

Dinâmica de nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) e fósforo (P) em coprólitos de minhocas (*Oligochaeta*)

DILMAR BARETTA⁽¹⁾, SARA RUIZ HIRATA⁽²⁾, ANDRÉ SHIGUEYOSHI NAKATANI⁽³⁾, GEORGE GARDNER BROWN⁽⁴⁾ & ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO⁽⁵⁾

RESUMO - O estudo da cinética de nutrientes nos coprólitos de minhocas pode ser importante para entender os processos edáficos que ocorrem nos solos brasileiros, já que as minhocas atuam na decomposição e mineralização da matéria orgânica e na manutenção da estrutura do solo. O presente estudo teve o objetivo de avaliar, em um Latossolo Vermelho-Amarelo, a dinâmica de NH_4^+ , NO_3^- e P, em coprólitos de minhocas e verificar o potencial destes nutrientes para separar os tratamentos. Para tanto, avaliou-se a cinética de nutrientes NH_4^+ , NO_3^- e P, em coprólitos produzidos em laboratório através de duas espécies de minhocas (*Amyntas corticis* e *Eisenia andrei*). Os quatro tratamentos testados foram: 1) Solo sem minhoca (SM); 2) Solo com *Amyntas corticis* (AM); 3) Solo com *Amyntas corticis* + *Eisenia andrei* (AE) e 4) Solo com *Eisenia andrei* (EI). Os tempos de incubação foram 0, 2, 4, 8, 16 e 32 dias. O tratamento SM, independente dos tempos de incubação, apresentou menores valores de P, NH_4^+ e NO_3^- , em comparação aos demais tratamentos, sendo este efeito mais pronunciado quando se inoculou a espécie *A. corticis*. Pretende-se, a partir dos valores de densidade de minhocas m^{-2} já obtidos, realizar simulações da quantidade de P, NH_4^+ e NO_3^- , fornecidos para áreas com *Araucaria angustifolia*, onde *A. corticis* domina a população de minhoca. Dentre os nutrientes estudados, sem considerar o efeito do tempo de incubação, o P contribuiu mais para separar os tratamentos, com um excelente potencial indicador.

Palavras-Chave: (Cinética; *Amyntas corticis*; *Eisenia andrei*)

Introdução

O conhecimento da cinética de nutrientes como fósforo (P), amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) nos coprólitos de minhocas pode ser importante para entender os processos edáficos que ocorrem nos solos brasileiros, já que as minhocas atuam na decomposição e mineralização da matéria orgânica e na manutenção da estrutura do solo.

O estudo das comunidades de minhocas em áreas com araucária (*Araucaria angustifolia*) pode ser um ponto de partida importante para entender os processos

nos solos deste habitat, já que estes organismos ocupam diversos níveis tróficos dentro da cadeia alimentar do solo. As minhocas desempenham uma variedade de funções nos ecossistemas, incluindo: decomposição da matéria orgânica, mineralização dos nutrientes, revolvimento, agregação do solo, recuperação de áreas degradadas e contaminadas [2, 5]. Além disso, algumas espécies de minhocas têm sido amplamente usadas como bioindicadores de distúrbios, bem como da qualidade do solo [3]. Entretanto, a dinâmica de nutrientes em coprólitos de minhocas ainda não é totalmente conhecida e, atualmente, estão sendo investigados por poucos pesquisadores brasileiros.

Contudo, é conhecida a importância dos coprólitos como fonte de nutrientes [3, 5]. Pensando nisso, a hipótese deste trabalho é que no intestino das minhocas existe uma grande diversidade de bactérias endossimbiontes que auxiliam na decomposição de matéria orgânica e promovem uma mineralização mais eficiente, liberando mais nutrientes para o solo ao longo do tempo. Assim sendo, o presente estudo teve o objetivo de avaliar, em um Latossolo Vermelho-Amarelo, a dinâmica de P, NH_4^+ e NO_3^- em coprólitos de minhocas e verificar o potencial destes nutrientes para separar os tratamentos.

Material e Métodos

A. O Local

O estudo foi conduzido no laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP. O solo utilizado no ensaio foi coletado de áreas com *Araucaria angustifolia* nativas, em clímax (22° 41' 29" latitude Sul e 45° 27' 52" longitude Oeste), localizadas dentro do Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ), município de Campos do Jordão, SP. O solo usado no experimento foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo. Informações adicionais sobre o local de coleta do solo, vegetação e características físico-químicas do solo podem ser obtidas em Baretta [3]. Inicialmente, o solo foi seco em estufa (55 °C) e homogeneizado em peneira (malha de 2 mm). A relação carbono:nitrogênio final do solo foi de 10:1. Posteriormente foi realizado um ensaio para determinar o melhor teor de umidade do solo para a produção de coprólitos. A melhor umidade para produção de coprólitos, independente da espécie de minhoca foi de 35%.

⁽¹⁾ Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Laboratório de Solos, Rua Benjamin Constant 84-E, Chapecó, SC, CEP 89806-070. E-mail: dilmarbaretta@gmail.com

⁽²⁾ Graduada em Gestão Ambiental, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP). Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 09, Piracicaba, SP, CEP 13418-900. E-mail: shirata@esalq.usp.br

⁽³⁾ Doutorando do PPG em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP. E-mail: andreanakatani@yahoo.com.br

⁽⁴⁾ Pesquisador da Embrapa Florestas. Estrada da Ribeira KM, 111, C.P. 319, Colombo, PR, CEP 83411-000.

⁽⁵⁾ Professora Titular do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP. E-mail: ejbncard@esalq.usp.br
Apóio financeiro: FAPESP.

Em cada mesocosmo foi colocado 200 gramas de solo seco e, sendo posteriormente o solo corrigido até a umidade de 35%. Durante a condução do experimento foi utilizado água destilada e autoclavada para manter o teor de umidade do solo em 35%.

O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados, com cinco repetições. Os quatro tratamentos testados foram: 1) Solo sem minhoca (SM); 2) Solo com *Amyntas corticis* (AM); 3) Solo com *Amyntas corticis* + *Eisenia andrei* (AE) e 4) Solo com *Eisenia andrei* (EI). Os tempos de incubação foram 0, 2, 4, 8, 16 e 32 dias.

Os indivíduos de *Amyntas corticis* utilizados no experimento foram coletados em solo sob Floresta de Araucária dentro do PECJ. Para a coleta foi utilizado o método recomendado pelo Programa “Tropical Soil Biology and Fertility” (TSBF) descrito por Anderson & Ingram [1] e relatado por Baretta et al. [2]. Os indivíduos de *Eisenia andrei* foram provenientes da criação do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ. Antes da introdução das minhocas nos mesocosmos (potes de vidro transparentes), com capacidade de 500 gramas cada um, elas permaneceram 48 horas em placas de Petri com papel absorvente úmido, para limpeza do trato intestinal. Em cada mesocosmo foi inoculado dois indivíduos adultos, com clitelo bem desenvolvido e com biomassa média de mais de 1,59 gramas.

Os coprólitos produzidos pelas minhocas foram separados manualmente de cada mesocosmo, com auxílio de lupa e luminária. Aproximadamente duas gramas de amostras de coprólitos e também de solo sem minhoca (testemunha) foram colocadas em pequenas placas de Petri plásticas e encubadas numa bandeja com solo original das áreas de araucária com 35% umidade. O experimento foi conduzido por 32 dias, no escuro e em sala climatizada, com temperatura de 28°C. Estabeleceu-se um cronograma de extração de acordo com os tempos de incubação.

Em cada tempo de incubação, o N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ das amostras foram extraídos com KCl (2 mol L⁻¹) na relação 1:10 (m:v) (1 g de coprólito + 10 mL de KCl). O N-NH₄⁺ foi determinado em um sistema de análise de injeção em fluxo contínuo (FIA) (Ismatec Asia) com alcalinização da amostra (NaOH 0,5 mol L⁻¹), microdifusão e leitura em espectrofotômetro a 605 nm na presença do indicador bromocresol púrpura (0,0074 mol L⁻¹). O N-NO₃⁻ foi determinado por espectrofotometria em ultravioleta (HP Agilent 8453 Spectrophotometer), com adição de HCl (1 mol L⁻¹) na relação 1:50 (v:v), para evitar interferências de hidróxidos e carbonatos. A leitura foi feita em 220 nm e 275 nm (APHA-AWWA, 2005). O P foi determinado por Mehlich 1. A extração do P foi realizada com solução de 0,0125 mol L⁻¹ de H₂SO₄ + 0,05 mol L⁻¹ de HCl, utilizando relação coprólito:extrator 1:10 (m:v) (1g de coprólito + 10 mL de solução extratora) [7] que foram agitadas por 5 minutos, deixadas por uma noite em repouso e depois coletado o sobrenadante. Para a determinação do teor de P foram adicionados 5 mL de solução ácida diluída de molibdato de amônio e ácido

ascórbico em alíquota de 2,5 mL do extrato, que foi homogeneizada e deixado desenvolver cor por 20 minutos. O teor de P foi determinado em 660 nm em espectrofotômetro (VARIAN Cary 50 MPR Microplate Reader).

Os resultados de P, NH₄⁺ e NO₃⁻ (mg kg⁻¹) foram submetidos à análise de variância (ANOVA two-way) e as médias comparadas por meio do teste de LSD ($P < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.2 [8]. Os atributos P, NH₄⁺ e NO₃⁻, independentes da época do tempo de incubação (considerando todas as épocas de incubação) também foram submetidos à análise canônica discriminante (ACD) para identificar quais deles foram mais relevantes na separação dos tratamentos estudados [4, 3], de acordo com seu valor indicador.

Resultados

A quantidade de nutrientes (NH₄⁺, NO₃⁻ e P), nos coprólitos das minhocas variou de acordo com o tempo de incubação (Figuras 1A, 1B e 1C). As maiores quantidades de NH₄⁺, NO₃⁻ e P foram observadas nos coprólitos de *Amyntas corticis*, em comparação aos demais tratamentos, independente do tempo de incubação (desde o tempo 0 até os 32 dias após a incubação), e também quando comparado com o solo sem minhoca.

Para o NH₄⁺ e P o efeito da presença de minhocas, especialmente de *Amyntas* foi mais intenso nos primeiros oito dias de incubação, com posterior decréscimo (Figuras 1A e 1C). Esse comportamento pode ser atribuído à mineralização inicial do carbono orgânico prontamente oxidável, cuja exaustão conduz à redução do fluxo de C-CO₂, como no trabalho de Martines et al. [8], em que os autores encontraram valores crescentes de coeficiente de correlação entre os compostos facilmente degradáveis do lodo de curtume, em decorrência do tempo de incubação. Entretanto, este efeito pode não ser apenas devido à incorporação de matéria orgânica e nutrientes via esterco de bovinos no solo utilizado neste experimento, mas também ao provável presença de microrganismos adaptados ao meio no intestino das minhocas que podem auxiliar nesta mineralização. Eram esperadas altas quantidades de NH₄⁺ primeiro como produto da mineralização, pois o NH₄⁺ é oxidado para nitrato através de bactérias nitrificantes, o que explica as elevadas quantidades de NH₄⁺ no início da incubação, decaindo com o tempo, e o contrário acontecendo com o NO₃⁻.

A quantidade de NO₃⁻ aumentou progressivamente com o tempo de incubação das amostras (Figura 1B), especialmente no solo que recebeu *Amyntas*, seguido pelos tratamentos de *Amyntas* + *Eisenia*, *Eisenia andrei* e solo sem minhocas, respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas com a matéria orgânica recalcitrante, decorrente do processo biológico e de estabilização da carga orgânica, e pela baixa relação C/N (neste trabalho 10:1) e composição da fração orgânica [8].

A. Análise Multivariada

O modelo utilizado na Análise Canônica Discriminante (ACD) para avaliar as modificações na cinética de NH₄⁺, NO₃⁻ e P explicou boa parte da variabilidade nos

tratamentos estudados, uma vez que a primeira e segunda função canônica discriminante (FCD₁ e FCD₂) apresentaram correlações canônicas de 78,0 e 18,0%, respectivamente, independente do efeito do tempo de incubação; sendo as duas funções ajustáveis para explicar as variações encontradas para os valores de NH₄⁺, NO₃⁻ e P.

O teste LSD a 5 % da média de todos os coeficientes canônicos padronizados (CCP) mostrou dentro da FCD₁ que o tratamento que recebeu *A. corticis* (AM) é diferente dos demais tratamentos, especialmente do solo sem minhocas (SM) (Tabela 1). Dentro da FCD₁, o tratamento AM obteve a maior média (1,745), seguido pelos tratamentos AE e EI, que, que não diferiram entre si, e pelo tratamento SM, respectivamente (Tabela 1). A FCD₂, como explicou pouco (somente 2,10%) da variação total dos dados, não será discutida.

A contribuição individual de cada atributo para a separação dos tratamentos estudados (Figura 2) é expressa pelos coeficientes da taxa de discriminação paralela (TDP), que resulta do produto entre os coeficientes canônicos padronizados (CCP) e de correlação (*r*). O TDP apresenta valores relativos à contribuição conjunta de *r* e CCP para a distinção das áreas (TDP = *r* x CCP). Dentro da FCD₁, o fósforo (P) apresentou o maior valor positivo de coeficientes TDP, correspondente a 0,660 (Tabela 2), demonstrando que o maior grau de dissimilaridade (separação) das áreas é explicado, principalmente, por este atributo. Os atributos NH₄⁺ e NO₃, apesar de apresentarem valores mais baixos (0,190 e 0,150, respectivamente), também foram importantes para separar os tratamentos estudados.

O teste multivariado de Wilk's Lambda indicou haver diferença altamente significativa (*p*<0,0001) entre os quatro tratamentos estudados (Figura 2). Da ACD resultaram valores do coeficiente canônico padronizado (CCP). Tal coeficiente mostrou simultaneamente o comportamento multivariado dos nutrientes estudados para promover a separação entre os tratamentos, em resposta ao estudo de variáveis independentes múltiplas, analisadas simultaneamente. No presente estudo, a FCD₁ explicou a maior parte da variação total (97,0 %), enquanto a FCD₂, apenas 2,10 % (Figura 2).

Pode-se observar que a FCD₁ separa o tratamento AM, com maiores valores de CCP, dos tratamentos AE e EI, enquanto o tratamento SM ficou afastado dos demais, com menores valores (negativos) de coeficiente CCP (Figura 2).

Discussão

As diferenças entre as quantidades de NH₄⁺, NO₃⁻ e P liberadas nos tratamentos com a presença de minhocas em relação ao que não recebeu minhocas (testemunha: solo sem minhoca) indicam a contribuição positiva das minhocas na liberação de nutrientes no solo (Figuras 1A, 1B e 1C). Tais variações nos atributos NH₄⁺, NO₃⁻ e P estão

relacionadas, dentre outros fatores, com a espécie de minhoca introduzida no solo e, possivelmente da diversidade de microrganismos, especialmente bactérias e talvez de endossimbiontes que vivem o intestino destas minhocas. Entretanto, são necessários maiores estudos nesta linha de pesquisa no Brasil.

Outro aspecto interessante é o possível comportamento inverso entre a quantidade de NH₄⁺ (Figura 1A) em relação ao NO₃⁻ (Figura 1B). Parece existir uma grande quantidade de nitrogênio orgânico (Norg) que pode ser transformado em NH₄⁺ e, esse por sua vez é transformado em NO₃⁻, que fica evidente, pelo comportamento inverso dos dois compostos. Com o tempo a quantidade de NH₄⁺ diminui enquanto o NO₃⁻, aumenta (Figuras 1A e 1B). Possivelmente, essas transformações são mediadas por microrganismos amonificadores (Norg → NH₄⁺) e nitrificadores (NH₄⁺ → NO₃⁻), que provavelmente vivem como endossimbiontes no trato digestivo das minhocas, intensificando o processo de mineralização do Norg em comparação ao solo sem minhocas (SM), que apresenta sua microbiota natural. Microrganismos, aparentemente simbióticos e específicos para cada espécie de minhoca foram encontrados nos nefrídios (estruturas de excreção) de 30 espécies de minhocas [7], mas sua relação, função, mecanismos e fontes que geram essa endossimbiose não foram elucidadas neste trabalho. Os nefrídios são órgãos excretórios, geralmente ocorrendo em pares em cada segmento, que processam o líquido celômico antes da excreção (amônia e uréia) e ajudam no balanço hídrico da minhoca [6].

A inexistência de artigos publicados sobre esse assunto dificultou a discussão dos dados ora apresentados neste estudo. Todavia, os resultados obtidos nesse trabalho auxiliaram na formulação de novas hipóteses, sendo a biodiversidade de minhocas, e seus endossimbiontes na Mata Atlântica, objeto de pesquisa de um convênio bilateral (CNPq/NSF, EUA) aprovado pelo CNPq (coordenador G.G. Brown), o qual será executado por nosso grupo de pesquisa.

Pretende-se, a partir dos valores de densidade de minhocas m⁻² já obtidos [3], realizar simulações da quantidade de P, NH₄⁺ e NO₃⁻, fornecidos para áreas com araucária, onde *A. corticis* domina a população de minhoca, especialmente quando se utilizou o método do formol [2].

Conclusões

O solo sem minhocas apresentou menores valores de P, NH₄⁺ e NO₃⁻, em comparação aos demais tratamentos (com minhocas), independente do tempo de incubação, sendo este efeito mais pronunciado quando se introduziu a espécie *A. corticis*.

Dentre os nutrientes estudados (NH₄⁺, NO₃⁻ e P), sem considerar o efeito do tempo de incubação, o P contribuiu mais para separar os tratamentos, com um excelente potencial indicador.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, pela bolsa concedida e ao programa BIOTA/FAPESP (www.biotasp.org.br), pelo

financiamento dos projetos temáticos (processo no. 01/05146-6, 01/05146-6). D. Baretta agradece à FAPESP pelo apoio financeiro e pela bolsa de Pós-doutorado.

Referências

- [1] ANDERSON, J.M. & INGRAM, J.S.I. 1993. Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods. 2nd ed. Wallingford: CAB International. 171p.
- [2] BARETTA, D.; BROWN, G.G.; JAMES, S.W. & CARDOSO, E.J.B.N. 2007. Earthworm populations sampled using collection methods in Atlantic Forests with *Araucaria angustifolia*. *Scientia Agricola*, 64:384-392.
- [3] BARETTA, D. Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores da qualidade ambiental em áreas com *Araucaria Angustifolia* no Estado de São Paulo. 2007. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP. 158p.
- [4] CRUZ-CASTILLO, J.G.; GANESHANANDAM, S.; MACKAY, B.R.; LAWES, G.S.; LAWOKO, C.R.O.O. & WOOLLEY, D.J. 1994. Applications of canonical discriminant analysis in horticultural research. *HortScience*, 29:1115-1119.
- [5] LAVELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P. & ROSSI, J.-P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Biology*, 42:S3-S15.
- [6] LAVERACK, M.S. The Physiology of earthworms. Pergamon Press, New York, 1963.
- [7] KNOP, J. Bakterien und bakteroiden bei Oligochäten. *Z. Morphol. Okol. Tiere*, v. 6, p. 588-624, 1926.
- [8] MARTINES, A.M.; ANDRADE, C.A.de. & CARDOSO, E.J.B.N. 2006. Mineralização do carbono orgânico em solos tratados com lodo de curture. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:1149-1155.
- [9] MEHLICH, A. Determination of P, Ca, Mg, K, Na and NH₄ by North Carolina Soil Testing Laboratoris. Raleigh, University of North Carolina, 1953. não publicado.
- [10] SAS INSTITUTE. 2002. SAS: User's guide: statistics. 6th ed. Cary: Institute Inc.

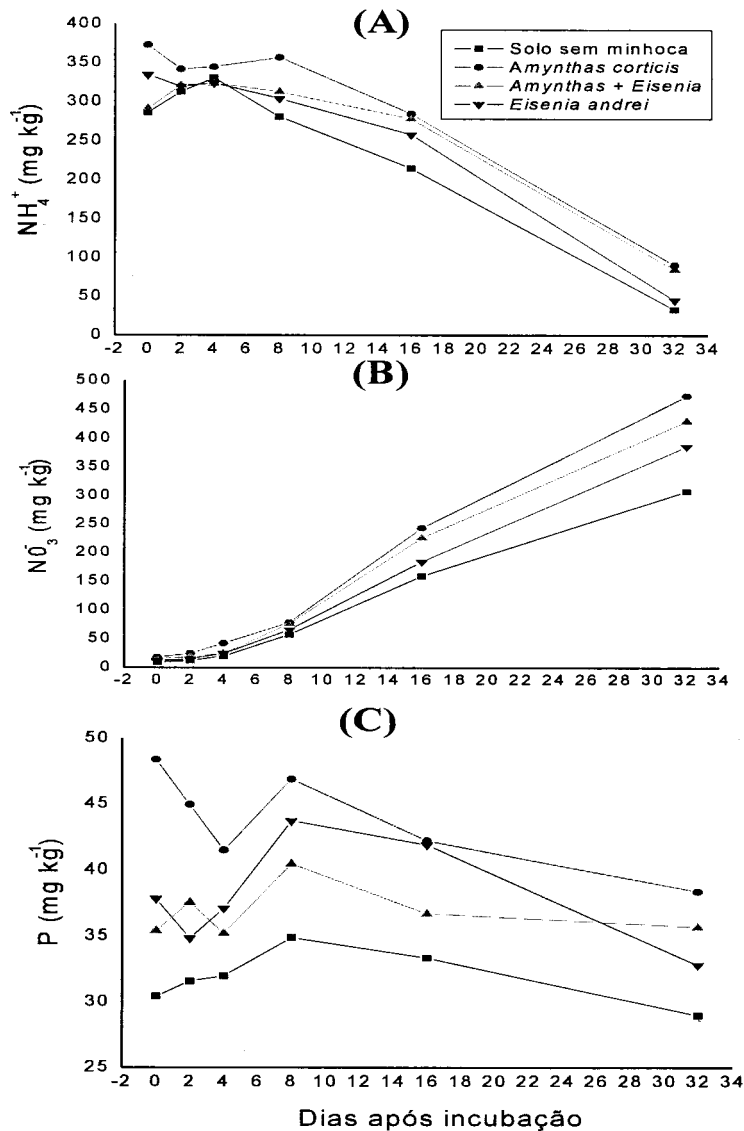


Figura 1. Quantidades de amônio (A), nitrato (B) e fósforo (C) (mg kg⁻¹) liberados no solo sem minhoca [Solo sem minhoca (■)] e nos coprólitos produzidos pelas espécies de *Amynthus corticis* (●), *Amynthus corticis* + *Eisenia andrei* (▲) e *Eisenia andrei* (▼), após 0, 2, 4, 6, 8, 16 e 32 dias de incubação. (n=3).

Tabela 1. Análise da variância média dos coeficientes padronizados (CCP) da primeira e segunda função canônica discriminante (FCD₁, FCD₂) referentes aos atributos amônio (NH₄⁺), nitrato (NO₃⁻) e fósforo (P) do solo sem minhocas (SM) e dos coprólitos produzidos por *Amyntas corticis* (AM), *Amyntas corticis* + *Eisenia andrei* (AE) e *Eisenia andrei* (EI), independente do tempo de incubação (seis tempos= 0, 2, 4, 6, 8, 16 e 32 dias). (n=3x6=18).

Tratamentos	FCD1 (97,0%)	FCD2 (2,1%)
SM	-1,654 c	0,001 a
AM	1,745 a	0,001 a
AE	-0,053 b	-0,254 a
EI	-0,043 b	-0,252 a
CV(%)	1,01	1,69

Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si a 5% pelo teste LSD. ⁽¹⁾CV: Coeficiente de variação.

Tabela 2. Valores de coeficiente de correlação canônica (r), coeficiente canônico padronizado (CCP) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) dentro da primeira e segunda funções canônicas discriminantes 1 e 2 (FCD₁ e 2 FCD₂), referentes aos atributos amônio (NH₄⁺), nitrato (NO₃⁻) e fósforo (P) do solo sem minhocas (SM) e dos coprólitos produzidos por *Amyntas corticis* (AM), *Amyntas corticis* + *Eisenia andrei* (AE) e *Eisenia andrei* (EI), independente do tempo de incubação (6 tempos= 0, 2, 4, 6, 8, 16 e 32 dias). (n=3x6=18).

	FCD ₁ (97,0%)			FCD ₂ (2,1%)		
	r	CCP	TDP	r	CCP	TDP
Atributos do solo						
Amônio (N-NH ₄ ⁺)	0,162	1,179	0,190	-0,087	-2,098	0,182
Nitrato (N-NO ₃ ⁻)	0,105	1,434	0,150	-0,235	-1,940	0,456
Fósforo (P)	0,800	0,824	0,660	0,533	0,679	0,362

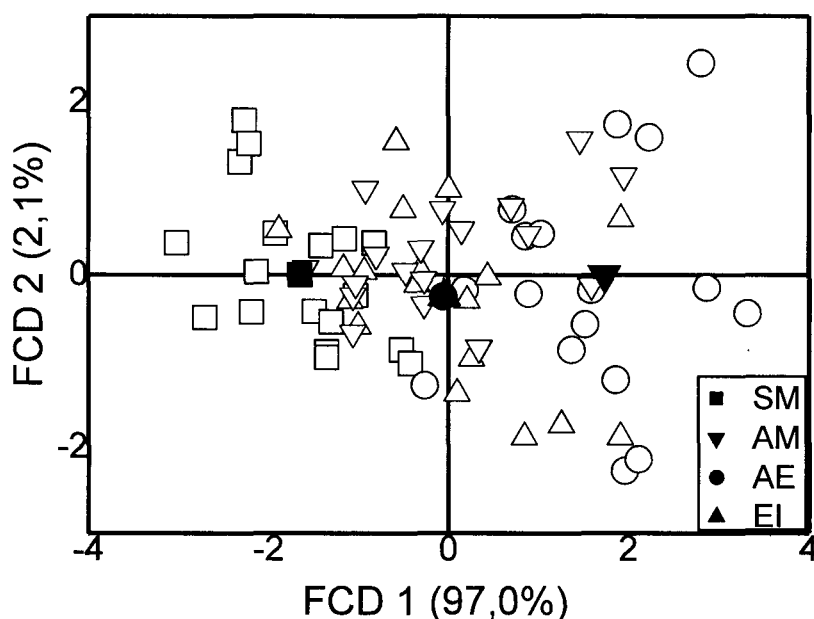


Figura 2. Relação entre a primeira e segunda função canônica discriminante (FCD₁ e FCD₂) sobre as médias (centróides) dos coeficientes canônicos padronizados (CCP), referentes aos atributos amônio (NH₄⁺), nitrato (NO₃⁻) e fósforo (P) do solo sem minhocas (SM) e dos coprólitos produzidos por *Amyntas corticis* (AM), *Amyntas corticis* + *Eisenia andrei* (AE) e *Eisenia andrei* (EI), independente do tempo de incubação (seis tempos= 0, 2, 4, 6, 8, 16 e 32 dias). (n=18).