	31.74a	14.39a
	4.47bc	5.73ab	0.58c	6.45f	1.72abd	1.09ab	0.05ab	2.85ab	8.68c	3.43d	38.24a	36.44a
	4.10e	5.30c	1.48a	8.72bd	1.09ce	0.35ef	0.02e	1.46ce	10.1bc	2.63d	31.29ac	14.09ac
	4.45a	5.65a	0.72d	6.83f	1.79a	0.92ab	0.05a	2.75a	9.59c	3.47d	21.6bc	19.35bc
	4.12e	5.31c	1.44a	8.86bc	1.17be	0.45cde	0.02e	1.64de	10.5bc	3.08d	39.65a	15.55a
	4.47bc	5.68ab	0.60c	6.48f	1.87ad	0.97ab	0.06ab	2.89ab	9.37c	3.49d	32.4ab	30.78ab
	4.12e	5.36c	1.42a	8.41cd	1.00e	0.34df	0.03de	1.37e	9.78bc	2.65d	28.23ac	28.39ac

pH em CaCl₂ (relação solo:solução de 1:2,5); H + Al estimado pelo pH SMP; Al (titulometria), Ca e Mg (espectrofotometria absorção atômica) extraídos com KCl 1 M; P e K extraído com Mehlich-1, determinados por colorimetria e espectrofotômetro de emissão por chama; C através de oxidação por dicromato. SB = Soma de bases, T= Capacidade de troca de cátions a pH 7,0; P = Fósforo extraído por Mehlich ; C = carbono orgânico total; V = saturação por bases; m= Saturação de Al.

A interação entre biochar e minhocas (BM) apresentou efeito significativo sobre o pH do solo e teores de Ca, Mg e K em relação aos tratamentos sem a presença de ambos os fatores, porém esses teores não diferiram dos encontrados nos tratamentos com adição somente de MO. O grande efeito dessa interação está nos teores de P, onde foi constatado acréscimo em relação aos tratamentos com adição de somente um dos fatores.

Na interação PE (minhocas+espinha de peixe), observou-se aumento nos teores de Ca nos solos em relação aos tratamentos sem esses fatores, porém os teores não diferiram dos encontrados nos solos com somente minhoca ou espinha de peixe. O maior efeito positivo dessa interação sobre as características químicas dos solos foi na disponibilidade de P, com aumento significativo de 3 vezes em relação aos tratamentos sem esses fatores, bem como sobre a presença individual de cada fator (Tabela 6).

4.5.4 POPULAÇÃO DE MINHOCAS

Houve mortalidade de minhocas em todos os tratamentos (Tabela 7), variando de 16% (P e PC) até $\geq 80\%$ (PBME, PCME), indicando condições difíceis para a sobrevivência das minhocas em vários tratamentos. Contudo, em quase todos os tratamentos (exceto PME e PBCE) foram encontrados casulos, indicando condições adequadas para a reprodução das minhocas adultas inoculadas.

4.6 DISCUSSÃO

4.6.1 CRESCIMENTO DO MILHO

A presença de minhocas nos solos aumentou significativamente a altura de plantas, massa seca da parte aérea, massa seca de raiz e volume de raiz do milho. Outros autores também encontraram efeitos positivos de minhocas sobre o crescimento de milho (GUEI et al., 2011; MATERECHERA, 2002; GILOT-VILLENAVE et al., 1996) A revisão de van Groenigen et al. (2014), mostrou aumento na produção de milho (n = 19 estudos) de aproximadamente 27%, em solos com minhocas.

TABELA 7. PESO TOTAL DAS MINHOCAS INOCULADAS, PESO TOTAL FINAL, % DE MORTALIDADE E PRODUÇÃO DE CASULOS EM CADA TRATAMENTO.

Tratamentos	Peso total inicial (g)	Peso total final (g)	Mortalidade (%)	No. casulos
P	3,7	0,67	16	3
PB	3,48	0,62	20	3
PC	3,59	0,59	16	7
PM	3,06	0,52	32	3
PE	3,22	0,49	32	5
PBC	3,18	0,59	20	4
PBE	3,33	0,61	20	7
PCE	3,15	0,57	24	7
PBM	3,41	0,52	46	1
PCM	3,47	0,53	16	3
PME	3,60	0,64	52	0
PBCM	3,43	0,63	28	2
PBCE	3,57	0,59	44	0
PBME	3,64	0,67	80	4
PCME	3,43	0,51	84	2
PBCME	3,59	0,54	52	3

O efeito positivo das minhocas *P. corethrurus* pode ser atribuído, em parte a melhorias na qualidade do solo. O aumento no pH (Tabela 6), devido à excreção de carbonato de cálcio pelas glândulas calcíferas da minhoca, após o solo ser ingerido (VERSTEEGH et al., 2014) pode afetar a disponibilidade de diversos nutrientes essenciais às plantas em solos ácidos, como verificado nos teores de Ca, Mg e P disponível (Tabela 6). Essa espécie possui três pares de glândulas calcíferas, que podem contribuir para a produção de carbonato de cálcio amorfo, excretado para dentro do esôfago, que pode mudar o pH do solo no intestino e nos coprólitos. A espécie *P. corethrurus* é conhecida por aumentar o P inorgânico no solo (BROSSARD et al., 1996; SHARPLEY et al., 1976, LE BAYON et al., 2009) devido à mineralização de P orgânico no intestino, pela ação de fosfatases (LE BAYON; MILLERET,

2009). A maioria do P nos solos fertilizados está presente na forma de ortofosfato quimicamente adsorvido em óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de ferro e alumínio (MOREL et al., 2000; SCHOUMANS; GROENENDIJK, 2000) e não como compostos orgânicos. Possíveis caminhos que levem a maior disponibilidade do P em solo com minhocas podem incluir dessorção competitiva, devido ao aumento das concentrações de carbono orgânico nos coprólitos, bem como alterações no equilíbrio de sorção química por causa do aumento dos níveis de pH (ROS et al., 2017; VOS et al., 2014).

As minhocas também induzem mudanças na disponibilidade dos nutrientes (BAROIS et al., 1999), através da fragmentação de resíduos (BROWN et al., 1999), aumento na mineralização de nutrientes pela ação microbiana (POSTMA-BLAAUW et al., 2006), e mudanças na comunidade microbiana no solo da rizosfera, com um aumento nas bactérias promotoras do crescimento das plantas (BRAGA et al., 2016). A fragmentação dos resíduos e o estímulo da mineralização aumenta a liberação de nitrogênio mineral, que segundo Van Groenigen et al. (2014), representa o principal mecanismo de ação das minhocas no aumento da produção de biomassa pelas plantas. No solo do presente experimento, observou-se estímulo de mineralização em vários tratamentos, particularmente do C no solo. Mesmo com adição de matéria orgânico, houve mudanças consideráveis nos teores de C no solo, que se devem à decomposição desse C, provavelmente pela ação microbiana e a atividade das minhocas, com emissão de CO₂. O solo do presente experimento é especialmente limitante em P e N, e deficiências nesses nutrientes foram visíveis nas plantas a partir de 20 dias de crescimento. O aumento na disponibilidade de P e N mineral (não medido) no solo pela ação das minhocas, pode ter sido um dos principais mecanismos para o melhor crescimento nas plantas em presença desses animais. A comunidade microbiana da rizosfera não foi avaliada no presente experimento, então não podemos deduzir em relação a esse mecanismo.

Além do efeito das minhocas sobre a mineralização da MO e disponibilidade de nutrientes, os coprólitos podem conter fitohormônios e microorganismos promotores de crescimento, fatores que podem, também, afetar a biomassa vegetal (PUGA-FREITAS et al., 2012). Os coprólitos de *P. corethrurus* podem ter fitohormônios como citokininas e auxinas (KRISHNAMOORTNY; VAJRANABHAI, 1986), mas esses não foram confirmadas no presente experimento. Finalmente, as minhocas também produzem grandes mudanças nas características físicas do solo, com a abertura de galerias que alteram a permeabilidade e infiltração de água, fornecendo caminhos de menor resistência ao crescimento radicular

(JÉGOU et al., 2000; DON et al., 2008). Raízes foram observadas frequentemente seguindo as galerias das minhocas nos vasos (Figura 6b), além de também colonizarem coprólitos. Na presença de MO, *P. corethrus* pode ter importante efeito na estruturação do solo (ALEGRE et al., 1996), e na produção de milho (PASHANASI et al., 1996), o que foi confirmado no presente experimento em ambos os tratamentos com MO.

A espécie de minhoca *P. corethrus*, utilizada no experimento, é uma colonizadora preferencial nas TPI, podendo atingir biomassa importante nesses solos (CUNHA et al., dados não publicados). Elas produzem grande quantidade de coprólitos, que contribuem para a ciclagem de nutrientes e produção vegetal (LAVELLE et al., 1987). Nos solos de TPI o processo de bioturbação é frequentemente observado, onde essa espécie pode incorporar MO e pequenos pedaços de carvão ao longo do perfil, como observado por Ponge et al. (1996). A estrutura granular macroagregada encontrada nos horizontes antrópicos pode ser atribuída ao processo de bioturbação faunística (DEMETRIO, 2019), e sua locomoção também aumenta o número de canais biológicos comparados aos solos adjacentes (MACEDO, 2014).

Desta forma, podemos supor que as minhocas presentes tanto nas TPIs in situ, quando inoculadas em Terra Preta Nova, podem ter importantes efeitos positivos sobre o crescimento das plantas, podendo ser também um importante componente na gênese e manutenção desses solos. Esses efeitos seriam estimulados através da bioturbação e pela ingestão e incorporação de biocarvão em seus coprólitos, o que pode alterar a estabilidade e funcionalização do carbono, influenciando na disponibilidade de nutrientes e MO do solo.

O efeito positivo sobre as plantas, evidenciado na interação significativa das minhocas com o biochar (PB), levou a um ínfimo aumento (2%) na massa seca do milho (Figura 7), pode ser atribuído ao aumento significativo nos teores de P disponível no solo (Tabela 6) em função de maior atividade enzimática em presença das minhocas. A escavação e produção de coprólitos estimula e desencadeia mudança nas comunidades microbianas (LIPIEC et al., 2016; HOANG et al., 2016), que também podem ser afetadas pela adição do biochar. Paz-Ferreiro et al. (2015) evidenciaram interação entre as minhocas *P. corethrus* e biochar, comprovando aumento da atividade enzimática nos ciclos de C, P e S em solos tropicais. Sanchez-Hernandez (2018) verificaram aumento da atividade de carboxilases, fosfatase, β -glicosidade nos solos dos tratamentos com minhocas e carvão. As minhocas *P. corethrus* ingerem biochar (PONGE et al., 1996) e incorporam e transformam esse biochar (capítulo 1), favorecendo a formação de húmus estável nas TPIs. O carvão ingerido juntamente com

partículas de solo é misturado com o muco secretado no esôfago e finamente moído na moela muscular das minhocas, sendo excretado na forma de coprólitos, formando um húmus escuro (HAYES, 1983).

Os solos TPI eram locais de moradia dos povos pré-colombianos, que serviram de depósitos de resíduos de origem vegetal (folhas, talos, cascas de mandioca, sementes) e animal (ossos, sangue, gordura, fezes, conchas), além de uma grande quantidade de carvão vegetal, constituído de cinzas e resíduos de fogueiras (GLASER; BIRK, 2012). Esse grande aporte de material orgânico, contribuiu para a formação de solos altamente férteis, com teor elevado de MO estável de origem pirogênica (KERN, 1996; COSTA; KERN, 1999). A aplicação de biochar no solo pode influenciar a capacidade de armazenamento de água e a atividade microbiana (ATKINSON et al., 2010; GLASER et al., 2002), aumentando também a absorção de nutrientes pelas plantas (Lehmann et al. 2003). O biochar também pode ser um refúgio físico importante para os microrganismos, por sua grande área superficial específica e estrutura porosa, alterando a atividade e estrutura da comunidade microbiana (ATKINSON et al., 2010; STEINBEISS et al., 2009; GÓMEZ et al., 2014). Contudo, em nosso ensaio não observamos aumento na altura e massa seca da parte aérea das plantas nos tratamentos com biochar (Figura 2 e 3), bem como não foram observadas alterações importantes nas características químicas dos solos (Tabela 6).

Nos tratamentos com adição de biochar e minhocas concomitantemente ocorreu acréscimo na massa seca de plantas (Figura 8), porém sem diferença significativa com os tratamentos com somente *P. corethrurus*. Portanto o maior efeito sobre o crescimento de plantas se deve a adição das minhocas, e não do biochar. O efeito sinérgico da combinação minhoca e biochar no crescimento das plantas de milho indica a complexidade dos processos interativos que ocorrem no solo. A presença de ambos os fatores pode desencadear mudanças nas comunidades microbianas (LIPIEC et al., 2016; HOANG et al., 2016), afetando a atividade das enzimas, ciclos de nutrientes e por consequência crescimento das plantas. Contudo, maiores esforços de pesquisa são necessários para comprovar essas hipóteses, já que essas variáveis não foram avaliadas no presente experimento.

Fragmentos cerâmicos em geral são abundantes nos horizontes dos solos TPI, sendo a principal evidência da ocupação pré-colombiana na Amazônia (COSTA et al., 2009; GLASER; BIRK 2010). Em estudos químicos e de difração de raio-X, verificou-se que os fragmentos presentes nos solos antrópicos podem ser uma importante fonte potencial de

nutrientes, em especial de P (VALENTE et al., 2017). No entanto, as propriedades mineralógicas e conseqüentemente o estoque de nutrientes das cerâmicas depende da matéria prima utilizada (argila) e da temperatura de queima (COSTA et al., 2009). Além disso, os fragmentos cerâmicos são estruturas porosas que podem interferir na retenção de água no solo (MACEDO et al., 2008).

No presente experimento, os fragmentos cerâmicos de vaso usados não tiveram efeito sobre a altura, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz das plantas, mas observou-se aumento de 25% no volume de raiz (Figura 5). Isso pode ser devido a alterações nas características físicas do solo com adição de cerâmica, já que a análise química dos solos com cerâmica mostrou apenas redução na acidez potencial (H+Al). Por se tratar de uma estrutura porosa, a cerâmica pode favorecer a retenção de água no solo, garantindo um melhor desenvolvimento das raízes do milho. As cerâmicas usadas no experimento não foram analisadas quimicamente, mas sabe-se que cerâmicas podem ter nutrientes de liberação lenta, como o Ca e o Mg, além de outros nutrientes para as plantas (COSTA et al., 2004).

Nos tratamentos com adição de cerâmica e minhocas (CP) observou-se efeito positivo sobre o crescimento das plantas de milho, com incremento de 38% na massa seca das plantas (Figura 9). Cunha et al. (2016) e Demetrio (2019) também observaram interação importante entre minhocas e cerâmicas em solos TPI, com maior quantidade de agregados biológicos e maior biomassa de minhocas associada a presença de fragmentos cerâmicos. O efeito positivo dessa interação no crescimento das plantas pode estar relacionado aos maiores teores de P observado nos solos com adição dos dois fatores (Tabela 6). A cerâmica também pode ter tido efeito nas propriedades físicas do solo, alterando a estrutura e teor de umidade, criando assim um micro-habitat útil para a biota do solo. As minhocas por sua vez por estarem em ambientes mais favoráveis ao seu desenvolvimento, poderiam induzir mudanças na disponibilidade dos nutrientes, como o P e N (BAROIS et al., 1999).

A adição de MO aumentou todos os parâmetros avaliados da planta. Esse resultado pode ser atribuído a capacidade do esterco em prover nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas, o que ficou evidente na análise química do solo com esterco (Tabela 6), onde observou-se aumento nos níveis de Ca, Mg, K, P (e também de C), suprindo, assim, parte das necessidades das plantas. Além disso, a adição de MO mudou o pH CaCl₂ e diminuiu o Al³⁺, o que pode ter favorecido o desenvolvimento das raízes. Dentre os nutrientes disponibilizados pela MO, o nitrogênio é o mais requerido pela maioria das culturas,

incluindo o milho. Segundo Cantarella et al. (2008), mais de 90% do N do solo encontra-se no compartimento orgânico, sendo inevitável a associação de sua disponibilidade com o esterco adicionado. Esse esterco também possui P e a MO reduz sua adsorção nas argilas, facilitando, assim, a liberação para solução do solo (PAVINATO; ROSOLEM, 2008). Assim, os valores de P nas plantas com MO foram maior que todos os demais tratamentos.

O solo utilizado em nosso ensaio é altamente intemperizado, formado por argilominerais como a caulinita e óxidos de Fe e Al, os quais possuem pouca ou nenhuma carga estrutural. Nesses solos, a MO é o fator mais importante para o desenvolvimento de cargas negativas, pela dissociação do íon H^+ de seus grupos funcionais (PEIXOTO, 1997). Isso explica o fato da CTC desses solos estar associada a MO e, portanto, o aumento na CTC com adição da MO observado em nossos resultados (Tabela 6), pode ser relacionada ao aumento observado nos teores de C, já que apresenta elevada quantidade de grupos funcionais (carboxílicos, fenólicos, quinonas, semiquinonas, aldeído, álcool, amina, ester e éter), baixo ponto de carga zero e elevada superfície específica (BAYER; MIELNICZUK, 2008). Isso pode resultar em maior número de cargas negativas e maior capacidade de armazenamento de cátions no solo do que os argilominerais 1:1 e os óxidos, componentes principais de solos muito intemperizados como o Latossolo utilizado no experimento (CASTRO et al., 2014).

Em relação aos tratamentos com adição de MO e minhocas (MP), verificou-se aumento de 19% na massa seca de plantas (Figura 10), que pode ser atribuído ao acréscimo do P disponível observado nos solos com adição de ambos os fatores, apesar da maior produtividade e absorção de P pelas plantas nesses tratamentos. Nos tratamentos com a combinação de MO e biochar (MB), a MO teve maior efeito no crescimento das plantas (Figura 10), tanto na presença quanto na ausência do carvão. Sobre as características químicas do solo, o mesmo comportamento foi observado, onde os teores de Ca, Mg e K foram maiores em relação aos tratamentos sem a presença de ambos os fatores, apesar desses teores não diferiram dos encontrados nos tratamentos com adição somente de MO (Tabela 6). No entanto o teor de P aumentou nessa interação, o que pode ser em função de alterações nas características físicas do solo com adição do biochar, garantindo maior retenção de água no solo, o que pode ter favorecido o crescimento das populações microbianas e a mineralização dos nutrientes (PIGNATELLO et al., 2006; ZHANG et al., 2013; ZHU et al., 2017).

Em relação aos solos TPI, a grande diferença na sua fertilidade pode ser atribuída a composição e as características da MO. A estrutura química do carvão vegetal presentes nos

solos TPI é caracterizado pelas substâncias aromáticas policondensadas que são responsáveis pela estabilidade prolongada contra a degradação microbiana e, após a oxidação parcial, pela maior retenção de nutrientes (GLASER et al., 2001). Contudo, o biochar das TPIs não é o fator principal para o maior teor e nutrientes nesses solos (WOODS; MANN, 2000): esses nutrientes provêm dos excrementos humanos e animais incorporados pelos povos pré-colombianos (ricos em fósforo e nitrogênio), ossos de mamíferos e espinhas de peixe (ricos em P e Ca), e a biomassa vegetal terrestre e de plantas aquáticas (adubos verdes, algas) (GLASER, 2001). Porém, o fósforo e cálcio disponíveis resultam do acúmulo de resíduos de peixes, compostos de fosfatos biogênicos de cálcio (LEHMANN et al., 2004).

Em nosso ensaio, a adição de farinha de espinha de peixe aumentou todos os parâmetros de crescimento avaliados nas plantas de milho. Os solos dos tratamentos com adição espinhos triturados (E+) tiveram aumento de 20% nos teores de Ca e 18% nos teores de Mg em relação aos tratamentos sem adição da espinha, e por consequência a soma de bases apresentou acréscimo de 20% (Tabela 6). Espinhas de peixes são importantes locais de armazenamento elementar em animais, contendo elementos essenciais tais como cálcio, magnésio e enxofre, e também oligoelementos, como ferro, zinco, manganês e cádmio (Buddhachat et al., 2016). Porém, o maior efeito significativo observado com farinha de espinha foi nos teores de P do solo, com aumento de 80% em relação aos solos sem adição. A farinha de espinha de peixe é uma excelente fonte de P, com cerca de 19% de P_2O_5 e 36% de CaO (BUDDHACHAT et al., 2016). São inúmeros os trabalhos que comprovam a eficácia de tecidos ósseos animais como fonte potencial de fosfato e cálcio para os solos (HODSON; VALSAMI-JONES, 2000; SNEDDON et al., 2008). Estudos micromorfológicos nas TPIs da Amazônia Central mostraram que os altos teores de P e Ca podem estar relacionados a presença de fragmentos ósseos microscópios e espinhos de peixe, que são basicamente constituídos de apatita biogênica (WOODS, 2010). Esses materiais foram incorporados através do descarte ocasional ou enterrados pelos povos pré-colombianos, como demonstrado por Schaefer et al. (2004) e Lima et al. (2002), contribuindo para a fertilidade desses solos.

Em relação às interações entre a espinha de peixe e demais fatores foi possível observar um acréscimo significativo na massa seca das plantas nos tratamentos EP e EM (Figura 11). A espinha proporcionou ao solo um acréscimo de nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas, e esse efeito foi adicional com minhocas, que facilitam a mineralização dos nutrientes, ocasionando maior disponibilidade aos solos, como observado

para o P (Tabela 6), resultando em maior crescimento das plantas. As apatitas biogênicas possuem relação de Ca/P igual a 2, e nas TPIs há acumulação de P não associada a valores de Ca elevados, atribuído à presença de seções de canais biológicos, com alto teor de C orgânico (LIMA et al., 2010). Essa forma de P ligada a MO e Al possivelmente seja produto da atividade das minhocas. Portanto, as minhocas podem influenciar não só na distribuição do nutriente no perfil do solo, mas também no status biogeoquímico do P, em solos TPI.

4.6.2 ANÁLISE NUTRICIONAL DAS PLANTAS DE MILHO

O aumento nos teores de N das plantas na presença MO e espinha de peixe (Figura 12) pode ser explicado pelo maior aporte de nutrientes que o esterco e a espinha de peixe proporcionaram as plantas. Esses resíduos são capazes de elevar os teores de N nos solos, reduzindo as perdas por imobilização por microrganismos e liberação gradual do nutriente (ANDERSON; DOMSCH, 1980; AMADO et al., 1999). Os resíduos orgânicos, tais como o esterco e a espinha de peixe liberam carbono, nitrogênio e outros componentes simples durante o processo de decomposição, dos quais parte retorna à atmosfera na forma de gás (CO_2 , NH_3 , etc.), parte é imobilizada pelos microrganismos decompositores, parte permanece na forma prontamente disponível para as plantas e o restante é perdido por lixiviação ou direcionado à produção de substâncias húmicas (STEVENSON, 1985).

Na planta, o N é constituinte de proteínas e interfere diretamente no processo fotossintético (Andrade et al., 2003), de modo que uma maior oferta do nutriente resulta no aumento da taxa de fotossíntese, levando à maior acumulação de biomassa, resultado que foi observado nas plantas presentes nos tratamentos com adição de MO e espinha de peixe (Figura 2, 3, 4 e 5). Esse ganho de biomassa, por sua vez, estimula a absorção radicular (BENDER et al., 2013), havendo, conseqüentemente, aumento no processo de acúmulo de N pelas plantas cultivadas no ambiente de alto investimento de nutrientes.

A quantidade de N que o milho necessita absorver varia de acordo com a faixa de rendimento da cultura. Conforme Fontoura e Bayer (2009), para rendimentos entre 8 a 10 t ha⁻¹ o milho cultivado sob plantio direto no Paraná absorve em média 105 Kg ha⁻¹ de N. Em nosso experimento o cultivo de milho não teve por objetivo a alta produção, mas sim utilizar a planta como indicador do efeito dos diferentes fatores. Além disso, nossas plantas ficaram em casa de vegetação apenas 55 dias, sendo observado pouco aporte de N em relação aos valores

encontrados na literatura. Também verificamos interação significativa em relação aos teores de N das plantas nos tratamentos com adição de cerâmica e espinha de peixe (CE). Acreditamos que a cerâmica, por apresentar uma estrutura porosa, pode ter servido de refúgio para os microrganismos, favorecendo a mineralização dos nutrientes presentes na farinha de espinha de peixe, ocasionando maior disponibilidade dos elementos ao solo e por consequência incrementos nos teores de N nas plantas.

A adição de minhocas, biochar, cerâmica e MO (PBCM), também apresentou efeito significativo sobre os teores de N. Esse resultado pode ser explicado pelo aporte de nutrientes que a MO proporcionou as plantas, bem como o efeito físico causado no solo pela adição de minhocas (bioturbação), e a interação destas com a cerâmica, o biochar e a microbiota, o que pode ter sido favorecida, acelerando o processo de mineralização da MO. Em estudos realizados por Nelissen et al. (2012), observaram-se aumentos nos teores de nitrato no solo em decorrência das bactérias oxidantes de amônia, promovidas pela presença do biochar (BALL et al., 2010). A presença de minhocas no solo também estimula os processos químicos e biológicos do solo, influenciando nas concentrações de nutrientes, proporcionando maior proporção de fungos, bactérias e crescimento de plantas (BROWN et al., 2004).

Os teores de P nas plantas seguiram a mesma tendência do N, onde os aumentos foram significativos com adição de M (38%) e E (27%) (Figura 13), em decorrência do maior aporte de nutrientes desses resíduos, como observado na análise química do solo (Tabela 6). A MO aumenta a disponibilidade de fósforo, e reduz sua adsorção nas argilas, facilitando assim a liberação para solução do solo (PAVINATO; ROSOLEM, 2008). Foi também verificado aumento do pH CaCl_2 e SMP e diminuição da acidez potencial (H^+Al) nos solos com adição da MO (Tabela 6), o que pode ser justificado pela descarboxilação dos ácidos orgânicos, durante a decomposição inicial do esterco, processo em que há formação de substâncias fenólicas e também de substâncias húmicas. Com a formação de ânions orgânicos a partir destas substâncias, pode ocorrer consumo de prótons (H^+) e por consequência aumento do valor de pH do solo (NARAMABUYE; HAYNES, 2006), fator esse que pode ter influenciado na disponibilidade do P no solo (Tabela 6) e nas plantas (Figura 13).

Nos tratamentos com adição de minhocas (P) também se observou efeito significativo sobre os teores de P nas plantas (Figura 13). Esse resultado pode ser explicado pelo efeito das minhocas sobre a disponibilidade do fósforo no solo, em função da maior atividade de fosfatases e estímulo da atividade microbiana (PRAKASH et al., 2010), como observado na

Tabela 6. A atividade da microbiota intestinal nas minhocas pode desempenhar papel fundamental no aumento de P disponível no solo dos coprólitos (KAVIRAJ; SHARMA, 2003), e por consequência nos teores absorvidos pela planta. Além disso, as minhocas estimulam o crescimento dos fungos micorrizicos através da excreção de coprólitos e abertura de galerias que promovem a dispersão dos esporos e infecção micelial (LI et al., 2019), fenômeno já comprovado para a espécie utilizada aqui (BROWN et al., 2000). Os principais benefícios das micorrizas sobre o crescimento das plantas são devido ao aumento da superfície de absorção e maior exploração do volume do solo pelo sistema radicular das plantas. Isto se reflete em maior absorção de nutrientes, principalmente aqueles que se movem no solo por difusão, como o P. As minhocas também favoreceram o desenvolvimento das raízes, ocasionando o maior contato da planta com o volume total de solo.

Também foi observada interação significativa no teor de fósforo nas plantas com adição de minhocas e espinha de peixe (PE). A presença das minhocas pode ter favorecido a mineralização de P presente no espinho, através da fragmentação e estimulação da atividade microbiana, ocasionando maior liberação para as plantas, além do efeito estimulante a atividade de fosfatases como mencionado anteriormente.

Os teores foliares de potássio nas plantas aumentaram nos tratamentos com M (27%) e E (23%) (Figura 14). Esse resultado se deve ao maior aporte do nutriente com esses resíduos no solo, ocasionando maior absorção pelas plantas e por consequência maior teor em seus tecidos. Foi também verificado incremento nos teores de K nos tratamentos com biochar e cerâmica (BC) e minhocas biochar e espinha de peixe (PBE). Vários estudos relataram que as alterações que ocorrem no biochar no solo aumentam os níveis de nutrientes, como N, P, Ca e K (ORAM et al., 2014; WIDOWATI; ASNAH, 2014; MARKS et al., 2015; LIU et al., 2015). Além disso, o biocarvão aumenta os nutrientes disponíveis no solo na zona radicular das plantas, e reduz a lixiviação de nutrientes melhorando, assim, o teor de nutrientes nas plantas em solos tropicais ácidos e altamente intemperizados, como o usado nesse experimento (STEINER et al., 2008; LEHMANN et al., 2015).

Em relação aos teores de cálcio nas plantas observamos aumento com MO (M), atribuído ao teor de Ca nesse resíduo (BOT; BENITES, 2005; ONWUDIKE, 2010). Já em relação aos teores de Mg, a adição de MO resultou em pequeno incremento desse nutriente nas plantas (3%) (Figura 16), apesar do aumento nos teores observado nos solos após aplicação do esterco (Tabela 6). Esse resultado pode ser explicado pelo antagonismo entre o

Ca e Mg, já que o aumento na absorção de Ca pode ter reduzido a absorção de Mg nas plantas de milho (FOX; PIEKIELEK, 1984). Estes resultados já foram encontrados em outros estudos, onde foi observada redução nos teores de Mg no tecido da soja e milho (KEY; KURTZ; TUCKER, 1961) na medida em que aumentavam as relações Ca:Mg no solo. Os valores observados para o elemento Mg ficaram abaixo do mínimo adequado para a cultura do milho. Contudo, há que se tomar cuidado na interpretação dos teores de nutrientes na parte aérea do milho do presente estudo em relação aos teores considerados adequados pela literatura, já que normalmente são medidos em plantas na fase reprodutiva, após início do florescimento, enquanto no presente experimento a análise foi realizada em plantas com 55 dias de crescimento.

Foi observado também incremento de Ca nas plantas dos tratamentos com adição de minhocas, cerâmica e MO (PCM). Além do efeito da MO sobre a disponibilidade de cálcio no solo (Tabela 6), e por consequência sua maior absorção pelas plantas, a minhoca pode ter tido influência sobre esses teores através da produção de carbonato de cálcio pelas glândulas calcíferas, alterando o pH e os teores Ca disponível (FIUZA et al., 2011).

Os fatores que mais tiveram influência sobre as características químicas do solo e o teor de nutrientes nas plantas foram a presença de MO e espinha de peixe, ingredientes das TPIs que disponibilizaram nutrientes essenciais ao solo, como Ca, Mg, P e K, favorecendo o crescimento das plantas de milho. A presença de minhocas também teve importante influência na fertilidade dos solos e crescimento das plantas, podendo ser um importante componente na gênese e manutenção dos solos, e para a formação de TPN, através dos efeitos físicos da bioturbação, pela ingestão e incorporação de carvão em seus coprólitos, a estabilidade e funcionalização do carbono, e a disponibilização de nutrientes e mineralização da MO do solo.

4.6.3 BIOMASSA E REPRODUÇÃO DAS MINHOCAS

Os tratamentos com maior mortalidade de minhocas foram os com adição de MO e espinha de peixe (Tabela 7), em especial quando estiveram presentes concomitantemente. As plantas presentes nesses tratamentos apresentaram maior desenvolvimento, portanto suas exigências hídricas foram maiores, e as minhocas podem ter sofrido por competição hídrica com as plantas, que ocasionaram menores teores de umidade no solo. Nesses tratamentos,

também foram encontrados poucos ou nenhum casulo. Ao contrário, os tratamentos com adição de minhocas e cerâmica (PC), minhocas, biochar e espinha de peixe (PBE) e minhocas, cerâmica e espinha de peixe (PCE) apresentaram maiores produções de casulos, que pode indicar uma importante interação entre minhocas e cerâmica, que precisa ser melhor explorada.

4.7 CONCLUSÃO

A presença de minhocas *P. corethrurus* (P), MO (M) e espinha de peixe (E) nos solos resultou em importantes efeitos positivos sobre as características químicas do solo e o crescimento de plantas de milho. Esses componentes apresentam grande influência na gênese e características dos solos TPI, e são essenciais na formação de TPN. O efeito das minhocas nesses solos se deve não somente pela distribuição do carvão pirogênico no perfil, mas também pelas transformações nas características químicas, físicas e biológicas do solo após passagem pelo trato intestinal e essas modificações refletiram positivamente na produção vegetal das plantas. A adição de MO e espinha de peixe ao solo são os principais responsáveis pelo aporte de nutrientes, no entanto concluímos que as interações entre os diferentes fatores apresentam efeito sinérgico sobre o crescimento das plantas e fertilidade do solo, indicando a complexidade dos processos que ocorreram e ocorrem nos solos TPI e TPN.

4.8 REFERÊNCIAS:

ACHAZI, R.K.; FLENNER, C.; LIVINGSTONE, D.R.; PETERS, L.D.; SCHAUB, K.E. Cytochrome P450 and dependent activity in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology and directions for future research. *In*: F.A. Schoolmaster (Ed.) **Papers and Proceedings of the Applied Geography Conferences**, v. 23, p.114-121, 2000.

ANDERSON, J.M., INGRAM, J. Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods. Oxford: CAB International, 1993.

ATKINSON, C.J.; FITZGERALD, J.D.; HIPPS, N.A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and soil**, v. 337, p. 1-18, 2010.

BASKER, A.; MACGREGOR, A.N.; KIRKMAN, J.H. Exchangeable potassium and other cations in noningested soil and casts of two species of pasture earthworms. **Soil Biol. Biochem**, v.25, p.1673-1677, 1993.

BAYON, L.R.C.; BINET, F. Earthworm changes the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. **Soil Biol Biochem**, v. 38, p. 235–246, 2006.

BELFROID, A.; MEILING, J.; DRENTH, H.J.; HERMENS, J.; SEINEN, W.; GESTEL, K.V. Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 31, p. 185-191, 1995.

BERTON, R.S.; PRATT, P.F.; FRANKENBERGER, W.T. Phosphorus availability in soils amended with organic materials, estimated by three chemical methods and two enzyme activities. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 617-624, 1997.

BOSSUYT, H.; SIX, J.; HENDRIX, P.F. Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. **Soil Biol. Biochem**, v. 37, p. 251-258, 2005.

BOT, A.; BENITES, J. The importance of soil organic matter, Key to drought-resistant soil and sustained food production. FAO Soils Bulletin 80, 2005.

BRIONES, M.J.I.; OSTLE, N.J.;PIEARCE, T.G. Stable isotopes reveal that the calciferous gland of earthworms is a CO₂-fixing organ. **Soil Biol. Biochem**, v. 40, p. 554-557, 2008.

BROWN, G.G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant Soil**, v. 170, p. 209–231, 1995.

BROWN, G.G. E DOMINGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – O 3º Encontro Latino Americano de Taxonomia de Oligoquetas (ELAETA03). **Acta Zool. Mexicana**, v. 2, p.1-18, 2010.

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 Soil Biology**, v. 36, p.177–198, 2000.

BROWN, G.G.; EDWARDS, C.A.; BRUSSAARD, L. How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. *In*: Edwards, C.A. (Ed.) *Earthworm Ecology*, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, 2004, p.13-49.

BROWN, G.G.; JAMES, S.W.; PASINI, A.; NUNES, D.H.; BENTO, N.P.; MARTINS, P.T.; SAUTTER, K.D. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: Diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, v. 42, p.339–358, 2006.

BRUSSAARD, L.; RUITER, P.C.; BROWN, G. Soil biodiversity for agricultural SUSTAINABILITY. **AGRICULTURE, ECOSYSTEMS AND ENVIRONMENT**, V. 121, P. 233–244, 2007.

BUCH, A.C.; BROWN, G.G.; CORREIA, M.E.F.; LOURENÇATO, L.F.; SILVA-FILHO, E.V. ECOTOXICOLOGY of mercury in tropical forest soils: Impact on earthworms. **Science of the Total Environment**, v. 589, p. 222-231, 2017.

BUCH, A.C.; BROWN, G.G.; NIVA, C.C.; SAUTTER, K.D.; LOURENÇATO, L.F. (2011) Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. **Pedobiologia**, v. 54, p. S19–S25.

BUCH, A.C.; BROWN, G.G.; NIVA, C.C.; SAUTTER, K.D.; SOUSA, J.P. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**, v. 69, p.32-38, 2013.

BUDDHACHAT,K.; KLINHOM,S.; SIENGDEE,P.; BROWN,J.L.; NOMSIRI,R. Elemental Analysis of Bone, Teeth, Horn and Antler in Different Animal Species Using Non-Invasive Handheld X-Ray Fluorescence. **PLOS ONE**, v. 5, p.1-21, 2016.

BUSS, W.; GRAHAM, M.C.; SHEPHERD, J.G.; MAŠEK, O. Suitability of marginal biomass-derived biochars for soil amendment. **Sci Total Environ**, v. 547, p.314–322, 2016.

CANTARELLA, H., ANDRADE, C.A., JUNIOR, D.M. Matéria Orgânica Do Solo E Disponibilidade De Nitrogênio Para As Plantas. *In*: Santos, G.A. De., Silva, L.S. Da., Cantanellas, L.P., Camargo, F.A.O. (Eds) Fundamentos Da Matéria Orgânica Do Solo: Ecossistemas Tropicais & Subtropicais. Rev. E Atual. Porto Alegre: Metrópole, 2008, p. 582.

CANTI, M.G.; PEARCE, T.G. Morphology and dynamics of calcium carbonate granules produced by different earthworm species: The 7th international symposium on earthworm ecology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 511–521, 2002.

CHENG, C.H.; LEHMANN, J.; THIES, J.E.; BURTON, S.D.; ENGELHARD, M.H. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. **Organic Geochemistry**, v. 37.p. 1477-1488, 2006.

CLASIN, A.A.M.; PEDROZO, M.F.M. O estudo da toxicologia. *In*: As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Azevedo FA & Clasin AAM (Eds.) Rima/InterTox, São Carlos/São Paulo, 2004, 340.

CLAUSE, J.; BAROT, S.; FOREY, E. Earthworms promote greater richness and abundance in the emergence of plant species across a grassland-forest ecotone. **J. Plant Ecol.**, v. 9, p.703-711, 2006.

CONTRERAS-RAMOS, S.M.; ÁLVAREZ-BERNAL, D.L. Dendo oven *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 396-401, 2006.

COSTA, M.L.; CARMO, M.S.; OLIVEIRA, E.C.; LIMA, H.; KERN, D.C.; GOESKE, J. Mineralogia e Composição Química de Fragmentos de Cerâmicas Arqueológicas em Sítios de Terra Preta de Índio. *In*: Teixeira W. (Ed) As Terras Pretas de Índio da Amazonia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009, 420.

CUNHA, L.; BROWN, G.G.; STANTON, D.W.G.; DA SILVA, E.; HANSEL, F. A.; JORGE, G.; MCKEY, D.; VIDAL-TORRADO, P.; MACEDO, R.S.; VELASQUEZ, E.;

JAMES, S.W.; LAVELLE, P.; KILLE, P.; the Terra Preta de Indio Network Soil Animals and Pedogenesis: The Role of Earthworms in Anthropogenic Soils. **Soil Science**, v. 181, p. 110–125, 2016.

CUNHA, T.J.F.; MADARI, B.E.; BENITES, V.M.; CANELLAS, L.P.; NOVORNY, E.H.; MOUTTA, R.O.; TROMPOWSKY, P.M.; SANTOS, G.A. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte a antrópico da Amazônia (Terra Preta). **Acta Amazonica**, v. 37, p. 91-98, 2007.

CURRY, J.P.; SCHMIDT, O. The feeding ecology of earthworms-a review. **Pedobiologia**, v. 50, p. 463–477, 2007.

CURRY, J.P. Factors affecting the abundance of earthworms in soils. **Earthworm ecology**, p. 91-113, 2004.

DARWIN, C. The Formation of Vegetable Mould Through the Action of Worms, With Observations on Their Habits. London, J. Murray, p. 326, 1881.

DEHKHODA, A.M., ELLIS, N. Biochar-based catalyst for simultaneous reactions of esterification and transesterification. **Catalysis Today**, v. 207, p. 86-92, 2013.

DRISCOLL, S.B.K.; MCELROY, A.E. Elimination of sediment-associated benzo[a]pyrene and its metabolites by polychaete worms exposed to 3-methylcholanthrene. **Aquatic Toxicology**, 1996.

EDWARDS, C. A. & BOHLEN, P.J. Biology and Ecology of earthworms. 3rd. Edition. Chapman & Hall, v. 426, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solos. Rio de Janeiro, Embrapa, 1979, p. 412.

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N.B. A fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. *In*: Teixeira, W.G.; Kern, D.C.; Madari, B.E.; Lima, H.N.; Woods, W. (Ed.). As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus, v.13, p. 172-188, 2009.

FIUZA, S.S.; KUSDRA, J.F.; FURTADO, D.T. Caracterização Química e Atividade microbiana de coprólitos de Chibui bari (Oligochaeta) e do solo adjacente. **R Bras. Ci. Solo.**, v. 35, p. 723- 728, 2011.

GAGO-DUPORT, L.; BRIONES, M.J.I.; RODRÍGUEZ, J.B.; COVELO, B. Amorphous calcium carbonate biomineralization in the earthworm's calciferous gland: Pathways to the formation of crystalline phases. **Journal of Structural Biology**, v. 162, p. 422–435, 2008.

GHOSH, M.; CHATTOPADHYAY, G.N.; BARAL, K. Transformation of Phosphorus During Vermicomposting. **Bioresource Tech.** v. 9, p. 149-154, 1999.

GLASER, B.; BALASHOV, E.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. Black carbon in density fractions of anthropogenic soils of the Brazilian Amazon region **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 669-678, 2000.

GLASER, B.; BIRK, J.J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 82, p.39–51, 2012.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W.; RUIVO, M.L. Soil organic matter stability in Amazonia Dark Earths', *In*: Lehmann J, Kern D, Glaser B, Woods W. Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, and Management, 2003, p. 141-158.

GÓMEZ, J.D.; DENEFF, K.; STEWART, C.E.; ZHENG, J.; COTRUFO, M.F. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. **Eur. J. Soil Sci**, v. 65, p.28-39, 2014.

GROFFMAN, P.M.; FAHEY, T.J.; FISK, J.B.; YAVITT, R.E.; SHERMAN, P.J.; BOHLEN, P.J.; MAERZ, J.C. Earthworms increase soil microbial biomass carrying capacity and nitrogen retention in northern hardwood forests. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 87, p. 51-58, 2015.

HALE, S.E.; LEHMANN, J.D.; RUTHERFORD, A.R.; ZIMMERMAN, R.T.; BACHMANN, V.; SHITUMBANUMA, A.O. Cornelissen Quantifying the total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins in biochars, v. 46, p. 2830-2838, 2012.

HEDLEY, M.J.; STEWART, J.W.B.; CHAUHAN, B.S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of American Journal**, v. 46, p. 970-976, 1982.

HERNÁNDEZ-CASTELLANOS, B., BAROIS, I., BROWN, G.G., GARCÍA-PÉREZ, J.A. Modificaciones químicas inducidas por dos espécies de lombrices geófagas em solos de Veracruz, México. **Acta Zoologica Mexicana**, 2010.

HMAR, L., RAMANUJAM, S. Earthworm cast production and physic-chemical properties in two agroforestry systems of Mizoram (India). **Trop. Ecol.** , v. 55, p. 77-86, 2014.

HOANG, D.T.T.; PAUSCH, J.; RAZAVI, B.S.; KUZYAKOVA, BANFIELD, C.C.; KUZYAKOV, Y. Hotspots da atividade microbiana induzida por buracos de minhoca, canais de raiz velhos, e a combinação deles/delas em subsolo. **Biol.Fert.Solos**, v. 52, p. 1105–1119, 2016.

HODSON, M.E.; VALSAMI-JONES, E.; COTTER-HOWELLS, J.D. Metal phosphates and remediation of contaminated land. *In*: **Environmental Mineralogy. Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Land and Waste Management**. Mineralogical Society Series, 2000, v. 9: p. 291–311, 2000.

HULUGALLE, N.R.; EZUMAH, H.C. Effects of cassava-based cropping systems on physico-chemical properties of soil and earthworm casts in a tropical Alfisol. **Agricul. Ecosyst. Environment**, v. 35, p. 55-63, 1991.

JAQUES, R.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.D. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1192-1201, 2007.

KERN, D.C. Geoquímica e pedogeoquímica de sítios arqueológicos com Terra Preta na Floresta Nacional de Caxiuanã (Portel-Pará). Belém, 124 f. Tese (doutorado em Geoquímica – Petrologia e geoquímica), Universidade Federal do Pará, Belém. 1996.

KMAK, J.I., KIM, S.W., NA, Y.J. A new and sensitive method for measuring in vivo and in vitro cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. **Environmental Research**, v. 134, p. 118-26, 2014.

LAMBKIN, D.C.; CANTI, M.G.; PEARCE, T.G.; HODSON, M.E. Dissolution rates of earthworm-secreted calcium carbonate. **Applied Geochemistry**, v. 26, p.S67– S69, 2011.

LAVELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P.; ROSSI, J. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Biology**, v. 42, p. S3-S15, 2006.

LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biol. Fertil. Soils**, v. 3, p. 237-251, 1988.

LEE, K.A. Earthworms: Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use. Academic Press, Sydney, 1985.

LEE, M.R.; HODSON, M.E.; LANGWORTHY, G.N. Crystallization of calcite from amorphous calcium carbonate: Earthworms show the way. **Mineralogical Magazine**, v. 72, p. 257–261, 2008.

LEE, Y.J.; PARK, C.; RYU, K.S.; GANG, W.; YANG, Y.; PARK, J.; JUNG, S. Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500°C. **Bioresour Technol.**, v. 148, p. 196-201, 2013.

LEHMANN J. Bio-energy in the black. **Ecology Environment**, v. 5, p. 381-387, 2007.

LI, D.; HOCKADAY, W.C.; MASIELLO, C.A.; ALVAREZ, P.J.J. Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting. **Soil Biol. Biochem.**, v. 43, p.1732–1737, 2011.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, v. 41, p. 206–213, 2010.

Liesch, A.M., Weyers, S.L., Gaskin, J.W., Das, K.C. (2010). Impact of two different biochars on earthworm growth and survival,” *Annals of Environmental Science* 4: 1–9.

LIMA, C.A. Avaliação de risco ambiental como ferramenta para o descomissionamento de uma indústria de metalurgia de zinco. 2009.238 f. (Tese de Doutorado)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, H.N.; SCHAEFER, C.E.G.R.; GILKES, R.J.; KER, J. C. Pedogenesis and pré-Colombian land use of “Terra Preta Anthrosols” (“Indian black earth”) Western Amazonia. **Geoderma**, v. 110, p.1-17, 2002.

LOPEZ-HERNANDEZ, D.; LAVELLE, P.; FARDEAU, J.C.; NINO, M. Phosphorous transformations in two P-sorption contrasting tropical soils during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae: Oligochaeta). **Soil Biol Biochem**, v. 25, p.789–792, 1993.

MA, W.C.H.; IMMERZEEL, J.; BODT, J. Earthworms and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: studies on phenanthrene and Fluoranthene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 32, p. 226-232, 1995.

MACEDO, R.S. Pedogênese e indicadores arqueopedológicos em Terra Preta de Índio no município de Iranduba - AM. Tese (Doutorado) Departamento de Ciência do Solo. Piracicaba: Esalq, 2014.

MARCONDES, L.C.; KERN, D.C.P.; SOUZA, A. H. T. The Ceramic Artifacts in Archaeological Black Earth, v. 34, p. 165 – 178, 2004.

MARICHAL, R.; MARTINEZ, A.F.; PRAXEDES, C.; RUIZ, D.; CARVAJAL, A.F.; OSZWALD, J.; DEL PILAR HURTADO, M.; BROWN, G.G.; GRIMALDI, M.; DESJARDINS, T.; SARRAZIN, M.; DECAËNS, T.; VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation. **Applied Soil Ecology**, v.46, p.443–449, 2010.

MARQUES, R.; MOTTA, A.C.V. Análise química do solo para fins de fertilidade. In: LIMA, M. R. de., ed. Manual de diagnóstico da fertilidade e manejo dos solos agrícolas. 2.ed. Curitiba, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, p. 81-102, 2003.

MARTOJA, R.; MARTOJA-PIERSON, M. Técnicas de Histología Animal, Toray-Masson, Barcelona, 1970.

MATERECHERA, S.A.; MANDIRINGANA, O.T.; NYAMAPFENE. Production and physico-chemical properties of surface castas from microchaetid earthworms in central Eastern Cape. **S.Afr. J. Plan. S.**, v. 15, p. 151-157, 1998.

MÉNDEZ, A.; GÓMEZ, A.; PAZ-FERREIRO, J.; GASCÓ, G. Effects of sewage sludge biochar on plant metal availability after application to a Mediterranean soil. **Chemosphere**. v. 89, p. 1354–1359, 2012.

MOLINE, E.F.V. Atributos químicos de solos da Amazônia Ocidental após sucessão da mata nativa em áreas de cultivo. *Revista de Ciências Agrárias. Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, p. 14-20, 2015.

MURPHY, J; RILEY, J.P. A modified single solution methods for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 26, p. 31-36, 1962.

NEUHAUSER, E.F; LOEHR, R.C.; MILLIGAN, D.L.; MALECKI, M.R. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 1, p.149-152, 1988.

OLESZCZUK, P.; JOSKO, I.; KUSMIERZ, M. Biochar properties regarding to contaminants content and ecotoxicological assessment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 260, p. 375-382, 2013.

Organisation for economic Cooperation and development (OECD). Guia para testes Químicos, OECD 207. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.

PAVINATO, P.S.; RROSOLEM, C.A. Disponibilidade de nutrientes no solo-decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p. 911-920, 2008.

PAZ-FERREIRO, J.; FU, S.; MÉNDEZ, A.; GASCÓ, G. Interactive effect of biochar and the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on plant productivity and soil enzyme activity. *J Soil Sediments*, v.14, p.483–494, 2014.

PAZ-FERREIRO, J.; FU, S.; MÉNDEZ, A.; GASCO, G. Interactive effect of biochar and the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on plant productivity and soil enzyme activity. *Journal Soil Sediments*, v. 14, p.483–494, 2014.

PAZ-FERREIRO, J.; LIANG, C.; FU, S.; MENDEZ, A.; GASCO, G. The effect of biochar and its interaction with the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on soil microbial community structure in tropical soils. *PLoS One* , v.10, 2015.

PEIXOTO, R.T.G. Matéria Orgânica E As Cargas Elétricas Dos Solos: Processos E Conseqüências. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., Rio De Janeiro, 1997. Anais. Rio De Janeiro, Embrapa CNPS, 1997.

PIGNATELLO, J.J.; KWON, S.; LU, Y.F. Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): attenuation of surface activity by humic and fulvic acids. *Environ. Sci. Technol*, v. 40, p.7757-7763, 2006.

PONGE, J.F.; TOPOLIANTZ, S.; BALLOF, S. Ingestion of charcoal by the Amazonian earthworm *Pontoscolex corethrurus*: a potential for tropical soil fertility, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, p.2008–2009, 2006.

PRAKASH, M.; KARMEGAM, N. Vermistabilization of press mud using *Perionyx ceylanensis* *Mich. Bioresources Technology*, v. 101, p. 8464–8468, 2010.

PUGA-FREITAS, R.; BAROT, S.; TACONNAT, L.; RENOUE, J-P.; BLOUIN, M. Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, v. 7, p. 49504, 2012.

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**, v. 45, p. 29-39, 2002.

RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA, 2016.
Sanchez-Hernandez JC, Ríos JM, Attademo AM. Response of digestive enzymes and esterases of ecotoxicological concern in earthworms exposed to chlorpyrifos-treated soils. *Ecotoxicology*. 2018, 27: 890-899.

SCHAEFER, C.E.G.R.; LIMA, H.N.; GILKES, R.J.; MELLO, J.W.V. Micromorphology and electron microprobe analysis of phosphorus and potassium forms of an indian black earth (IBE) anthrosol from western Amazonia. **Aust J Soil Res**, v. 42, p.401-9, 2004.

SCHULZ, H.; GLASER, B. Effects of biochar compared to organic and inorganic fertilizers on soil quality and plant growth in a greenhouse experiment. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, p. 1–13, 2012.

SHARPLEY, A.N.; SYERS, J.K. Seasonal variation in casting activity and in the amounts and release to solution of phosphorus forms in earthworm casts. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 9, p.227-231, 1977.

SNEDDON, I.R.; ORUEETXEBARRIA, M.; HODSON, M.E.; SCHOFIELD, P.F.; VALSAMIJONES, E. Use of bone meal amendments to immobilise Pb, Zn and Cd in soil: a leaching column study. **Environ. Pollut**, v. 144, p. 816– 825, 2006.

SPOKAS, A.; BAKER, M.; REICOSKY, C. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. **Plant Soil**, v. 333, p.443-452, 2012.

STEINBEISS, S.; GLEIXNER, G.M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. **Soil Biol Biochem**, v. 41, p.1301-1310, 2009.

TOPOLIANTZ, S.; PONGE, J.F. Burrowing activity of the geophagous earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) in the presence of charcoal. **Appl. Soil Ecol.**, v. 23, p. 267–271, 2003.

VAN ZWIETEN, L.; KIMBER, S.; MORRIS, S. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility, **Plant and Soil**, v. 327, p. 235–246, 2010.

VERSTEEGH, E.A.A.; BLACK, S.; HODSON, M.E. Carbon isotope fractionation between amorphous calcium carbonate and calcite in earthworm-produced calcium carbonate. **Applied Geochemistry**, v.78, p. 351-356, 2017.

VINOTHA, S.P.; PARTHASARATHI, K.; RANGANATHAN, L.S. Enhanced phosphatase activity in earthworm casts is more of microbial origin. **Current Science**, v. 79, p.1158-1159, 2000.

WEYERS, S.L.; SPOKAS, K.A. Impact of biochar on earthworm populations: A review. **Applied Environmental Soil Science**, 2011.

WOODS, W.I; MCCANN, J.M.; MEYER, D.W. Amazonian Dark Earth analysis: State of knowledge Yanai Y, Toyota K, Okazaki M. Effects of charcoal addition on N₂O emissions from soil resulting from rewetting air-dried soil in short-term laboratory experiments. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, p. 181-188, 2007.

YVAN, C.; STÉPHANE, S.; STÉPHANE, C.; PIERRE, B. Role of earthworms in regenerating soil structure after compaction in reduced tillage systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 55, p. 93-103, 2012.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T.M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p.117-161, 1997.

ZHANG, W.; SUN, H.W.; WANG, L. Influence of the interactions between black carbon and soil constituents on the sorption of pyrene. **Soil Sediment Contam**, v. 22, p.469-482, 2013.

ZHU, X.; CHEN, B.; ZHU, L.; XING, B. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 98-115, 2017.

5 CONCLUSÃO GERAL

O biochar, componente muito importante nas TPIs não teve efeito toxicológico sobre as minhocas *Pontoscolex corethrurus*. Além disso, após ingestão pelas minhocas, observaram-se alterações na composição química, como teores acentuados de lignina, alterações morfológicas, e evidência de atividade microbiana no biochar. Essa minhoca tem, portanto, potencial para transformar o biochar nos solos, alterando as características físicas, químicas e microbianas do biochar e influenciando na gênese das TPIs.

As minhocas *P. corethrurus* também afetam a disponibilidade de nutrientes no solo com e sem adição de corretivos, levando a aumentos principalmente no pH e nos teores de Ca e P após passagem do solo pelo trato intestinal. O cálcio das glândulas calcíferas, passa para o intestino e os coprólitos, influenciando no pH e na disponibilidade de nutrientes do solo. Contudo, altos níveis de condutividade elétrica ($> 2 \text{ mS cm}^{-1}$) nos aditivos podem ser prejudiciais à sobrevivência das minhocas *P. corethrurus*.

A adição de matéria orgânica e espinha de peixe ao solo são os principais responsáveis pelo aporte de nutrientes às TPIs, e pelo aumento na fertilidade do solo e a produção vegetal. Esses componentes apresentam grande influência na gênese e características dos solos TPI, e são essenciais na formação de TPN. Contudo, as minhocas também afetam a disponibilidade dos nutrientes do solo, e a produção de milho. Além disso, as interações entre os diferentes fatores presentes nas TPIs podem gerar efeitos sinérgicos sobre o crescimento das plantas e a fertilidade do solo, indicando a complexidade dos processos que ocorrem nos solos TPI e TPN.

6 REFERÊNCIAS

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 Soil Biology**, v. 36, p. 177–198, 2000.

CANTI, M.G.; PIEARCE, T.G. Morphology and dynamics of calcium carbonate granules produced by different earthworm species: The 7th international symposium on earthworm ecology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 511–521, 2002.

COSTA, M.L.; CARMO, M.S.; OLIVEIRA, E.C.; LIMA, H.; KERN, D.C.; GOESKE, J. Mineralogia e Composição Química de Fragmentos de Cerâmicas Arqueológicas em Sítios de Terra Preta de Índio. *In*: Teixeira W. **As Terras Pretas de Índio da Amazonia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental 420 p, 2009.

CUNHA, L.; BROWN, G.G.; STANTON, D.W.G.; DA SILVA, E.; HANSEL, F.A.; JORGE, G.; MCKEY, D.; VIDAL-TORRADO, P.; MACEDO, R.S.; VELASQUEZ, E.; JAMES, S.W.; LAVELLE, P.; KILLE, P., the Terra Preta de Indio Network. Soil Animals and Pedogenesis: The Role of Earthworms in Anthropogenic Soils. **Soil Science**, v. 181, p.110–125, 2016.

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N.B. A fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. *In*: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: 2009, v. 13, p.172-188.

GAGO-DUPORT, L.; BRIONES, M.J.I.; RODRÍGUEZ, J.B.; COVELO, B. Amorphous calcium carbonate biomineralization in the earthworm's calciferous gland: Pathways to the formation of crystalline phases. **Journal of Structural Biology**, v.162, p. 422–435, 2008.

GLASER, B.; BIRK, J.J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 82, p. 39–51, 2012.

LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biol. Fertil. Soils**, v. 3, p. 237-251, 1988.

LEE, K.A. Earthworms: Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use. Academic Press, Sydney, 1985.

LIMA, C.A. Avaliação de risco ambiental como ferramenta para o descomissionamento de uma indústria de metalurgia de zinco. 238 f. (Tese de Doutorado)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

PONGE, J.F.; TOPOLIANTZ, S.; BALLOF, S. Ingestion of charcoal by the Amazonian earthworm *Pontoscolex corethrurus*: a potential for tropical soil fertility, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2008–2009, 2006.

TOPOLIANTZ, S.; PONGE, J.F. Burrowing activity of the geophagous earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) in the presence of charcoal. **Appl. Soil Ecol**, v. 23, p. 267–271, 2003.

VERSTEEGH, E.A.A.; BLACK, S.; HODSON, M.E. Carbon isotope fractionation between amorphous calcium carbonate and calcite in earthworm-produced calcium carbonate. \ 78: 351-356, 2017.

ANEXO II

TABELA 1: RESULTADOS DOS TESTES GLM DE SIGNIFICÂNCIA PARA EFEITOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA PARTE AÉREA DO MILHO, BIOMASSA E COMPRIMENTO DAS RAIZES APOÓS 55 DIAS DE GERMINAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO. P = MINHOCÁ; B=BIOCHAR; C= CERÂMICA; M = MATÉRIA ORGÂNICA (ESTERCO DE CAVALO); E = FARINHA DE ESPINHA DE PEIXE; TRATAMENTOS COM EFEITOS PRINCIPAIS SIGNIFICATIVOS OU INTERAÇÕES SÃO DESTACADOS EM NEGRITO.

Tratamento	Altura	MS	MS raiz	Volume		Comprimento	Tratamento	Altura	MS aérea	MS raiz	Volume		Comprimento
				aérea	raiz						aérea	raiz	
P	**	***	***	**	ns	ns	BCM	ns	***	***	ns	ns	ns
B	ns	ns	ns	ns	ns	ns	PBE	ns	**	**	ns	ns	ns
C	ns	ns	ns	ns	ns	ns	PCE	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M	***	***	***	***	***	***	BCE	ns	**	ns	ns	ns	ns
E	***	***	***	***	***	***	PME	ns	ns	*	ns	ns	***
PB	*	***	*	ns	ns	ns	BME	ns	*	ns	ns	ns	ns
PC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	PBC	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BC	**	**	***	ns	ns	ns	CME	ns	*	ns	ns	ns	ns
PM	***	**	***	**	***	***	PBM	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BM	*	*	**	***	***	***	PCM	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CM	ns	ns	ns	**	***	***	PBCM	**	ns	ns	ns	ns	ns
PE	*	***	***	***	**	**	PBCE	ns	***	***	ns	ns	ns
BE	ns	ns	ns	ns	*	*	PBME	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CE	*	ns	**	ns	**	**	PCME	*	ns	ns	ns	ns	ns
ME	***	***	***	***	***	***	BCME	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PBC	*	ns	ns	ns	ns	ns	PBCME	ns	ns	ns	ns	ns	ns

