

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO E BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR INOCULADOS COM BACTÉRIA FIXADORA DE N₂
(*Acetobacter diazotrophicus*)

ADRIANA MARIA DE AQUINO

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

HELVÉCIO DE-POLLI (orientador principal)

DEJAIR LOPES DE ALMEIDA

LUIZ RODRIGUES FREIRE

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister
Scientiae* em Agronomia, área de Concen-
tração em Ciência do Solo.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Setembro, 1991

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO E BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR INOCULADOS COM BACTÉRIA FIXADORA DE N₂
(*Acetobacter diazotrophicus*)

ADRIANA MARIA DE AQUINO

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

HELVÉCIO DE-POLLI (orientador principal)

DEJAIR LOPES DE ALMEIDA

LUIZ RODRIGUES FREIRE

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister
Scientiae* em Agronomia, área de Concen-
tração em Ciência do Solo.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Setembro, 1991

TÍTULO DA TESE

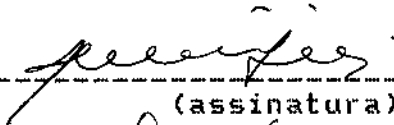
VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO E BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR INOCULADOS COM BACTÉRIA FIXADORA DE N₂
(*Acetobacter diazotrophicus*)

AUTORA

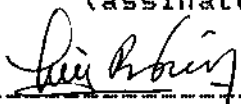
ADRIANA MARIA DE AQUINO

Aprovado em 26 de setembro de 1991

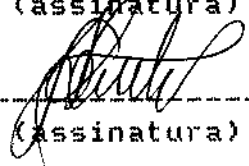
HELVÉCIO DE-POLLI


(assinatura)

LUIZ RODRIGUES FREIRE


(assinatura)

GABRIEL DE ARAÚJO SANTOS


(assinatura)

Dedico esta tese aos meus pais
e aos meus irmãos, por tudo
que aprendi com o nosso
convívio nesta existência.

"A energia dos átomos que compõem as páginas e a tinta deste livro, assim como a energia dos átomos que compõem cada célula do teu corpo têm exatamente a mesma idade: a idade do Universo".

Portalucce

BIOGRAFIA DA AUTORA

ADRIANA MARIA DE AQUINO, nascida a 12 de janeiro de 1963 em Juiz de Fora, MG. Licenciada pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES) em 1984 em Ciências-1º grau e em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em 1986. Especialista em Biologia: "Recursos Vegetais na Nutrição Humana" pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em 1985. Ingressou em 1987 no Curso de Mestrado em Agronomia (Área de Concentração em Ciência do Solo) na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), conduzindo o trabalho de tese na EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo (CNPBS), Itaguaí, RJ.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Helvécio De-Polli, pela sua total disponibilidade e apoio, pelo incentivo à livre iniciativa, pela sua amizade; e além disto pela oportunidade de me orientar neste trabalho, que embora não fosse de sua especialidade reconheceu a importância da contribuição deste tipo de estudo e que sem dúvida representará um ponto de partida importante para estudos futuros;
- Ao Pesquisador/CNPBS, Dejair Lopes de Almeida pelas sugestões recebidas, pelas revisões da tese que realizou, pelo seu apoio e por seu estímulo incontestável dado a estudo com *Oligochaeta*;
- Ao Pesquisador/CNPBS, José Guilherme M. Guerra pelas sugestões, apoio e estímulo recebido durante todo o trabalho;
- Ao Professor Luiz Rodrigues Freire, pela oportunidade da realização do trabalho com o *Oligochaeta* na disciplina de Fertilidade e Nutrição do Curso de pós-graduação que motivou este trabalho de tese; e pela incrível disponibilidade e apoio que dispensou na orientação da discussão dos resultados;
- Ao Professor/UFRRJ, Gabriel A. Santos, pela colaboração que prestou na discussão dos resultados relacionados ao Fracionamento da matéria orgânica;

- Aos Professores/UFRRJ: Ary Velloso e Jair R. Leal pela oportunidade da convivência que proporcionou grande crescimento interior;
- Ao Departamento de Solos da UFRRJ pela oportunidade realizar o Curso de mestrado;
- Aos Professores/UFJF: Sueli de Souza Lima, Marta D'Agosto e Ivanzir Vieira pelo incentivo recebido para o ingresso neste Curso e pela amizade;
- À Pesquisadora Mariângela Hungria pela oportunidade de realizar o mestrado e pela confiança que depositou em mim.
- Ao Professor/UFJF, Gilson A. de Castro, pelos ensinamentos relacionados a sistemática de Oligochaeta e pela revisão de Biologia desta tese;
- À EMBRAPA/CNPBS pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo o aprendizado adquirido com sua equipe;
- À EMBRAPA/ UAPNPSA (extinta) pela disponibilidade de seus aparelhos e funcionários de apoio do laboratório do meio de cultura;
- À Capes e à Faperj pelo auxílio financeiro;
- Ao Mazinho, Sérgio, Hélio, Moacir, Claudio, Naldo e Sr. Jorge pela ajuda prestada sempre que necessária na instalação e condução dos experimentos;
- Ao Biólogo, Adilson V. de Souza, pelo apoio recebido na realização das análises químicas e pelas horas extras dedicadas a este apoio;

- Ao responsável do Laboratório de Solos, Carlos Alberto G. Cavalcanti pela grande ajuda que prestou na determinação de C das frações húmicas e pela confecção dos "slides";
- Ao Selmo, Daniel, Altiberto, Luizinho pelos auxílios, muitas vezes, solicitados;
- Ao Sr. José Neves, pela colaboração prestada nas coletas dos experimentos, pelo seu constante apoio, carinho e sua grande amizade;
- Aos motoristas da EMBRAPA/CNPBS, por todo apoio recebido sempre quando necessário;
- Ao vigilante noturno da EMBRAPA/CNPBS, Jorge Cunha pela companhia e pela colaboração prestada durante as coletas dos experimentos que perduravam até a madrugada;
- Ao colega Renato Assis pela ajuda prestada na instalação do Experimento I e pela leitura de ARA deste, que ocorreu de madrugada;
- À Marlene Oliveira pela excelente ajuda que prestou na preparação do inóculo de *A. diazotrophicus*;
- À Verônica M. Reis e Marília P. Stephan pelas sugestões recebidas para o isolamento de *A. diazotrophicus*;
- Ao Pesquisador/CNPBS, Mauro A. de Paula, pela leitura de ARA e pelo seu carisma;
- Às bibliotecárias, Zilda M. Lourenço, Dorimar S. Félix e Margarida Ambrósio pela colaboração que prestaram na utilização da biblioteca da EMBRAPA/CNPBS e pelo carinho que realizaram este trabalho;

- À Dorimar S. Félix pela realização do eficiente trabalho de normalização das referências bibliográficas;
- Ao Pesquisador/CNPBS (consultor), Georg Cadish, pela colaboração na tradução dos textos em alemão;
- Ao Sr. Jair de J. Mello, pelo perfeito trabalho realizado na confecção das figuras e especialmente pela boa vontade que teve na realização das mesmas;
- Ao responsável pela seção de informática da EMBRAPA/CNPBS, Paulo Goi, pela disponibilidade, pelo carinho e amizade que sempre dispensou na solução das dificuldades surgidas na área;
- Ao José F. Costa, Marcos Antônio de A. Leal e Otávio C. Oliveira e ao colega Bruno pelas sugestões e colaborações que prestaram nas análises estatísticas;
- Ao Luciano Lourenço, por parte do eficiente trabalho de digitação que realizou, pelas sugestões recebidas, pelo carinho e amizade;
- Às amigas Arlene Maria Gomes de Oliveira, Virginia Siqueira, Lurdes Mendonça e Mariselve V. Vargas pelo apoio e estímulo recebidos, especialmente, no início do Curso;
- Aos meus amigos do Alojamento da EMBRAPA/CNPBS: Fábio, Aluísio, Malu, Ricardo, Marcos e Barradas pela enriquecedora convivência que tivemos que facilitou superar cada etapa e pela amizade recebida especialmente do Fábio;

- À amiga Emanuela, que proporcionou com seu carinho e sua amizade amenizar as dificuldades pessoais que ocorreram, coincidentemente, no transcorrer deste trabalho;
- Ao João, Rita e Eliane pela convivência amiga e pelo carisma recebido;
- Aos meus amigos do Processo Fisher-Hoffman, por tudo que vivenciamos juntos, pela amizade que criamos e pelo estímulo recebido,
- Ao Demar Gomes Bitencourt pela força que me deu para superar a fase crítica que antecedeu à defesa da tese e especialmente pelo amor recebido e pelas alegrias que me proporcionou,
- À minha mãe, pela incrível importância que deu à minha formação, pelo incentivo recebido, por ter acreditado em mim, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais críticos e por ter me ensinado que tudo é possível com amor.

2.5. Processo de Vermicompostagem	89
2.5.1. Comparação entre compostagem convencional e vermicompostagem, baseado na alteração da composição química de diversos resíduos.....	95
2.5.1.a. Lodo de esgoto	95
2.5.1.b. Estercos em Geral	101
3. CAPÍTULO I:	
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REPRODUTIVA DE OLIGOCHAETA EM ESTERCO BOVINO E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADOS COM BACTÉRIA FIXADORA DE N ₂ (<i>Acetobacter diazotrophicus</i>)	105
3.1. Resumo	106
3.2. Introdução	108
3.3. Material e Métodos	109
3.4. Resultados e Discussão	113
3.5. Conclusões	127
4. CAPÍTULO II:	
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO VERMICOMPOSTO DE ESTERCO BOVINO E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADOS COM BACTÉRIA FIXADORA DE N ₂ (<i>Acetobacter diazotrophicus</i>).....	129
4.1. Resumo	130
4.2. Introdução	132
4.3. Material e Métodos	134
4.4. Resultados e Discussão	136

4.4.1. Variação no teor de C	136
4.4.2. Variação no teor de N	142
4.4.3. Variação na relação C/N	148
4.4.4. Fracionamento de C	158
4.4.5. Atividade da nitrogenase	168
4.4.6. $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$	172
4.4.7. Respiração microbiana	178
4.4.8. Vermicompostagem quanto a parâmetros não medidos quimicamente	182
4.5. Conclusões	187
5. CONCLUSÕES GERAIS	190
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
7. ANEXOS	219

ÍNDICE DE QUADROS

Página

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

QUADRO 0.1. Análise de <i>Eisenia foetida</i>	92
---	----

CAPÍTULO I

QUADRO 1.1. Médias para os 5 substratos, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados e as 2 épocas de amostragens. Experimento I	113
---	-----

QUADRO 1.2. Número de minhocas adultas que se mantiveram vivas após serem introduzidas em substrato com diferentes proporções de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, picado e número de minhocas-jovens e de casulos produzidos a partir das 5 minhocas adultas, tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento I.....	125
--	-----

QUADRO 1.3. Número de minhocas-jovens e de casulos produzidos em diferentes proporções de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, moído, produzidos a partir das	
---	--

5 minhocas adultas introduzidas, tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento II.....	126
--	-----

CAPÍTULO II

QUADRO 2.1. Teor de C do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições). Experimento I.....	137
QUADRO 2.2. Teor de C do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições). Experimento II.....	138
QUADRO 2.3. Teor de C das 2 misturas de esterco e bagaço, moído (média dos tratamentos com e sem minhoca, inoculados e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>). Experimento II.....	138
QUADRO 2.4. Teor de C das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (médias dos tratamentos com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens). Experimento I.....	141
QUADRO 2.5. Teor de C das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, inoculadas e não inoculadas	

	com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> . (médias dos tratamentos com e sem minhoca). Experimento II.....	142
QUADRO 2.6.	Teor de N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 e 120 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca e inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>). Experimento I.....	143
QUADRO 2.7.	Teor de N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições). Experimento II.....	143
QUADRO 2.8.	Teor de N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média dos tratamentos com e sem minhoca e as 3 épocas de amostragens). Experimento II.....	144
QUADRO 2.9.	Teor de N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições). Experimento I.....	146
QUADRO 2.10.	Teor de N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado com e sem minhoca aos 60 e 120 dias (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , com e sem minhoca) Experimento I	147

QUADRO 2.11. Teor de N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , e as 3 épocas de amostragens). Experimento II.....	148
QUADRO 2.12. Relação C/N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 e 120 dias (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>). Experimento I.....	149
QUADRO 2.13. Relação C/N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído (média dos tratamentos com e sem minhoca e inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>). Experimento I.....	149
QUADRO 2.14. Médias para as 5 misturas de esterco e bagaço, picado, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens). Experimento I	150
QUADRO 2.15. Relação C/N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento I.....	151

QUADRO 2.16.	Médias para as 2 misturas de esterco e bagaço, moído, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetocater diazotrophicus</i> , com e sem minhoca e as 3 épocas de amostragens. Experimento II (%N, %C, relação C/N.....	152
QUADRO 2.17.	Relação C/N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, com e sem minhoca (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> e das 2 épocas de amostragens). Experimento I....	153
QUADRO 2.18.	Relação C/N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , aos 21, 46, 86 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca). Experimento II.....	155
QUADRO 2.19	Relação C/N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento II.....	157
QUADRO 2.20.	Massa seca do substrato por vaso com e inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento I (vide anexo)	
QUADRO 2.21.	Massa seca do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de	

3 repetições) Experimento II (vide anexo)	
QUADRO 2.22. Médias para as 5 misturas de esterco e bagaço, picado, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens). Experimento I (pH, massa seca, evolução de CO ₂).....	158
QUADRO 2.23. Médias para os ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) e AH + AF, para as 2 misturas de esterco e bagaço, moído, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens). Experimento II.....	160
QUADRO 2.24. Teor de C, extraído em NaOH 0,5 M, em relação ao C total do composto com e sem minhoca, e inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento II.....	166
QUADRO 2.25. Teor de C _{AH/AF} e taxa de extração do composto com e sem minhoca, inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento II.....	167
QUADRO 2.26. Atividade da nitrogenase do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de	

3 repetições). Experimento I.....	170
QUADRO 2.27. Atividade da nitrogenase do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento II.....	171
QUADRO 2.28. Médias das 5 misturas de esterco e bagaço picado, aos 60 e 120 dias (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , com e sem minhoca) Experimento I.....	173
QUADRO 2.29. pH _{H₂O} do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento I.....	174
QUADRO 2.30. pH _{H₂O} das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 e 120 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca e inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>). Experimento I.....	174
QUADRO 2.31. pH _{H₂O} das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> e as 2 épocas de amostragens. Experimento I.....	175

QUADRO 2.32. pH _{H₂O} do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições). Experimento II.....	177
QUADRO 2.33. pH _{H₂O} das 5 misturas de esterco e bagaço picado, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (médias dos tratamentos com e sem minhoca e as épocas de amostragens) Experimento I.....	177
QUADRO 2.34. Evolução de CO ₂ -mg C . (g . mistura seca. 10 dias) ⁻¹ do substrato com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento I.....	178
QUADRO 2.35. Evolução de CO ₂ -mg C . (g . mistura seca. 10 dias) ⁻¹ do substrato com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 repetições) Experimento II.....	179
QUADRO 2.36. Evolução de CO ₂ -mg C . (g . mistura seca. 10 dias) ⁻¹ das misturas de esterco e bagaço picado, aos 60 e 120 dias (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , com e sem minhoca). Experimento I.....	181

QUADRO 2.37. Evolução de CO_2 -mg C . (g . mistura seca . 10 dias) ⁻¹ das misturas de esterco e bagaço picado, com e sem minhoca ao 60 e 120 dias (médias dos 5 substratos e tratamentos ino- culados e não inoculados com <i>Acetobacter</i> <i>diazotrophicus</i>). Experimento I	182
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
REVISÃO GERAL DE LITERATURA:	
Figura 01. Arranjo das cerdas do <i>Oligochaeta</i> : 1, 2, 3, arranjo lumbricino (1. par-fechado; par-aberto; 3. par-distante), 4 arranjo perichaetine	43
Figura 02. Sistema digestivo de um lumbricídeo	44
Figura 03. Formas de prostômio: (a) Zigolóbico, (b) prolóbico, (c) epilóbico aberto, (d) epilóbico fechado, (e) tanilóbico	45
Figura 04. Sistemas circulatório, digestivo e reprodutor (a) lumbricídeo (b) megascolecídeo, estruturas não completas bilateralmente	50
Figura 05. Diagrama do ciclo de vida de <i>Eisenia foetida</i> em esterco de vaca a 25 °C e 75 % umidade	54
Figura 06. Interação entre minhoca e microorganismos	77
Figura 07. Variações de temperatura e pH na pilha de composto	82
Figura 08. Processo de síntese e decomposição do húmus	86
CAPÍTULO I:	
Figura 1.1. Número de minhocas adultas e vivas das misturas de esterco/bagaço: 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0	

(médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>)	
Letras iguais indicam que os valores não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan. Experimento I.	115
Figura 1.2. Número de minhocas-jovens produzidas nas misturas de esterco/bagaço: 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>)	
Letras iguais indicam que os valores não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan. Experimento I.	116
Figura 1.3. Número de minhocas-jovens e de casulos produzidos nas misturas de esterco/bagaço: 1:3 e 1:1 (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>)	
Experimento II	120
Figura 1.4. Número de casulos produzidos nas misturas de esterco/bagaço: 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>)	
Experimento II.	121
 CAPÍTULO II	
Figura 2.1. Relação C/N das misturas de esterco/bagaço:1:3 e 1:1 com e sem minhocas (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> e as diferentes épocas de amostragens). Letras iguais indicam que os valores	

não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan. Experimento II.....	154
Figura 2.2 Relação C/N do substrato 1:3 na interação da minhoca e da bactéria inoculada, <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (médias dos tratamentos e épocas de amostragens) Letras iguais indicam que os valores não diferem ao nível de 5% pelo teste de Duncan. Experimento II.....	156
Figura 2.3. Teor de C dos ácidos húmicos, em relação ao C total, das misturas de esterco/bagaço: 1:3 e 1:1 com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>) Experimento II	162
Figura 2.4. Teor de C dos ácidos fúlvicos, em relação ao C total, das misturas de esterco/bagaço: 1:3 e 1:1 com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> Experimento II	163
Figura 2.5. Graus de compostagem das misturas de esterco/bagaço: 1:3, 1:1 e 1:0 com minhoca e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i>) Experimento I	185
Figura 2.6. Volume total das misturas de esterco/bagaço 1:3 e 1:1, com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> . Experimento II.....	186

LISTA DE ANEXOS

Página

ANEXO 1: MÉTODOS UTILIZADOS	219
1.1. $\text{PH}_{\text{H}_2\text{O}}$	220
1.2. C total	220
1.2.a. Cálculo de C nas amostras	220
1.3. N total	221
1.3.a Cálculo de N nas amostras	221
1.4. Respiração microbiana	221
1.4.a. Cálculo da quantidade de C evoluído..	222
1.5. Atividade da nitrogenase	222
1.5.a. Cálculo do ARA	223
1.6. Etileno endógeno	223
1.7. Fracionamento de C	224
1.7.a. Número de extrações	225
1.7.b. Separação dos ácidos húmicos e áci-	
dos húmicos e ácidos fúlvicos	226
1.7.c. Determinação de C das frações	
extraídas	226
1.7.d. Cálculo de C das amostras extraídas...	227
ANEXO 2: MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	228
2.1. Meio batata	229
2.2. Meio LGI - P	230

ANEXO 3:	231
QUADROS DE MASSA SECA NÃO APRESENTADOS	
NO CAPÍTULO II	232
QUADRO 2.20. Massa seca do substrato por vaso com e inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 re- petições) Experimento I.....	233
QUADRO 2.21. Massa seca do substrato por vaso com e inoculado e não inoculado com <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (média de 3 re- petições) Experimento II.....	234
ANEXO 4: ANÁLISES DE VARIÂNCIA	235
QUADRO 3.1. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 1.1 - Experimento I QUADRO 1.2 - Experimento II.....	236
QUADRO 3.2. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.1 (% C), QUADRO 2.9 (% N), QUADRO 2.15 (Relação C/N), QUADRO 2.33 (pH) e QUADRO 2.20 (Massa seca) - Experimento I	237
QUADRO 3.3. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.7 (% N), QUADRO 2.2 (% N), QUADRO 2.19 (Relação C/N), QUADRO 2.33 (pH) e QUADRO 2.21 (Massa seca) - Experimento II.....	238

QUADRO 3.4. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.34 - Experimento I ...	239
QUADRO 3.5. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.35 - Experimento II ..	240
QUADRO 3.6. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.26. - Experimento I ..	241
QUADRO 3.7. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.27 - Experimento II ..	242
QUADRO 3.8. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.24 - Experimento II ..	243
QUADRO 3.9. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.25 - Experimento II ..	244
QUADRO 3.10. Análise de variância relativa ao item 5 - Experimento I	245
QUADRO 3.11. Análise de variância relativa ao item 5 - Experimento II	246

RESUMO GERAL

no período de fevereiro a maio de 1989. O experimento II foi desenvolvido em vasos de 1 litro contendo esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, moído, nas seguintes proporções, v/v: 1:3 e 1:1; as misturas foram feitas com base em volume num total de 800 ml. Este experimento foi realizado de fevereiro a abril de 1990. Em ambos os experimentos todos os tratamentos foram realizados com e sem inoculação de *Acetobacter diazotrophicus*. A experimentação foi conduzida em galpão coberto da EMBRAPA - CNPqS - Seropédica, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

Com exceção da proporção de esterco/bagaço 0:1 todas as misturas proporcionaram condições à reprodução das minhocas e o maior número destas, cerca de 150, foi encontrado em 1:1 e 3:1, onde o bagaço foi picado. Nos vasos onde o bagaço foi moído não se constatou nenhuma mortalidade dentro do período investigado. Não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos com e sem inoculação de *A. diazotrophicus* sobre a atividade reprodutiva das minhocas. Verificou-se que, independentemente dos tratamentos ocorreu consumo de C e que o esterco bovino favoreceu as transformações do bagaço de cana-de-açúcar. A minhoca e a inoculação com *A. diazotrophicus* não favoreceram significativamente o consumo de C. A minhoca pode ter assimilado o N do composto provocando uma subestimação deste nutriente. Nas misturas constituídas por bagaço moído a minhoca contribuiu significativamente para o decréscimo da relação C/N, especialmente na proporção de esterco/bagaço de 1:3. Nessa proporção a interação da bactéria inoculada e a minhoca contribuiu para o decréscimo da relação C/N. Ocorreu tendência da

maior perda de C dos ácidos fúlvicos e menor perda de C dos ácidos húmicos nos tratamentos com minhoca. De acordo com a relação C_{AH}/AF ocorreu intensa atividade microbiana em 1:3. Ocorreu expressiva atividade da nitrogenase em 1:1 aos 60 dias do experimento I e aos 21 dias do experimento II, média de 200 nmoles C_2H_4 (h . 50 g substrato) $^{-1}$. O $pH_{(H_2O)}$ e a atividade microbiana, medida pela evolução de CO_2 , tenderam a decrescer ao longo do processo, independente dos tratamentos.

GENERAL ABSTRACT

GENERAL ABSTRACT

Two experiments were conducted to evaluate the reproductibility of five adults earthworms used per pot as start population. The organic substrates used were cow manure and sugarcane bagasse in different mixing proportions (Chapter I). In both experiments chemical analyses of the substrates were also performed to follow the transformations (Chapter II). The first experiment (February to May, 1989) was conducted in 4,5 l pots using the following ratio (w/w) of manure:choppered bagasse, 0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0. Mixing was done with dry material in a total of 0,5 kg/pot. The second experiment (February to April, 1990) was conducted in one litter pot using the following ratio (v/v) of manure: ground bagasse, 1:3 and 1:1, made up to a total volume of

800 ml. In both experiments half of the pots were inoculated with *Acetobacter diazotrophicus*. The experiments were conducted in room conditions at EMBRAPA-CNPBS, Seropédica, Itaguaí, Rio de Janeiro.

Except for the 0:1 manure:bagasse ratio, all other ratios were favorable for the earthworm reproduction. The highest number (about 150) was found at 1:1 and 3:1 ratios, for chopped bagasse. For the ground bagasse treatment no death was found. No difference was observed for *A. diazotrophicus* inoculation over the worms reproductivity. At all treatments C consume occurred. Manure favored bagasse transformations. *A. diazotrophicus* have not favored C consume. Uptake of N by worms probably underestimated the N content in the substrates. In the treatment with ground bagasse, worms decreased C/N ratio, specially at 1:3 ratio. In this ratio the interaction inoculation of bacteria x worms also decreased the C/N ratio. It was observed some tendency of greater loss of C from fulvic acid with the presence of worms. By means of C_{HA}/C_{FA} interpretation high microbial activity at 1:3 ratio occurred. High nitrogenase activity at 1:1 ratio (60 days at experiment I and 21 days at experiment II) occurred averaging 200 nmoles C_2H_4 (h . 50 g substratum)⁻¹. Microbial activity (CO_2 evolution) and $PH_{(H_2O)}$ decreased along the experimental course for all treatment.

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

A compostagem, transformação biológica da matéria orgânica, é prática conhecida desde milênios. Mas, de modo geral é pouco empregada em nosso meio.

Muitos fatores poderiam ser levantados para justificar a pouca utilização do adubo orgânico. No entanto, a despeito de quaisquer razões seu uso se faz cada vez mais necessário, seja para amenizar os elevados gastos causados com o fertilizante mineral, seja pela conscientização das vantagens e necessidade do "turnover" de uma fazenda, seja pela possível escassez a longo prazo da matéria-prima geradora dos fertilizantes minerais, em função da baixa produção nacional destes quando comparada à demanda ou ainda

por favorecer o solo biologicamente do ponto de vista conservacionista.

Portanto, torna-se interessante o estudo de práticas que favoreçam o manejo dos adubos orgânicos e que justifiquem cada vez mais o seu uso.

A vermicompostagem, transformação biológica que resulta da ação combinada dos Oligochaeta, microflora e microfauna que vivem em seu trato digestivo, ao contrário da compostagem foi desenvolvida mais recentemente por pesquisas iniciadas em Rothamstead depois de 1940.

O vermicomposto difere do composto convencional, dentre outros, pela maior estabilização adquirida ao sofrer os processos enzimáticos quando da passagem do resíduo orgânico no trato digestivo da minhoca (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981; ALBANELL *et al.*, 1988).

Eisenia foetida, conhecida vulgarmente como minhoca vermelha da Califórnia, é preferencialmente utilizada pela sua habilidade não só de conversão de resíduos orgânicos, mas pelo seu rápido crescimento (NEUHAUSER *et al.* 1980a) e grande capacidade de multiplicação (HARTENSTEIN *et al.* 1979).

A capacidade reprodutiva do Oligochaeta pode variar com as condições ambientais e com a disponibilidade do substrato orgânico (NEUHAUSER *et al.* 1979; KALE *et al.*, 1982; HAND *et al.*, 1988; GRAFF, 1974; REINECKE & VILJOEN, 1990). Sendo importante conhecer a capacidade reprodutiva da espécie a ser utilizada na estabilização da matéria orgânica.

Segundo EDWARDS & LOFTY (1977) pouco se conhece sobre a vermicompostagem de resíduos orgânicos mais resistentes.

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo resistente à transformação dos macro-microorganismos, em função da sua elevada relação C/N, que pode variar de 100-200 (ORLANDO FILHO *et al.* 1983).

O incremento de N, proveniente da inoculação de microorganismos fixadores de N_2 , pode aumentar a taxa de transformação do material orgânico, como demonstraram HILL & PATRIQUIN (1990).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a influência das minhocas e da inoculação da bactéria fixadora de N_2 , *Acetobacter diazotrophicus* sobre o processo de transformação das misturas de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar. Verificando, ainda, as possíveis consequências desta inoculação sobre a reprodução das minhocas.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

2. REVISÃO GERAL DE LITERATURA

O aprimoramento do uso do Oligochaeta na agricultura, visando estabilizar resíduos orgânicos, requer uma série de conhecimentos sobre aspectos ligados ao ciclo de vida, capacidade digestiva e o papel das diferentes espécies nos diversos ecossistemas. Somente assim pode-se adquirir embasamento suficiente ao manejo adequado da vermicultura.

2.1. BIOLOGIA DO OLIGOCHAETA

2.1.1. Aspectos gerais

O corpo da minhoca é totalmente dividido por vários sulcos transversais, formando os anéis, denominados de segmentos ou metâmeros, que igualmente correspondem à segmentação interna (RIGHI, 1966). Devido a esta anelação do corpo foi dado o nome de ANNELIDA ao filo a que pertence a minhoca.

Vários estudiosos dividiram estes invertebrados em diferentes grupos sistemáticos e em concordância com EDWARDS & LOFTY (1977) foi adotado o de GATES (1954), devido sua simplicidade, inclusive, atualmente é o mais aceito:

Phylum: ANNELIDA

Classe: CLITELLATA

Classe: OLIGOCHAETA

Famílias: MEGASCOLECIDAE, ACANTHODRILIDADE, OCNERO-
DRILIDAE, OCTOCHAETIDAE, EUDRILIDAE,
GLOSSOSCOLECIDAE, SPAEGANOPHIDAE, MICRO-
CHAETIDAE, HORMOGASTRIDAE, CRIODRILIDAE
e LUMBRICIDAE.

Dentre as famílias citadas MEGASCOLECIDAE e LUMBRICIDAE são atualmente as mais investigadas. Em Megascolecidae o clitelo, região glandular da epiderme associada a produção de casulos, começa antes do 15º segmento e o arranjo das cerdas normalmente é perichaetine, se distinguindo de

Lumbricidae em que o clitelo começa após o 15º segmento e o arranjo das cerdas é lumbricine (Figura 01).

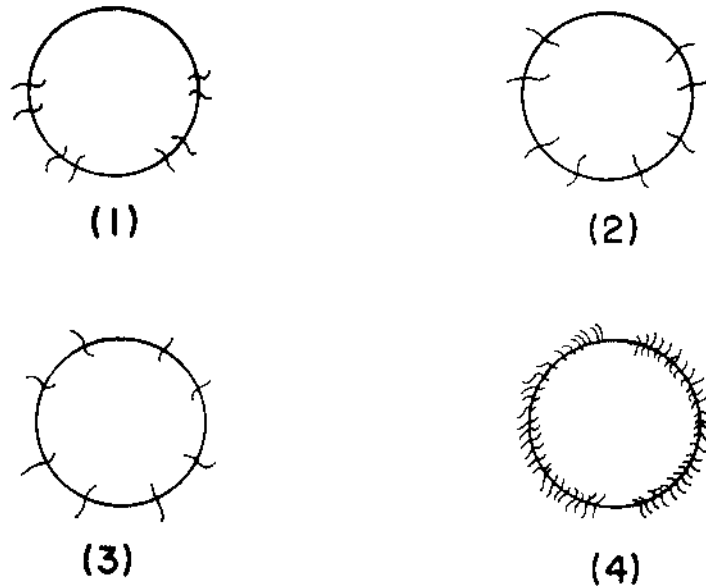


Fig.01 - Arranjo das cerdas do Oligochaeta: 1,2,3 arranjo lumbricine (1. par-fechado; 2. par-aberto; 3. par-distante), 4 arranjo perichaetate (Edwards e Lofty, 1977).

Os megascolecidos representam mais da metade das espécies conhecidas, cujos gêneros incluem: *Pheretima* e *Dichogaster* que compreendem mais espécies que qualquer outro gênero. Entretanto, de interesse para o homem, é sem dúvida LUMBRICIDAE que é capaz de ocupar amplas áreas, pela sua habilidade de colonizar novo solos e ser, normalmente, encontrada em regiões agrícolas (EDWARDS & LOFTY, 1977).

2.1.2. Aparelho digestivo

Embora, o sistema digestivo varie em detalhes para diferentes espécies, gêneros e famílias de Oligochaeta, basicamente consiste de faringe, esôfago, papo, moela, intestino anterior, que secreta enzimas e intestino posterior que absorve os nutrientes (Figura 02).

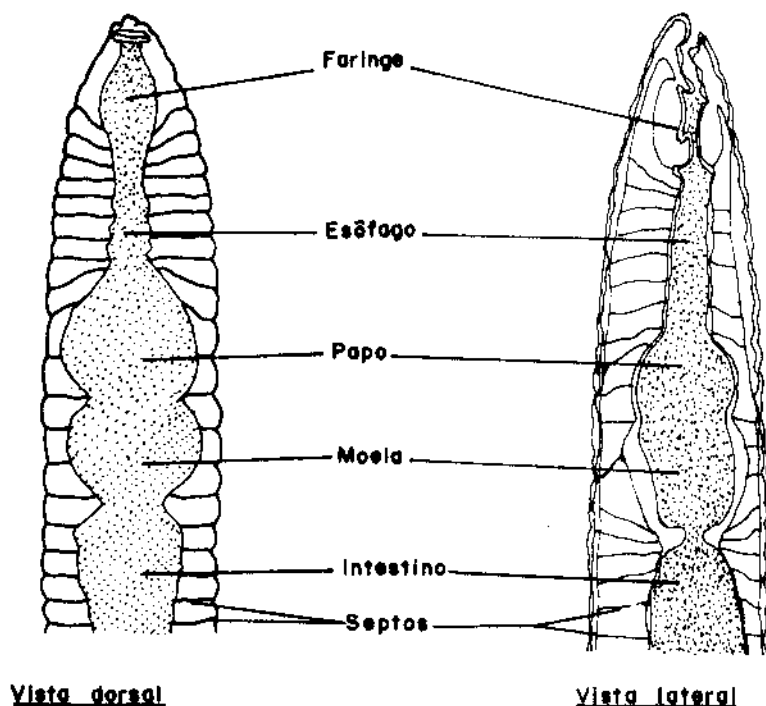


Fig.02 - Sistema digestivo de um lumbricídeo (Edwards e Fletcher, 1988).

A boca, situada no primeiro segmento, por isto denominado segmento bucal, se encontra em posição ventral, onde se distingue o peristômio. Na superfície dorsal se distingue uma protuberância tátil, que é o prostômio (LO BIANCO *et al.* 1966). A demarcação entre o prostômio e o peristômio difere entre espécies, sendo um carácter útil na

sistemática. Se distinguem em ZIGOLÓBICO, EPILÓBICO (aberto e fechado) e TANILÓBICO (LAINEZ & JORDANA, 1987) (Figura 03).

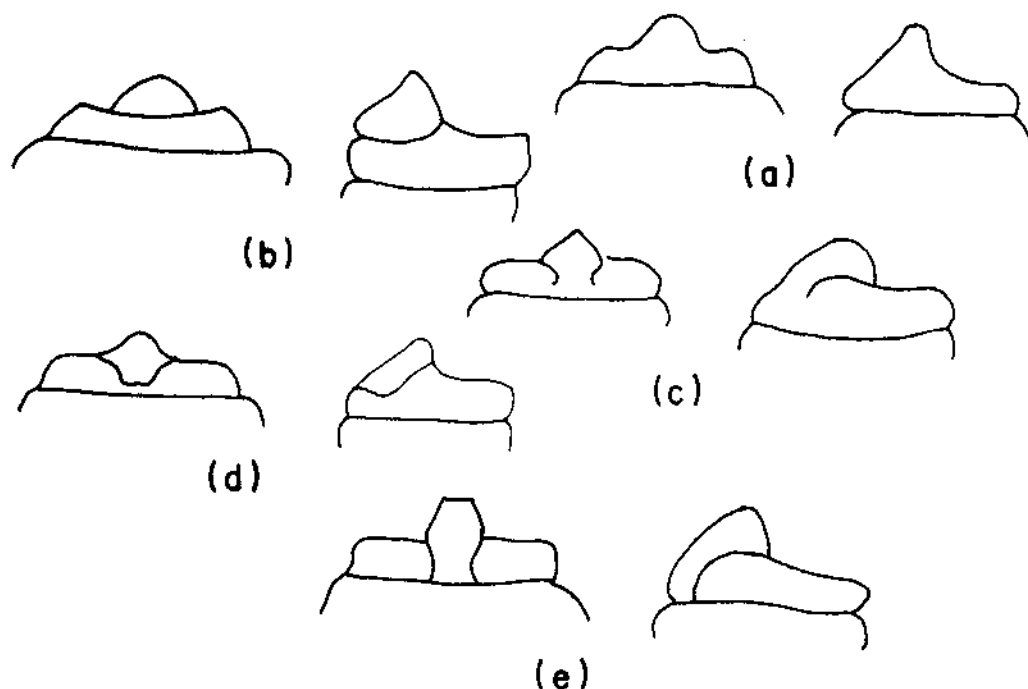


Fig.03 - Formas de prostômio: (a) zigolóbico, (b) prolóbico, (c) epilóbico aberto, (d) epilóbico fechado, (e) tanilóbico (Lainez e Jordana, 1987).

Desta forma, *Eisenia foetida* com prostômio tipo epilóbico aberto se distingue de *Lumbricus terrestris*, entre outros, pelo prostômio tipo tanilóbico.

Ao se alimentar, o alimento se adere ao muco secretado pelo epitélio bucal, ocorre uma diminuição da pressão da parede bucal, estabelecendo um vácuo parcial. Assim, o alimento atinge a faringe, que normalmente se estende até o 6º segmento (EDWARDS & LOFTY, 1977). Na faringe existem duas pregas laterais unidas posteriormente e que a dividem em duas câmaras, uma dorsal ou salivar e outra ventral ou

condutora. Na câmara salivar desaguam as glândulas da massa faríngea, atuando com verdadeira glândula salivar. A "saliva" contém um muco que facilita o deslocamento das partículas de alimento e contém enzimas que atacam, principalmente, as proteínas (RIGH, 1966). A faringe funciona como uma bomba de sucção e leva as partículas de alimento até o esôfago e através do peristaltismo esofagiano alcançam a moela e o papo, uma modificação do esôfago. As contrações da forte musculatura da moela, possibilitam triturar as partículas de alimento, com o auxílio das partículas minerais, quando presentes. Em Megascolecidae as moelas situam-se imediatamente após a faringe, podendo existir de duas a dez moelas, cada uma ocupando um segmento. As pregas do papo regulam o movimento dentro da moela prevenindo a regurgitação e garantindo a mistura do alimento. Grande parte da digestão e absorção do alimento se dá no intestino, que tem muitas pregas, a maior conhecida como tiflosole (EDWARDS & LOFTY, 1977 e EDWARDS & FLETCHER, 1988).

A duração para que o alimento percorra o sistema digestivo varia de 3 a 4 horas em *Eisenia foetida* e 12 a 20 horas em *Lumbricus terrestris* (EDWARDS & FLETCHER, 1988).

Após digestão do alimento os "coprólitos", denominação dada às fezes das minhocas, são eliminados pelo ânus, que situa-se no último segmento, o segmento anal. A excreção é feita pelas nefrídias, principal órgão de excreção dos oligoquetas. As células cloragógenas retiram os resíduos que

circulam livremente no sangue, concentra-os e transforma-os em uréia e amônia e os libera novamente no sangue e daí são eliminados para o exterior através das nefrídeas (RICH, 1966).

TILLINGHAST (1967 e 1968), estudando as vias de excreção da amônia e uréia em *Lumbricus terrestris*, concluiu que a glutamato dehidrogenase (GDH) é a principal via de excreção da amônia.

PRENTO (1989), observou que GDH é ativa em praticamente todo o epitélio do tubo digestivo, e sua distribuição independe do estado fisiológico da minhoca.

2.1.2.a. Glândulas calcíferas

As glândulas calcíferas ou glândulas de "Morren", invaginações ou pregas da parede do esôfago, são bem desenvolvidas na família Lumbricidae (ROBERTSON, 1936) e podem estar presentes ou ausentes em algumas espécies (EDWARDS & LOFTY, 1977).

Há considerável diferença entre as espécies, quanto ao grau de desenvolvimento destas glândulas e na secreção do carbonato de cálcio (PIEARCE, 1972).

Muitas teorias sobre a função das glândulas calcíferas foram estabelecidas desde a sua descrição, por Julius Leo em 1928. Mas, ainda hoje nenhuma foi capaz de esclarecer plenamente o seu papel.

LEE (1985) em sua revisão enfoca diferentes pontos de vista de diferentes pesquisadores. De acordo com estes estudiosos as glândulas calcíferas podem servir para neutralizar o material húmico ingerido pelas minhocas; auxiliar na absorção dos nutrientes no aparelho digestivo, e absorção de oxigênio; excreção do excesso de cálcio do sistema digestivo; fixação e excreção do CO_2 respirado; regulação da acidez na excreção nitrogenada; regulação do pH do sangue; regulação osmótica e iônica do fluido do corpo; excreção e regulação do excesso de água do corpo.

Segundo PIEARCE (1972) minhocas consumidoras-de-"litter" (*Lumbricus* spp., *Dendrodrillus rubidus subrubicundus*, *Allolobophora eiseni*) têm glândulas calcíferas ativas e as consumidoras-de-húmus ou consumidoras-de-solo (*Allolobophora* spp., *Aporrectodea* spp., *Octolasion* spp., *Dendrobates veneta*) glândulas inativas. Conclui este autor que estas glândulas, provavelmente, fixavam o CO_2 metabólico e observa que tal fato não ocorre com todas as espécies. Além disto, verificou que algumas espécies poderiam excretar o excesso de cálcio, como *Lumbricus rubellus*, espécie consumidoras-de-"litter", que absorvia mais cálcio que aquela consumidora-de-solo *Aporrectodea caliginosa*, porque o solo tinha menos cálcio e neste caso as glândulas poderiam ter outra função, talvez auxiliasse no balanço de ácido-base.

JAMIESON (1981) citado por LEE (1985) acredita, mediante as evidências, que as glândulas calcíferas podem

ter como principal papel a eliminação de cálcio, quando este encontra-se em altas concentrações e secundário quando em baixa concentração.

2.1.3. Aparelho reprodutor

Os oligoquetas são hermafroditas, mas necessitam de dois indivíduos para realização da fecundação cruzada. No momento da cópula os dois indivíduos se envolvem pela extremidade anterior, em sentido oposto. Algumas espécies podem produzir casulos partenogeneticamente (EDWARDS & LOFTY, 1977).

Os órgãos sexuais femininos são representados pelos ovários e os masculinos pelos testículos que se situam em segmentos diferentes.

As células reprodutoras dos testículos, que diferenciam-se nos 10º e 11º segmentos nos Lumbricidae (MARCEL, 1986), formam as espermatogônias. As espermatogônias passam para dentro da vesícula seminal, que contém células masculinas em vários estádios de desenvolvimento. Na vesícula seminal diferenciam-se os espermatozóides, que passam rapidamente para os canais testiculares e depois para a superfície do funil espermático onde permanecem até que ocorra a cópula. Durante o acasalamento os cílios do funil auxiliam o movimento dos espermatozóides, levando-os para o vaso deferente e atingindo o poro masculino (Figura 04).

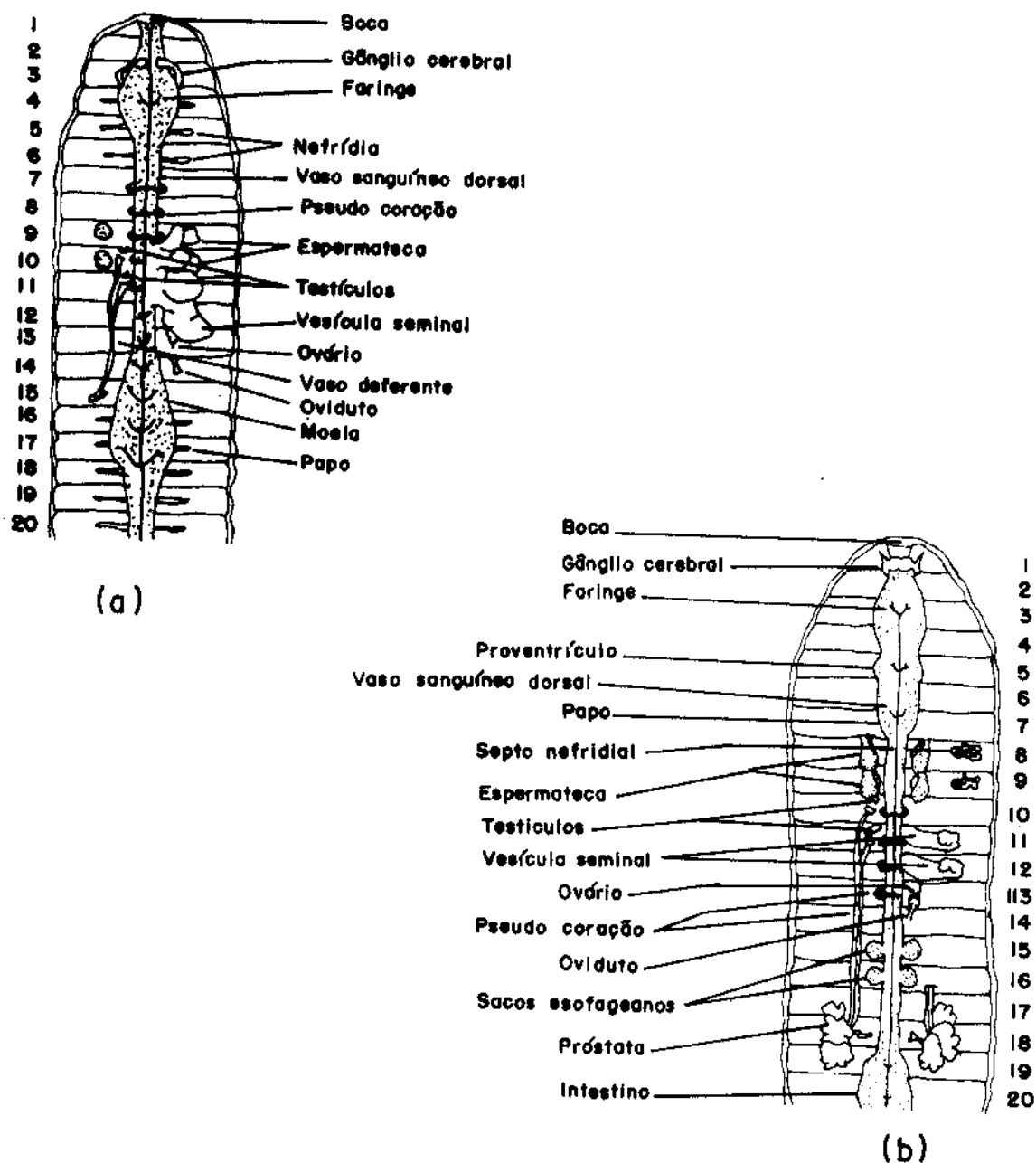


Fig.04 - Sistemas circulatório, digestivo e reprodutor. (a) lumbricídeo
 (b) megascolecideo, estruturas não completas bilateralmente
 (Edwards e Lofly, 1977).

Os ovários se diferenciam no 13º segmento nos Lumbricidae (MARCEL, 1986), formam as oogônias que se dividem e formam os oócitos. Quando amadurecidos, são levados ao poro feminino pelo oviduto e passam para o casulo, após a cópula, que é secretado pelo clitelo (Figura 04).

A localização do poro masculino e feminino diferem entre espécies.

O clitelo, formação glandular da epiderme e associado a produção de casulos, quando dilatado as minhocas, normalmente, estão adultas. O clitelo secreta um muco que favorece a cópula (LO BIANCO *et al.* 1966), que pode levar cerca de 1 hora (EDWARDS & LOFTY, 1977).

O método de cópula varia entre espécies, *Lumbricus terrestris*, por exemplo, copula na superfície, e outra espécie pode não copular na superfície.

Os espermatozóides de um indivíduo durante a cópula passam, geralmente, para o receptáculo seminal do outro, onde permanecem até a maturação dos oócitos. (LO BIANCO *et al.* 1966).

Segundo, LO BIANCO *et al.* (1966) após os indivíduos se separarem as células do clitelo, secretam uma faixa anular gelatinosa que é expulsa pelo movimento do animal. Entre esta faixa e a parede do corpo são descartados os óvulos e os espermatozóides, os quais se unem durante a fecundação externa e dão origem a vários ovos. As porções terminais da faixa se fecham formando uma cápsula, conhecida

pelo nome de casulo. O casulo contém substâncias albuminosas nutritivas, produzidas pelas células glandulares clitelar, que sustentam o desenvolvimento do embrião. Segundo, EDWARDS & LOFTY (1977) a cor dos casulos varia de esbranquiçados, quando são formados, a amarelo, esverdeado ou amarronzado e diferem grandemente em tamanho, entre diferentes espécies.

A regulação do ciclo de vida parece ser de natureza hormonal e controlada por condições fisiológicas, como hábito alimentar, umidade e atividade de regeneração (MARCEL, 1986). Deste modo, quando se objetiva a utilização das minhocas na compostagem, por exemplo, pode ser interessante a triagem entre as espécies que apresentem, no caso, taxa de crescimento mais rápida, maturação sexual mais rápida e que requeiram na sua dieta quantidade maior de material orgânico. Espécies como *Lumbricus terrestris* e *Eisenia foetida* são as mais usadas neste processo. *L. terrestris* depende, principalmente, de nutrientes de resíduos orgânicos em fase inicial de decomposição, ao passo que *E. foetida* parece preferir material orgânico em estágio mais avançado de decomposição. Já *Allolobophora caliginosa* parece extrair seus nutrientes de matéria orgânica fragmentada intimamente misturada com o solo (EDWARDS & FLETCHER, 1988).

A preocupação com um conhecimento mais detalhado sobre o potencial reprodutivo de espécies de interesse para o homem torna-se então um pré-requisito.

Embora muito especulado, na verdade, pouco se conhece sobre a frequência de acasalamento, o sucesso na transferência do espermatozóide, a duração do período de produção de casulos e a viabilidade e a progênie das minhocas em geral (VENTER & REINECKE, 1987).

2.1.3.a. Maturidade sexual

O período de tempo para que uma minhoca atinja a maturidade sexual varia entre diferentes espécies e espécimes da mesma espécie podem tornar-se sexualmente maduros em diferentes épocas, dependendo das condições ambientais e nutricionais.

KALE *et al.* (1982), observaram que o crescimento das minhocas, maturação, produção de casulos e viabilidade do casulos são afetados pela disponibilidade de alimento.

NEUHAUSER *et al.* (1979), observaram que a maturidade sexual de *Eudrillus eugeniae* depende, além da disponibilidade de alimento, da densidade populacional, e que tornam-se sexualmente maduras, em esterco de cavalo, entre 50 e 70 semanas, após emergirem dos casulos.

Perionyx excavatus, comumente é encontrada em acúmulos de material orgânico, como *E. foetida*.

KALE *et al.* (1982) observaram variações no período em que *Perionyx excavatus* atinge a maturidade sexual, dependendo das diferentes fontes de esterco. Em esterco de carneiro a maturidade sexual é alcançada 124 dias. Em

esterco bovino, 183 dias e esterco de cavalo, 177 dias. O esterco de aves foi tóxico e as minhocas não reproduziram.

Segundo EDWARDS *et al.* (1984) citados por VENTER & REINECKE (1988), 50% dos indivíduos tornam-se sexualmente maduros entre quatro e oito semanas. Segundo VENTER & REINECKE (1988), em condições favoráveis *Eisenia foetida* pode desenvolver clitelo entre 40 e 60 dias.

Com o clitelo totalmente desenvolvido, as minhocas podem, então, acasalar-se e produzir casulos.

O ciclo de vida de *E. foetida* foi esquematizado por VENTER & REINECKE (1988) na Figura 05.

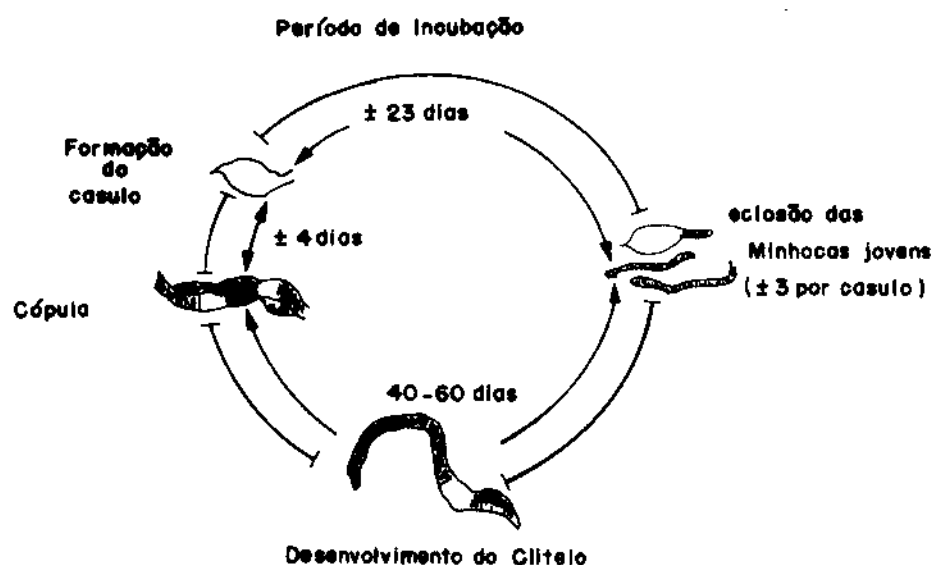


Fig.05 - Diagrama do ciclo de vida de *Eisenia foetida* em esterco de vaca a 25°C e 75% de umidade (Venter e Reinecke, 1988).

2.1.3.b. Produção de casulos

Segundo MARCEL (1986), geralmente, dois ou três dias após o acasalamento das minhocas, o primeiro casulo é depositado. *Eisenia foetida* segundo VENTER & REINECKE (1988) leva cerca de quatro dias.

A produção de casulos também varia entre espécies e depende dos fatores ambientais e nutricionais. MARCEL (1986), afirma que entre Lumbricidae a produção varia numa taxa de um casulo cada cinco dias, quando estão em grupo, mas quando isoladas imediatamente após a cópula produzem um casulo a cada dois dias.

Em 1948, EVANS & McQUILD, haviam reportado que *E. foetida* produz uma média de 3,8 casulos por semana por indivíduo. NEUHAUSER *et al.* (1980a), encontraram produção de dois casulos por semana e GRAFF (1974) três casulos por semana.

Em 1500 cm³ de esterco de cavalo misturado com solo, numa área de 324 cm², NEUHAUSER *et al.* (1979) encontraram que *Eudrillus eugeniae* produziu o máximo de casulos em seis semanas, quando o número inicial de minhocas foi quatro ou oito. A menor produção de casulos foi verificada, quando havia inicialmente cerca de 16 minhocas.

HAND *et al.* (1988) encontraram que em turfa isoladamente ou em chorume, a produção de casulos de *E. foetida*, após 35 dias foi praticamente nula. Enquanto, que

em resíduo de papel:chorume (2:1) produziu 4,2 casulos e em 1:1 média de 6,1 por indivíduos.

GUERRA & BEZERRA (1989) estudaram o comportamento de *Pontoscolex corethrurus*, conhecida como minhoca mansa, em diferentes substratos. Esta minhoca em solo produziu casulos nos dois primeiros meses de forma estável, depois houve uma queda influenciada pelo crescente número de indivíduos. Já em esterco de aves houve aumento na produção de casulos à medida que aumentava o número de indivíduos.

KALE et al. (1982) observaram, em esterco de carneiro, que *Perionyx excavatus* perdiam peso rapidamente após produção de casulos. Acredita-se que uma grande proporção de energia das minhocas adultas seja usada para produção de casulos e que quando os casulos não são produzidos a energia pode ser utilizada para o crescimento. Estes autores observaram a produção de casulos no período de um ano e constataram que em esterco de carneiro e em esterco de boi foram produzidos 65 casulos e em esterco de cavalo 42 casulos.

VENTER & REINECKE (1987) não constataram produção de casulos quando *E. foetida* foi individualmente isolada, indicando que esta espécie não se reproduz partenogeneticamente.

Os casulos de *Eisenia foetida* recentemente formados apresentam, normalmente, cor mais clara que aqueles mais velhos. Próximo à eclosão as minhocas jovens tornam-se visíveis na parede do casulo (VENTER & REINECKE, 1988).

Parece que a recepção do fluido seminal pela espermateca estimula a produção de casulos (HARTENSTEIN *et al.* 1987 citados por VENTER & REINECKE, 1987).

2.1.3.c. Fertilidade dos casulos

Normalmente os indivíduos pertencentes a família dos Lumbricidae produzem 4 a 12 ovos por casulo, mas somente dois a cinco são fertilizados (MARCEL, 1986).

O número de minhocas por casulo encontrado por VENTER & REINECKE (1988) variou de um a nove, numa média de 2,7. Dos casulos produzidos 29,6% gerou apenas um indivíduo, enquanto, 70,4% mais de um, embora, VENTER & REINECKE (1987) tenham encontrado que *E. foetida* produziu média de 1,6-4,6 minhocas/casulo.

Em esterco de cavalo com serragem (3:1) TOMLIN & MILLER (1981) observaram a produção de até 11 minhocas/casulos de *E. foetida*, média de $3,25 \pm 0,28$. Dos 310 casulos estudados 80,7% eclodiram e produziram minhocas. No inverno a produção caiu para 1,58 minhocas/casulo.

WATANABE & TSUKAMOTO (1976) observaram a produção de até sete minhocas/casulo por *E. foetida*.

Segundo, GRAFF (1974) o tipo de alimento disponível e o tempo de desenvolvimento da minhoca no substrato influencia o número de minhocas jovens que eclodem dos casulos.

GRAFF (1974) observou que em esterco de cavalo *E. foetida* produziu média de 2,8 minhocas por casulo, enquanto

em esterco de boi média de 3,2 minhocas/casulo aos 182 dias. Embora após 610 dias as duas fontes de esterco produziram semelhante número de minhocas/casulo.

GRAFF (1974) encontrou em esterco bovino moído encontrou 5,1 minhocas/casulo nos primeiros 91 dias e 4,5 nos 91 dias seguintes e em palha de trigo moída 3,3 minhocas/casulo nos primeiros 91 dias e 2,3 minhocas/casulo nos 91 dias seguintes. Acredita este autor que a diferença na produção de minhocas/casulo dos substratos moídos e não moídos deva ser devido ao espaço disponível para a minhoca mover-se.

Baseado na necessidade de nitrogênio no metabolismo das minhocas, GRAFF (1974) testou diversos substratos com diferentes fontes e níveis de N. Observou que havia correlação entre o número de minhocas/casulo e a fonte de N, mas não com o nível de N.

GRAFF (1974) constatou que o segundo menor nível de N (0,74%) em palha de batata-doce (massa seca) alcançou a maior média de minhocas/casulo (2,8).

É bem conhecida a necessidade de nitrogênio na dieta das minhocas e provavelmente neste estudo GRAFF (1974) esperava encontrar relação do nível de N com a fertilidade dos casulos, já que acrescentou a palha de batata-doce até 3,19% de N na forma de uréia. Surpreendentemente, todas as minhocas morreram.

Insistindo, (GRAFF, 1974) testou palha de trigo moída enriquecida com diferentes fontes de N e alcançou com

sulfato de amônio a média máxima do número de minhocas (3,4), semelhante aquela sem fornecimento de N.

2.1.3.d. Influência da temperatura e umidade na maturidade sexual

As minhocas não possuem nenhum órgão especializado para a respiração. A hemoglobina se acha dissolvida no plasma sanguíneo e serve de veículo ao oxigênio e gás carbônico, desta forma as trocas gasosas se dão através da pele.

A epiderme funciona como uma membrana semipermeável e permite a troca do CO_2 no sangue dos capilares pelo O_2 da atmosfera. Para que as trocas gasosas ocorram eficientemente é necessária adequada umidade (RIGH, 1966).

As minhocas são animais heterotérmicos, seu metabolismo e atividades vitais são dependentes da temperatura e conseqüentemente do teor de umidade do ambiente. Mesmo considerando-se a mesma espécie, o ciclo de vida desta pode variar em diferentes condições de temperatura e umidade.

A partir de 1955 são realizados os primeiros estudos sobre as relações de temperatura ambiente e as várias espécies, especialmente *E. foetida*. Mesmo em condições de laboratório, vários pesquisadores têm se preocupado em conhecer as condições ótimas de temperatura e umidade em diversos substratos, nas quais as minhocas do vermicomposto poderiam alcançar o máximo de suas capacidades metabólicas.

BONTEMPO & CASTRO (dados não publicados) observaram em 1984, que *Pheretima hawayana*, conhecida vulgarmente como puladeira ou minhoca de colarinho branco, sofre influência da temperatura e umidade relativa do ar no seu processo reprodutivo. É capaz de produzir maior número de filhotes nas condições de umidade e temperatura mais elevadas, 25% e 30°C, respectivamente.

TOMLIN & MILLER (1981) observaram que em esterco de cavalo o ciclo de vida de *E. foetida* variou de 51,5 dias a 25°C para mais de 166 dias a 13°C.

VENTER & REINECKE (1988) afirmaram que um decréscimo de 10% na umidade do substrato onde processavam suas observações provocava drástica redução na biomassa das minhocas.

REINECKE & VENTER (1985) cultivaram *E. foetida* em esterco de boi, passado em peneira de 1 mm e 400 µm de malha. Encontraram minhocas da mesma idade em diferentes fases de desenvolvimento sexual nas diferentes condições de umidade. Ao final de 40 dias observaram que 60% das minhocas apresentavam clitelo em cerca de 70% de umidade, enquanto, em 65% de umidade apenas 20% das minhocas desenvolveram clitelo. Abaixo de 65% de umidade, nenhuma minhoca foi capaz de desenvolver clitelo e aquelas desenvolvidas sexualmente diminuíam sua atividade, quando o nível de umidade caía e algumas, inclusive, cessavam a copulação. Postulam que os efeitos da umidade sobre a minhoca sejam indiretos e que

nível de umidade influencia na verdade a atividade microbiana.

VENTER & REINECKE (1988) usaram partículas de alimento com 0,38 mm e foram capazes de cultivar *E. foetida* favoravelmente entre 50 a 60% de umidade.

MITCHELL *et al.* (1977) mostraram que a taxa de alimentação das minhocas estaria dependente do conteúdo de umidade e seria tanto maior, quanto possível mantê-la em torno de 50%. Isto é axiomático, ou seja, se abaixa a taxa de crescimento devido ao abaixamento da umidade, igualmente retarda o desenvolvimento sexual (REINECKE & VENTER, 1985). Em esterco de boi passado em peneira, é possível ganhar peso em até cerca de 50% de umidade, mas abaixo de 40% não são capazes de se manterem vivas, segundo este último autor.

KAPLAN *et al.* (1980) observaram que em esterco de cavalo as condições ideais para que *E. foetida* atinja o peso máximo estão numa faixa de temperatura variando de 20°C a 29°C. A 33°C, 70% das minhocas morreram e os 30% restantes perderam peso. A 5°C, 33% da população morreu e 25% ganhou peso.

KAPLAN *et al.* (1980) usou lodo de esgoto ativado para ser estabilizado por *E. foetida*. Avaliou que com 15% a 30% de sólidos era possível ganhar o máximo de peso na faixa de temperatura entre 20°C a 29°C. Com 24% de sólidos o ganho de peso máximo ocorreu entre 25°C e 28°C, sendo significativamente superior nesta faixa de temperatura que entre 15 e 20°C. O teor de umidade do sistema esteve entre

70% e 85%. Nenhuma minhoca morreu abaixo deste nível de umidade, enquanto, muitas morreram em 90%.

TSUKAMOTO & WATANABE (1977) examinaram o desenvolvimento das minhocas em 10°, 15°, 20° e 25°C em composto com 70% a 80% de umidade. Concluíram que o tempo de incubação dos casulos de *E. foetida* tornava-se mais curto, quando a temperatura aumentava, porém o número de jovens que emergia dos casulos diminuía.

GRANT (1955) reportou que a temperatura de 25°C seria letal para *Pheretima*, TSUKAMOTO & WATANABE (1977) não constatarem tal fato, em relação a *Eisenia*. Ao contrário, observaram que a temperatura letal seria muito superior a 25°C. O que demonstra a existência de diferenças entre espécies quanto a adaptação ao ambiente.

Eudrillus eugeniae cresce na faixa de temperatura compreendida entre 5° e 33°C. As condições ótimas de crescimento, entretanto, se apresentam na faixa de 24° a 29°C em esterco de cavalo e 20° a 28°C em lodo de esgoto ativado. Em relação à disponibilidade de água são incapazes de ganhar peso abaixo de 65% de umidade e atingem o máximo de ganho de peso em 87% de umidade.

TOMLIN & MILLER (1981) testaram esterco de boi e serragem, numa proporção de 3:1, mantido com 82% de umidade e encontraram uma queda de 34% na eclosão de casulos, quando aumentaram a temperatura de 16°C para 25°C. Observaram também uma queda na média de 1,94 minhocas/casulo por semana a 16°C para 0,65 a 25°C. Acreditam que numa temperatura mais

elevada, a taxa de respiração dos casulos é mantida com dificuldade se há muitas minhocas se desenvolvendo, podendo resultar na mortalidade do casulo.

3.1.3.e. Expectativa de vida

O tempo de vida de uma minhoca varia entre as diferentes espécies: *Aporrectodea longa* foi capaz de viver 10 anos; *Lumbricus terrestris* seis anos (KORSHELT, 1914); *Eudrillus eugeniae*, provavelmente, não passe de 12 semanas de acordo com NEUHAUSER *et al.* (1979).

Segundo KORSHELT (1914) e MINCHEN (1954) citados por KALE *et al.* (1982) a expectativa de vida de *Allolobophora chlorotica* é cerca de 15 meses. Mas, em condições ideais de laboratório podem viver aproximadamente dois anos.

VENTER & REINECKE (1988) realizaram um experimento com observação de mais de 600 dias para avaliar o ciclo de vida de *E. foetida*. Como nenhuma minhoca morreu no período da observação, concluíram que certamente esta espécie em condições adequadas possa viver mais de dois anos.

A observação referida acima está em concordância com EDWARDS & LOFTY (1977) que presumiram que esta minhoca possa viver de dois a cinco anos e com KORSHELT (1914) que cultivou esta espécie durante 4,5 anos. Embora GRAFF (1974) tenha afirmado que são capazes de viverem até 700 a 974 dias, após alcançar sua maturidade sexual e cerca de 1000 dias, considerando seu estágio juvenil.

Segundo KALE *et al.* (1982) o período de produção de casulos por *Perionyx excavatus* foi contínuo em esterco de carneiro, mas curto. Além disto, as minhocas que produziram mais casulos, normalmente, morriam primeiro. Parece que o rápido crescimento e maturação das minhocas em esterco de carneiro teve um efeito contrário na longevidade. Tal fato não foi observado em esterco de vaca e de cavalo, onde a produção de casulos sofreu interrupções e a fase reprodutiva foi mais longa, não acontecendo mortalidade no período de um ano.

Segundo VENTER & REINECKE (1987) as minhocas, individualmente, podem diferir marcadamente com relação ao número da prole produzida, inclusive, baseado na especulação de que este fenômeno tenha base genética, sugerem programas que visem uma seleção daquelas altamente produtivas.

2.2. INTERAÇÃO ENTRE MINHOCAS E MICROORGANISMOS

A relação entre minhocas e microorganismos é assunto de grande interesse desde tempos atrás.

Há vários tipos de microorganismos que podem ser encontrados no trato digestivo das minhocas: protozoários, bactérias, algas, fungos e actinomicetos.

A contribuição dos microorganismos para a dieta das minhocas foi inicialmente revelada por BASSALIK (1913), quando isolou mais de 50 espécies de microorganismos do

trato digestivo de *Lumbricus terrestris*, diferentes daqueles encontrados no meio em que viviam e por AICHBERGER (1914), quando observou que alguns microorganismos viviam no trato digestivo das minhocas e que formavam, aparentemente, uma capa protetora para a digestão.

A dependência das minhocas diante dos microorganismos é um assunto intrigante e comprova, cada vez mais, que os processos da natureza ocorrem em cadeia.

MILES (1963), colocou casulos de *Eisenia foetida* em solos previamente esterilizados em autoclave. Posteriormente, recolonizou as amostras com bactérias e fungos e observou que as minhocas que emergiram dos casulos não tiveram crescimento normal até a maturidade sexual.

Entretanto, quando MILES (1963) enriqueceu o solo com certos tipos de protozoários, principalmente ciliados e flagelados o crescimento foi perfeito. Estes resultados evidenciam que os protozoários constituem parte essencial da dieta de *Eisenia foetida*. De fato, esta espécie de minhoca vive em pilhas de esterco e em solos com alto conteúdo de matéria orgânica, onde estes protozoários são encontrados em grande número.

Uma evidência de que os microorganismos representam associação importante para as minhocas foi demonstrada através dos ácidos graxos de *Lumbricus terrestris* e *Aporrectodea caliginosa* coletadas em pastagens de Nova Zelândia. Os exames qualitativos e quantitativos mostram que uma parcela substancial dos ácidos graxos isolados destas

espécies são caracteristicamente sintetizados por microorganismos e não por animais (HANSEN & CZOCHANSKA, 1974 e 1975).

Em contrapartida, PARLE (1963) acredita que com relação às enzimas de celulose e quitina encontradas no canal alimentar das minhocas, estas sejam excretadas por elas mesmo e não pelos microorganismos simbióticos. De fato, LOQUET & VINCESLAS (1987) constataram grande atividade celulásica no trato digestivo de *Eisenia foetida andrei*, porém desconheciam a origem da enzima.

ATLAVINYTE & POCIENE (1973) observaram que a densidade de minhocas (Lumbricidae) se correlacionava com a quantidade de algas. Quando a densidade de minhocas aumentava, a quantidade de algas diminuía. Concluiu que a passagem do solo através do trato digestivo das minhocas resultava na digestão das algas e PIEARCE (1978) confirmou estes resultados.

Segundo DAY (1950) o número total de bactérias, actinomicetos e fungos não é consideravelmente maior ou menor em coprólitos frescos de *L. terrestris* que em solo. Embora as bactérias nitrificantes não sofram importante acréscimo ou decréscimo, quando passam pelo trato digestivo das minhocas, *Bacillus cereus* sofre redução em número, enquanto, *Serratia marcescens* morre e provavelmente, devido a ação da secreção faríngeana da minhoca.

Com relação às bactérias, WRIGHT (1972) observou que *L. terrestris* consome 35% a mais dos substratos, quando haviam

sido inoculados com *Pseudomonas aeruginosa*, comparado com aquele sem inoculação. Segundo este autor, talvez o alimento possa ser mais atrativo pela fonte de proteína.

WRIGHT (1972), estudou os fatores que governam a ingestão de alimentos por *Lumbricus terrestris*. Observou que em laboratório as minhocas rejeitavam folhas frescas de maçã. De acordo com as observações de outros pesquisadores, considerou, que a presença de material fenólico na folha possa ser desagradável para as minhocas.

WRIGHT (1972), prosseguiu com suas observações e verificou que deixando as folhas em câmara úmida sem alterar o conteúdo fenólico, as minhocas se alimentavam normalmente. Observou que a alteração da textura da folha de maçã em câmara úmida, proporcionava o crescimento dos microorganismos após 4 e 6 dias. E concluiu que o comportamento das minhocas na natureza, levando as folhas para camadas mais profundas do solo, favorece o crescimento das bactérias e fungos por mantê-las úmidas. A alteração da textura possibilita a posterior ingestão destas folhas pelas minhocas, independentemente do conteúdo fenólico. WRIGHT foi o primeiro a demonstrar o efeito microbiano na seleção de alimentos pelas minhocas.

CDOKE & LUXTON (1980) em condições de laboratório constataram que *L. terrestris* se alimentava preferencialmente de solo com fungo (*Rhizoglyphus* e *Penicillium* sp) que com bactéria (*Pseudomonas fluorescens*). Propuseram que o crescimento de fungos no alimento

proporciona disponibilidade de carboidratos e compostos nitrogenados que as minhocas pudessem utilizar.

Esta preferência foi constatada novamente por COOKE (1983) em substrato inoculado com *Mucor hiemalis* e também com *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* e *Trichoderma viride*, comparado com aquele inoculado com *Cladosporium cladosporioides*, *Poronia piliformes*, *Chaetonium globosum* e *Penicillium digitatum*. Interessante que neste caso a preferência tenha se correlacionado com o número de fungos, cálcio e umidade, ao invés de correlacionar-se com o conteúdo de polifenol, nitrogênio ou carbono do fungo como se esperava.

COOKE (1983), considerou que a umidade fosse muito importante para manter a água do corpo da minhoca, ou ainda, que a umidade possa servir para fornecer o nível da matéria orgânica e portanto um substrato com alta energia microbiana. Com relação ao cálcio, talvez possa haver alguma relação com o pH ou capacidade de *L. terrestris* selecionar substratos mais palatáveis.

NEUHAUSER *et al.* (1980a) avaliou diversos materiais que poderiam favorecer o ganho de peso por *Eisenia foetida* em vários resíduos. Dentre outras, concluiu que esta espécie seria capaz de ganhar peso em células intactas de certas bactérias, fungos, algas e protozoários.

Embora FLACK & HARTENSTEIN (1984) tenham constatado o maior ganho de peso das minhocas com os grupos de microorganismos referidos anteriormente, quando protozoários

estão presentes a taxa de crescimento das minhocas é cerca de 20% maior.

Existem alguns nutrientes que podem ser tóxicos para as minhocas (NEUHAUSER *et al.* 1980a) ou pode haver produção de algum metabólito antagonístico pelos microorganismos, podendo matar as minhocas (MORGAN, 1985 citado por LEE, 1985).

MORGAN, citado por LEE, 1985, esterilizou casulos de *E. foetida* com carbencilina; então, ofereceu às minhocas jovens, eclodidas destes casulos, várias espécies de bactérias e actinomicetos. Ao final de seis semanas todas as minhocas morreram.

Algumas espécies dos gêneros, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, podem ser tóxicas para as minhocas, as quais são conhecidas pela produção de compostos antimicrobianos (HAND *et al.*, 1988).

MORGAN, citado por LEE, 1985, observou que *E. foetida* não morria quando era oferecido diferentes espécies de fungos. Ao contrário, as observações deste autor levam a crer que as minhocas, inclusive, utilizavam algumas espécies de fungos como fonte de alimento.

As interações entre minhocas e microorganismos parecem ser específicas. O tipo de interação observada com bactérias parece estar relacionada a sua parede celular. Bactérias gran-negativas tendem a ter efeito positivo na nutrição das minhocas, enquanto gran-positivas tendem a ter efeito negativo (HAND *et al.*, 1988).

Os fungos, aparentemente, são mais prontamente disponíveis como fonte alimentar que as bactérias, baseado no significativo efeito notado sob a nutrição das minhocas.

Cerca de 95% do resíduo de papel vermicompostado e com bactéria inoculada foi consumido, enquanto que apenas 50% daquele não inoculado foi consumido. Embora, pouca alteração tenha sido observada no número de microorganismos na presença ou na ausência de minhoca (HAND *et al.* 1988).

HAND *et al.* (1988) concluem que a técnica de inoculação de resíduos com microorganismos benéficos tem grande potencial no sistema de vermicompostagem, especialmente de resíduos agrícolas e industriais. Estes resíduos são naturalmente uma pobre fonte de alimentos para as minhocas e a inoculação destes com microorganismos, como fonte alimentar complementar poderia aumentar a velocidade e a eficiência da vermicompostagem.

Em seu ambiente natural, parece que as minhocas selecionam os microorganismos que digerem dentre aqueles que foram ingeridos. Por isso, muitos microorganismos podem diminuir em número ao passar pelo seu trato digestivo, enquanto outros podem ser estimulados a se multiplicarem. Além disso, nem todas as espécies de minhocas têm a mesma relação com os microorganismos.

KOZLOVSKAYA & ZHDANNIKOVA (1961) compararam *Octolasion lacteum* e *Lumbricus rubellus* e observaram que a primeira vivia numa profundidade de 10 a 40 cm e que o conteúdo de seu intestino tinha aproximadamente a mesma densidade de

bactéria que o solo em que vivia. A segunda vivia entre 0 e 5 cm do solo e a densidade de bactéria era cerca de 10 vezes maior que no solo. Esta relação depende, também, do tipo de alimento disponível.

A alteração no número de microorganismos foi mencionada inicialmente por STOCKLI (1928). Bactérias e actinomicetos podem aumentar em número, quando passavam da região anterior para posterior do intestino das minhocas. Comparando os coprólitos com cerca de 32 milhões de bactérias/g com o solo onde vivem com cerca de seis a nove milhões/g (TEOTIA, 1950 citado por LEE, 1985), percebeu que havia um estímulo de crescimento para as bactérias, ao invés de serem digeridas pelas minhocas.

É interessante notar que *Escherichia coli* morre no trato digestivo de *L. terrestris* (BRUSEWITZ, 1959) e de *Pheretima* (KHAMBATA & BHAT, 1957). Neste caso, ou foi digerida ou alguma excreção do intestino pode ter impedido o crescimento desta espécie de bactéria.

Com relação aos fungos, DAWSON (1947) observou que ao serem ingeridos, parecem não serem lesados. De fato, HUTCHINSON & KAMEL (1956) conseguiram isolar 70 espécies de esporos viáveis do canal alimentar de 10 indivíduos de *L. terrestris*. Muitos destes esporos tinham parede relativamente fina. Além disto, a taxa de difusão de quatro espécies de fungos foi substancialmente aumentada, quando as minhocas estavam presentes.

Entretanto, PARLE (1963) demonstrou diferente. Apesar dos actinomicetos e as bactérias multiplicarem rapidamente ao passar pelo trato digestivo das minhocas (*L. terrestris*, *Aporrectodea longa* e *A. caliginosa*), os fungos não proliferavam.

KEOGH & CHRISTENSEN (1976) confirmaram as observações anteriores. Estes autores observaram que os esporos de *Pithomyces chartarum*, um fungo saprófita, após trânsito pelo trato digestivo de *L. rubellus* tornava-se não viável. A viabilidade média daqueles não ingeridos foi 95%. Neste caso, isto é interessante, uma vez que este fungo causa sérias doenças em animais que utilizam pastagens contaminadas.

Com relação aos nematóides, PEARCE & PHILLIPS (1980) mencionaram sobre a presença de *L. terrestris* em esterco com elevada população de nematóides. Ao contrário, YEATES (1981) observou tanto em casa de vegetação como em campo que na presença de minhocas-Lumbricídeo havia uma queda de 37 a 66% na população de nematóides.

Igualmente ROESSNER (1986) demonstrou que ocorria uma redução no número de nematóides endoparasitas de plantas em 10 espécies observadas de Lumbricidae, como um efeito da passagem através do seu trato digestivo.

A atividade da nitrogenase associada com a minhoca indica a presença ativa de bactéria fixadora de N_2 .

CITERNESI et al. (1977) isolaram bactéria fixadora da cavidade gastroentérica de *Eisenia foetida*. Em contraste,

KAPLAN & HARTENSTEIN (1977) testaram 5 espécies de minhocas: *E. foetida*, *Octolasion tyrtaneum*, *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus* sp., *Allobophora chlorotica* e não evidenciaram fixação de N_2 ou redução de NO_3^- ou NO_2^- em nenhuma das minhocas.

Posteriormente, SIMEK & PIZL (1989), detectaram a presença ativa de bactéria fixadora de N_2 em *Lumbricus rubellus*. Além disto, observaram que o solo influenciado pelas minhocas apresentava a atividade da nitrogenase cinco vezes maior que o solo controle. De acordo com o número de repetições ($n = 10$), provavelmente, os resultados deste experimento possam ser mais convincentes que outros experimentos.

Segundo SYERS *et al.* (1979) a alta atividade da nitrogenase medida nos coprólitos se deve a substâncias altamente energéticas e aos compostos orgânicos complexos parcialmente solúveis, devido a passagem através do intestino das minhocas, tornando-os prontamente disponível para os microorganismos. Desta forma, a atividade da nitrogenase pode ser alta nos coprólitos e apresentar um baixo número de bactérias fixadoras, enquanto no solo a atividade pode ser baixa, mas com grande número de bactérias que são limitadas pela fonte de energia.

Segundo KULINSKA (1961) a influência das minhocas na microflora do solo depende das condições fisiológicas dos indivíduos entre si, que proporcionará a digestão dos

microorganismos no trato digestivo da minhoca ou estímulo à reprodução dos microorganismos.

ROUELLE citado por SATCHELL (1983) observou que *Rhizobium* não era digerido, quando passava pelo trato digestivo de *Lumbricus terrestris*, embora fossem atraídas por polissacarídeo secretado pela bactéria ou pela solução de açúcar incluído no inóculo. ROUELLE, testou esta espécie de minhoca em solo com soja e verificou perfeito desenvolvimento dos nódulos no sistema radicular. Onde não havia minhocas houve produção de maior número de nódulos, porém, restrito à parte superior da raiz. Segundo ROUELLE, isto pode ser devido ao aumento da microfauna e microflora antagonística à bactéria e também à dispersão do *Rhizobium* pela minhoca.

SATCHELL (1983) testou *Eisenia foetida*, *Dendrobaena veneta*, *Lumbricus rubellus* e *Allolobophora caliginosa* na atividade da fosfatase em condições de laboratório e usou fitina (hexofosfato inositol de Ca) como fonte de fósforo orgânico. Coletou o material fecal produzido pelas minhocas e comparou a atividade da fosfatase com aquele material não ingerido. Os resultados expressos em μg de fenol liberado em 3 h $\cdot (\text{g peso seco de substâncias})^{-1}$ mostraram claro aumento na atividade da fosfatase nas fezes das minhocas. Depois mediu a atividade da fosfatase em intervalos de uma unidade de pH de 2 a 10. O dobro do pico da atividade foi observado em pH 3 a 5 e 9 a 10. A atividade da fosfatase em pH 3 a 5 foi provavelmente produzida pela atividade microbiana e de 9

a 10 além da atividade microbiana, devido a fosfatase alcalina produzida pelas minhocas.

Os resultados experimentais não são muito conclusivos, mas as evidências indicam que as minhocas realmente sejam dependentes de uma série de microorganismos em sua nutrição e que provavelmente, os fungos e os protozoários sejam os mais importantes microorganismos em sua dieta, embora, o papel destes não esteja claramente definido e dependa muito de uma série de circunstâncias (EDWARDS & FLETCHER, 1988).

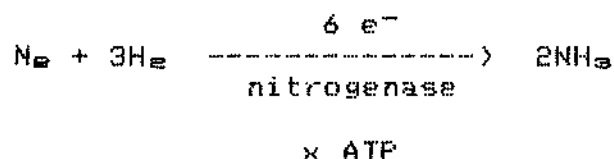
Entende-se que, independente da função que os microorganismos possam ter na nutrição das minhocas, como esses são normalmente ingeridos com o alimento, desde que estejam presentes a minhoca e os microorganismos se interagirão e poderão trazer benefícios ou não ao homem conforme ilustrado na Figura 06.

2.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

O nitrogênio é o nutriente que mais onera o custo das adubações, mas apresenta a grande vantagem de ser um elemento que pode ser suprido através de processos biológicos de baixo custo (DE-POLLI *et al.* 1988).

Na forma diatômica o N_2 é pouco reativo e necessita de muita energia de ativação para ser reduzido a NH_3 . Na natureza, este processo pode ser realizado pelos microorganismos que apresentam a nitrogenase. A nitrogenase é o complexo enzimático responsável pela redução do

nitrogênio atmosférico a amônia. Através do ATP e H_2 gerado dos processos biológicos é possível a seguinte reação:



que resulta na formação de NH_3 .

DILWORTH (1966) e SCHOLLHORN & BURRIS (1966) descobriram que o acetileno inibe a redução de N_2 pela nitrogenase e que o acetileno (C_2H_2) é reduzido a etileno (C_2H_4). Sendo assim, a reação já mencionada permitiu uma nova técnica para medir a atividade da nitrogenase. Através deste método foi possível ampliar o conhecimento sobre a ocorrência de microorganismos fixadores de N_2 em vários sistemas.

Segundo, FRED *et al.* (1932) citado por DE-POLLI *et al.* (1988) há registro de gravuras de leguminosas noduladas que datam de 1908, mas a fixação em gramíneas e cereais a níveis economicamente promissores tem sido mais relatados nas últimas duas décadas.

Os resultados de LIMA *et al.* (1987) indicam que quantidades substanciais de N_2 podem ser fixados por certos cultivares de cana-de-açúcar.

Em 1988, CAVALCANTE & DOBEREINER isolaram uma nova bactéria diazotrófica, *Acetobacter diazotrophicus*, que ocorre em grande número em raízes e colmo de cana-de-açúcar. Esta apresenta características peculiares e semelhantes a bactéria produtora de ácido acético; com crescimento ótimo

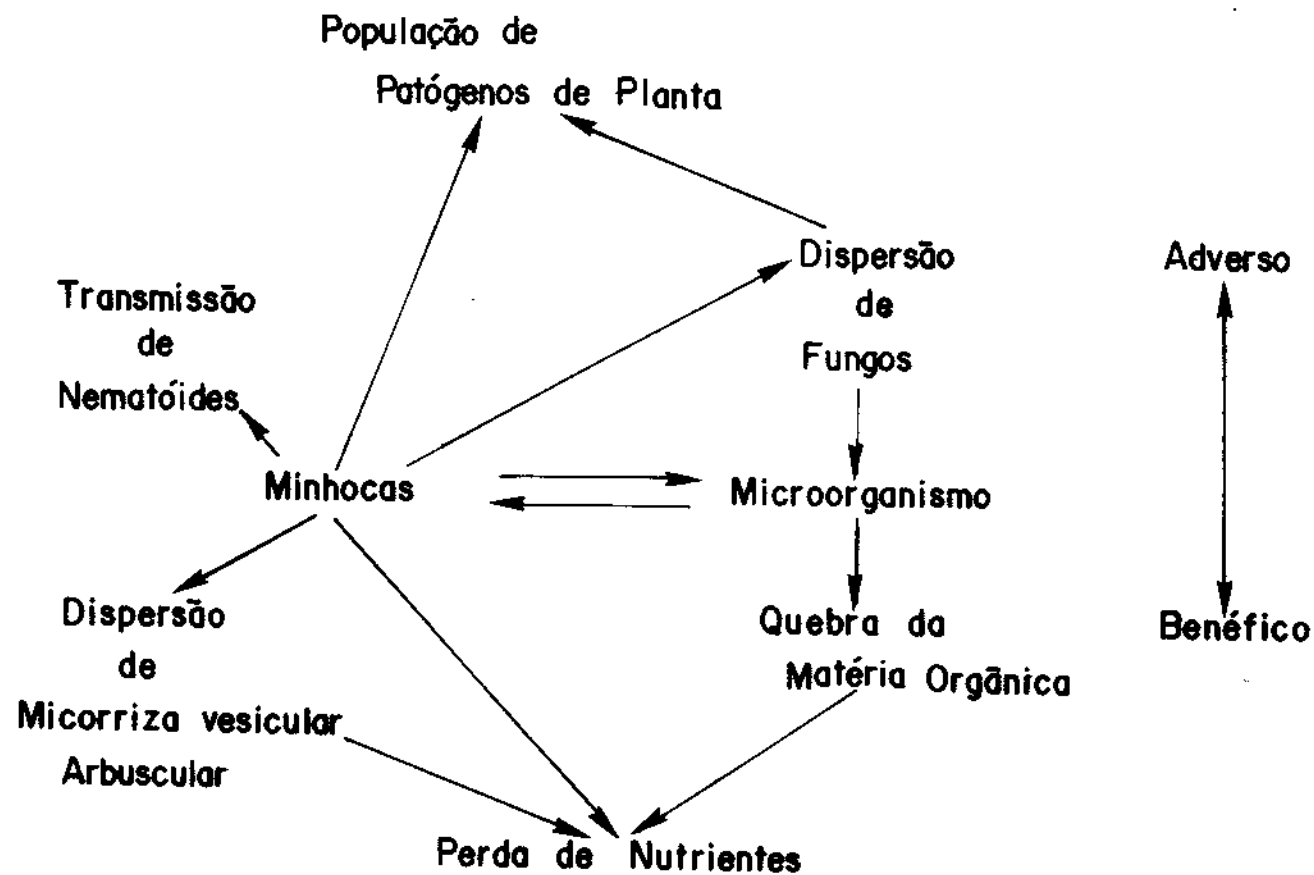


Fig.06-Interação entre minhocas e microorganismos (Edwards e Fletcher, 1988).

em 10% de açúcar e pH 5,5. Esta bactéria é microaeróbica e capaz de fixar N_2 na presença de NO_3^- . Etano, ácido acético e ácido láctico são oxidados a CO_2 e H_2O .

2.3.1. Interação entre microorganismos decompositores de celulose-hemicelulose-lignina e microorganismos fixadores de N_2 .

Alguns subprodutos como palha de cereais e bagaço de cana-de-açúcar são ricos em lignoceluloses. O bagaço contém cerca de 50% de celulose, 27,9% hemicelulose, 9,8% lignina e 11,3% de conteúdos celulares (KEWALRAMANI *et al.* 1988). A grande proporção de celulose e hemicelulose nestes resíduos leva a alta relação C/N que pode resultar na limitação de N durante a decomposição.

Em clima quente, a maior taxa de utilização microbiana de O_2 na vizinhança dos microorganismos diazotróficos, protegendo a nitrogenase contra efeitos deletérios, possibilita a fixação aeróbica de N_2 em "litter" de plantas (HILL & PATRIQUIN 1990)

PATRIQUIN (1982) encontrou alta atividade da nitrogenase em "litter" de cana-de-açúcar sob condições aeróbicas, com ganho anual de N estimado em 10 a 40 $kg \cdot ha^{-1}$.

A possibilidade das bactérias diazotróficas utilizarem os produtos de decomposição destes carboidratos mais resistentes como fonte de energia para fixação de N_2 ,

proporcionando aumento do N total, estimularia a atividade dos organismos decompositores. Com isto, ocorreria perda adicional de C, gerando um estreitamento da relação C/N (VEAL, 1984).

DOBEREINER (1961) inoculou composto de lixo urbano com bactéria fixadora de N_2 do gênero *Beijerinckia* e concluiu que a decomposição da matéria orgânica mais grosseira foi acelerada na presença das bactérias fixadoras de N_2 , e embora tenha ocorrido fixação biológica de N_2 em vasos com e sem inoculação, o teor de N fixado foi 1,06 kg/t lixo sem inoculação, comparado com 3,0 t/lixo do tratamento inoculado.

HILL & PATRIQUIN (1988) inocularam organismos fixadores, presentes no "litter" de cana-de-açúcar, em palha de trigo em decomposição. Isto resultou no ganho de 6,6 mg $N \cdot g^{-1}$ palha original, equivalente a 33 kg N fixado ha^{-1} para 5 t ha^{-1} palha. Este ganho de N favoreceu o aumento da biomassa microbiana e consequentemente favoreceu a perda de peso da palha. Naquele com inoculação a perda de peso foi 2,6 a 3,2 vezes a perda de peso da palha com a microflora autóctona somente.

LYNCH & HARPER (1983) constataram que a fixação de N_2 durante a decomposição da palha resulta no ganho de 11,5 mg N $\cdot (g \text{ palha perdida})^{-1}$ num período de oito semanas a 25°C.

A combinação de organismos decompositores de celulose via celulase, e fixadores de N_2 , via nitrogenase merece estudos mais intensivos, abrindo um campo que parece

promissor no processo da compostagem. Há inclusive possibilidades novas com a descoberta de LESCHINE *et al.* (1988) que mostrou a atividade da celulase e da nitrogenase numa mesma bactéria.

O desenvolvimento e a adaptação tecnológica de muitos trabalhos realizados nesta área poderão contribuir num futuro próximo para uma agricultura de menor custo (DE-POLLI & DOBEREINER, 1989).

2.4. PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Os vegetais quando ingeridos pelos animais têm sua composição alterada através da ação do trato digestivo animal. Dentre os principais constituintes das plantas a celulose, hemicelulose, ácidos graxos e proteínas são mais facilmente digeridos pelo animal que a lignina. A composição química do excreta do animal varia com a qualidade do alimento que foi ingerido. A mesma planta em diferentes estádios de crescimento varia sua composição química e igualmente sua digestibilidade pelo animal. Além disto, diferentes animais não digerem o alimento da mesma maneira (WAKSHAN, 1938).

O processo de transformação do esterco ou qualquer outro resíduo orgânico numa forma mais estabilizada, é denominado **compostagem**. Este processo é conhecido desde milênios no Oriente, especialmente na China e a divulgação

deste processo no século XX se deve, principalmente, a Sir Albert Howard, considerado o "pai da compostagem".

O mecanismo e a rapidez de transformação do resíduo orgânico e a natureza química do húmus produzido como resultado da compostagem e seu efeito no solo depende além da composição química do resíduo, de fatores como temperatura, umidade, aeração e biomassa presente (WAKSMAN, 1938).

Durante o processo de compostagem a oxidação biológica do resíduo orgânico é realizada pelos microorganismos para a obtenção de energia. Nem toda energia gerada na quebra dos constituintes orgânicos é utilizada no metabolismo dos microorganismos, parte é liberada na forma de calor. Este desprendimento de calor varia de acordo com a natureza química dos constituintes do material orgânico presentes num dado instante do processo, caracterizando o processo em quatro fases: mesofílica, termofílica, resfriamento e maturação (Figura 07).

A fase mesofílica constitui da transformação dos carboidratos facilmente decomponíveis. Ocorre aumento da temperatura que varia de 40 a 45°C e o pH diminui em função dos ácidos orgânicos produzidos (GRAY & BIDDLESTONE, 1981). Os fungos, consumidores de açúcares primários, denominados sacarolíticos, normalmente são observados nesta fase; apesar da degradação da celulose e hemicelulose possibilitar o desenvolvimento destes fungos no final do processo (CRUSIUS, 1989).

Com o crescente aumento da temperatura aqueles microorganismos mais resistentes começam a proliferar e em torno de 60°C os fungos não resistem. 75% do calor liberado nesta fase, conhecida como termofílica, é derivado da decomposição dos lipídios.

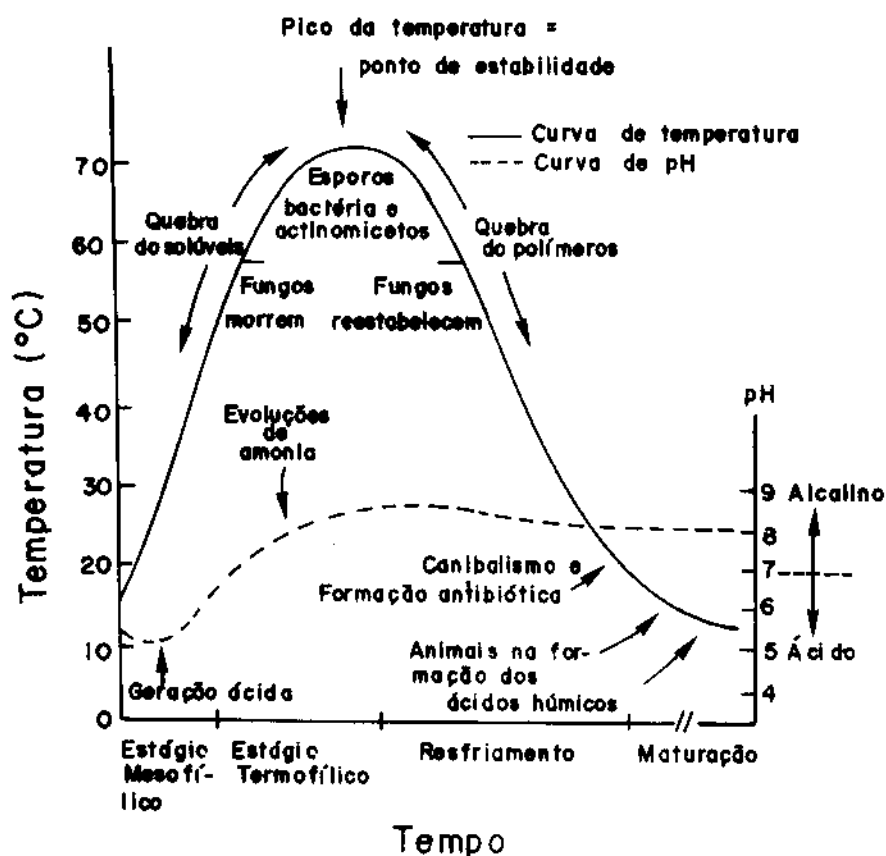


Fig.07 - Variações de temperatura e pH na pilha de composto (Gray e Biddiestone, 1981).

Em poucos dias a temperatura atinge cerca de 70°C, considerada ideal para o processo, pois acima disto ocorre morte térmica dos microorganismos. Nesta temperatura, a decomposição é acelerada e mantida, principalmente, pelas

bactérias e actinomicetos. Nesta fase as substâncias facilmente degradáveis como açúcares, amidos, ácidos graxos e proteínas são facilmente consumidos e como a amônia é produzida pela deaminação dos aminoácidos das proteínas, o pH torna-se alcalino (GRAY & BIDDLESTONE, 1981).

Em esterco, a amônia é derivada principalmente da hidrólise da uréia, que está presente em maior quantidade na urina que nas fezes. A forma como o esterco é manejado pode ser responsável por 10 a 90% das perdas de nitrogênio por volatilização da amônia (SUTTON *et al.*, 1982 citado por AITA, 1984).

A decomposição dos componentes mais resistentes provoca uma queda na taxa da reação e a temperatura começa a diminuir gradativamente até a temperatura ambiente, caracterizando, a fase de resfriamento. Nesta fase os fungos termofílicos reivendem a pilha em compostagem pelas extremidades mais frias (GRAY & BIDDLESTONE, 1981).

A transformação dos carboidratos é mediada por enzimas intra e extra celulares. A hemicelulose e a celulose se caracterizam pelo alto peso molecular sendo impermeável à célula microbiana. Assim, muitos microorganismos excretam enzimas extracelulares, que agem hidroliticamente, convertendo o material insolúvel em açúcares solúveis, tornando o C fonte de energia disponível. Em contrapartida, a lignina se acumula no composto, por ser um polímero com núcleo aromático dificultando ainda mais o ataque microbiano (ALEXANDER, 1977).

Entre as exoenzimas secretadas incluem amilase, celulase, hemicelulase, poligalacturase e invertase (GUPTA, 1967).

O material compostado, geralmente, sofre uma perda de 26% a 60% de peso e o volume diminui aproximadamente 66% (PEIXOTO, 1984).

O processo final de compostagem, fase de maturação, em direção à formação do húmus, diferente das outras fases requer alguns meses. Nesta fase do processo a macrofauna tem importante papel na quebra física das constituintes orgânicos residuais.

A transformação dos constituintes orgânicos em formas inorgânicas é conhecida como **mineralização**. Na natureza, esta transformação constitui um processo biológico importante em que o carbono é recirculado para a atmosfera como CO_2 e o nitrogênio como amônio e nitrato, bem como outros nutrientes requeridos pelas plantas tornam-se disponíveis. Neste processo, algum C sofre **imobilização**, ou seja, assimilação biológica das formas inorgânicas.

Dependendo da natureza da microflora e quantidades de células microbianas sintetizadas, a quantidade de C do substrato usado para síntese celular varia de 10% a 70% e o conteúdo de N no protoplasma microbiano varia de 6% a 13% para bactéria, 3% a 6% para fungos (STEVENSON, 1982). Quanto maior a eficiência metabólica dos microorganismos, menor a quantidade de CO_2 liberada.

O ponto de equilíbrio entre imobilização e mineralização do nitrogênio ocorre em resíduos com relação C/N cerca de 25:1 (ALLISON, 1966; JANSON & PERSSON, 1982 citados por AITA, 1984).

Com base na biodegradabilidade decrescente os constituintes carbonados, presentes nos resíduos orgânicos, podem ser agrupadas espécies contendo C orgânico solúvel prontamente oxidável e espécies tipo proteínas, hemicelulose, celulose e lignina (REDDY *et al.* 1980 citados por AITA, 1984). Os mecanismos envolvidos na transformação destes constituintes são mostrados na Figura 08.

Amido, açúcares e proteínas são rapidamente atacados por uma variedade de microorganismos. A celulose é atacada por alguns microorganismos celulolíticos: bactérias, fungos e actinomicetos. Enquanto que a hemicelulose representa uma variedade de substâncias diferentes quimicamente, dificultando estabelecer a natureza dos organismos capazes de decompô-la e a rapidez com que são decompostos. Os basidiomicetos, ascomicetos, actinomicetos e vários grupos de bactérias são capazes de decompor a lignina, que é o constituinte da planta mais resistente à decomposição.

A síntese do húmus no ambiente tem sido especulada por muitos pesquisadores e conseqüentemente muitas teorias para formação do húmus tem sido propostas, embora nenhuma independentemente possa explicar todos os aspectos da síntese do húmus, devido à complexidade inerente aos polímeros húmicos.

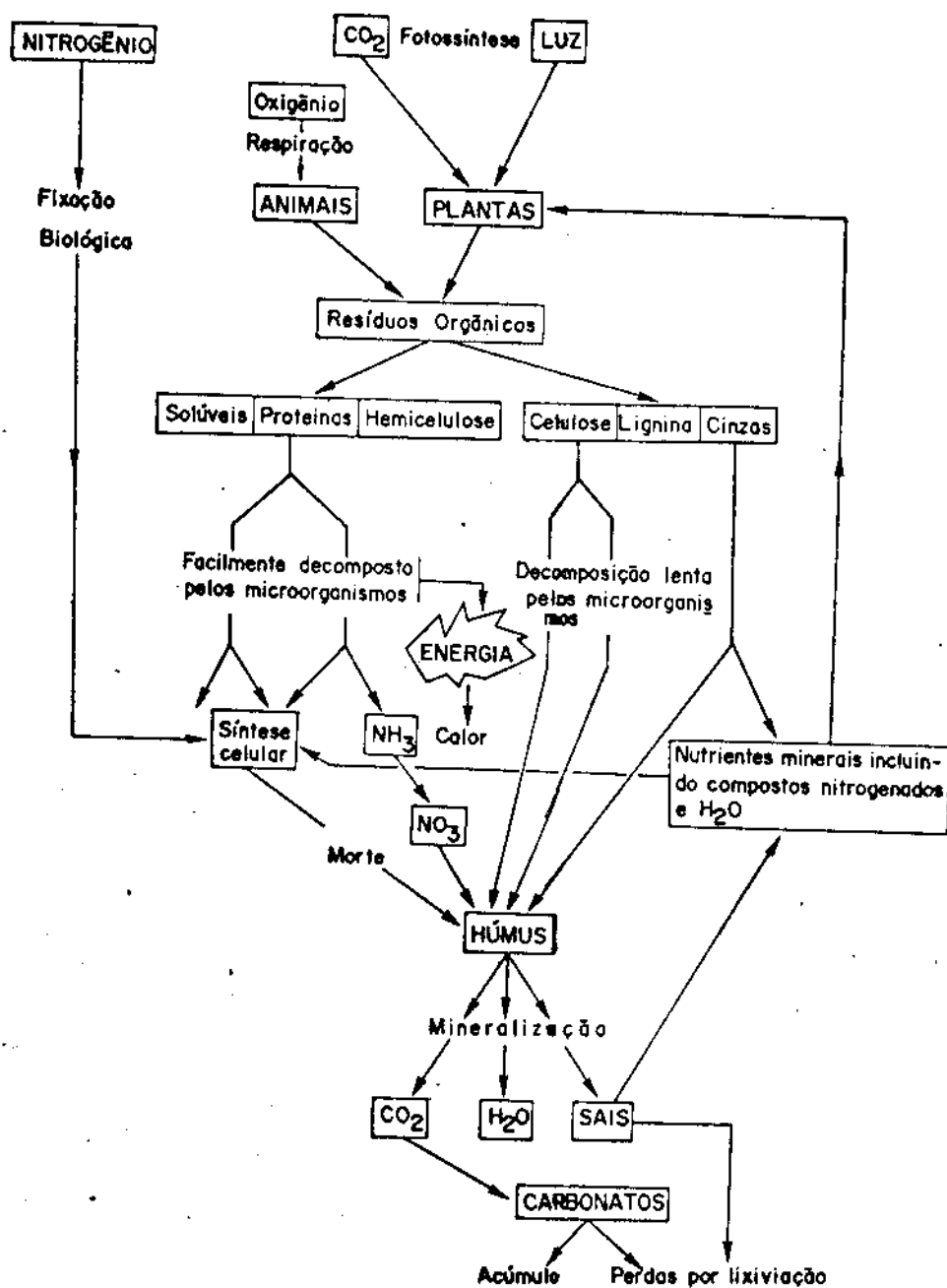


Fig.08 - Processo de síntese e decomposição do húmus (Nikiforoff, 1938, modificado).

WAKSMAN (1938) segundo STEVENSON (1982) propôs a TEORIA DA LIGNINA, que considera que as modificações na estrutura da lignina, formando compostos com propriedades semelhantes a dos ácidos húmicos e sua resistência a biodegradação, sejam fortes evidências de que os ácidos húmicos sejam formados a partir deste carboidrato.

Posteriormente FLAIG segundo STEVENSON (1982) propôs a TEORIA DOS POLIFENÓIS, segundo este as quinonas tanto de origem lignínica, quanto aquelas sintetizadas pelos microorganismos a partir de outros substratos seriam os principais blocos constituintes das substâncias húmicas.

LINHARES (1989) a partir, principalmente, dos estudos de MARTIN & HAIDER (1971) citado por LINHARES (1989) sugere que as melaninas fúngicas, devido sua resistência a biodegradação e semelhança com os ácidos húmicos devam desempenhar um papel significativo na formação do húmus.

VARADACHARI & GHOSH (1984) unificaram as teorias e concluíram: 1) qualquer fonte de C que possa ser transformado pelos organismos em compostos fenólicos pode servir como precursor do húmus; 2) somente aqueles organismos que são capazes de utilizar, transformar e produzir fenóis são diretamente responsáveis pela síntese do húmus; 3) os blocos individuais formadores do húmus se condensam através dos radicais livres para formarem o húmus; e 4) a diferença entre os ácidos fúlvicos e os ácidos

húmicos é meramente devido ao seu grau de polimerização e não necessariamente mais alifático que os ácidos húmicos.

Com base nas diferenças de solubilidade o húmus pode ser separado em três frações principais: HUMINA (insolúvel em álcalis e ácidos), ÁCIDO FÚLVICO (solúvel em ambos) e ÁCIDO HÚMICO (insolúvel em ácido). Destas, o ácido húmico (HA) é o mais representativo, constituindo com os polissacarídeos 80% ou mais do húmus (LINHARES, 1989). A MATÉRIA ORGÂNICA LIVRE, uma fração incompletamente decomposta, é considerada fonte primária de húmus.

A reatividade das substâncias húmicas é causada pelo seu alto conteúdo de grupos funcionais contendo oxigênio, incluindo -COOH , fenólicos e/ou enólicos com grupos -OH , alcoólicos e grupos =C=O , hidroxiquinonas e cetonas não saturadas. O peso molecular varia na faixa de 50000 a 100000 para ácido húmico e na faixa de 500-2000 para ácido fúlvico.

Os ácidos húmicos apresentam propriedades similares a dos ácidos-fracos e são fortemente influenciados pelo pH do meio, e contribuem significativamente para a CTC do solos (IGUE, 1984). Na maioria dos solos agrícolas, a matéria orgânica apresenta 10 a 15% de húmus. Esta fração é de grande importância para a fertilidade e produtividade do solo, melhorando suas condições físicas químicas e biológicas (LINHARES, 1989).

Não se deve comparar aplicação do esterco ao solo com fertilizantes minerais, sem considerar os efeitos

acumulativos do esterco na fertilidade do solo e na sua condição física (WAKSMAN, 1938).

2.5. PROCESSO DE VERMICOMPOSTAGEM

Em 1881, DARWIN lançou um livro "The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habitats", que representou um grande avanço no estudo das minhocas. Neste livro é descrito pela primeira vez a influência que as minhocas exercem sobre as propriedades físicas e químicas do solo.

A matéria orgânica está sujeita a vários agentes decompositores e dependendo do tipo de resíduo é decomposta pelos microorganismos, mas muitas vezes, depende da quebra inicial pelos animais e a ação das enzimas do seu intestino. Neste caso, então, as minhocas na natureza têm um importante papel no processo inicial do ciclo da matéria orgânica (EDWARDS & LOFTY, 1977).

A matéria orgânica ingerida é macerada, misturada com material inorgânico, quando há, passa através do trato digestivo das minhocas e é excretada como coprólitos. Os coprólitos podem ser alterados quimica e fisicamente em relação ao material orgânico original, tornando-se assim mais expostos à atividade microbiana, facilitando sua decomposição (LEE, 1985), podendo inclusive diminuir o mal odor do produto final (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981).

O processo de estabilização da matéria orgânica, que resulta da ação combinada das minhocas e microflora que vive em seu trato digestivo, é conhecido como vermicompostagem GRAPELLI *et al.* (1983) citado por ALBANELL *et al.* (1988).

Noventa e nove por cento dos produtores comerciais de vermicomposto dos EUA cultivam, preferencialmente, *Eisenia foetida* (HARTENSTEIN, 1983a), conhecida vulgarmente como minhoca vermelha da Califórnia ou minhoca de esterco. Em menor escala que *E. foetida*, *Lumbricus rubellus*, é também usada na estabilização de resíduos orgânicos. Esta minhoca é vulgarmente conhecida como minhoca vermelha (PINCINCE *et al.* 1980).

Igualmente, as pesquisas em campo e em laboratório utilizam, principalmente, *Eisenia foetida*. Isto se deve a sua habilidade em converter os resíduos orgânicos, pelo seu rápido crescimento (NEUHAUSER *et al.* 1980a), e grande multiplicação (HARTENSTEIN *et al.* 1979), embora *Lumbricus terrestris* possa produzir, aproximadamente, a mesma quantidade de biomassa por unidade de tempo e espaço (HARTENSTEIN *et al.* 1981 e HARTENSTEIN & AMICO, 1983).

Lumbricus terrestris representa uma chave ecológica que faz com que se diferencie de todas as outras espécies, pela habilidade em construir galerias verticalmente e em grandes profundidades (ARTHUR, 1965 citado por HARTENSTEIN, 1983a). *Allolobophora* e *Lumbricus* são mais efetivas na incorporação da matéria orgânica em solos minerais (MITCHELL *et al.* 1982). Além disto, já foi constatado que *Lumbricus* necessita

da fração mineral do solo para extrair eficientemente os nutrientes que são ingeridos (HARTENSTEIN, 1983a). *Eisenia foetida* e *Eisenia eugeniae* são encontradas nas camadas mais superficiais do solo, onde dispõem de rico suprimento de material orgânico (MITCHELL *et al.* 1982).

Embora a compostagem de resíduos orgânicos seja uma prática antiga, a vermicompostagem foi desenvolvida de pesquisas básicas realizadas por programas de manejo de minhocas em Rothamstead em 1940 a 1950. A partir de 1970, os cientistas se engajaram no estudo do potencial das minhocas na conversão de resíduos orgânicos de diversas fontes (CHAN & GRIFFITS, 1988).

Uma das diferenças entre a compostagem convencional e a vermiestabilização é que a temperatura acima de 35°C deve ser evitada e as minhocas devem ser introduzidas posteriormente a esta temperatura (MITCHELL, 1979 citado por HAIMI & HUHTA, 1986). Por outro lado, para evitar elevadas temperaturas, a espessura da massa do resíduo e igualmente o tempo do processo devem ser reduzidos (HAIMI & HUHTA, 1986). Embora a opção da aplicação da vermiestabilização como uma fase secundária, após a termofílica, possa comprometer o valor nutricional do resíduo, para utilização posterior pelas minhocas (HARTENSTEIN *et al.* 1979).

A falta de informação básica dos requerimentos da dieta de *E. foetida* e de outras espécies é talvez a grande dificuldade do uso amplo destes animais na conversão de resíduos (HARTENSTEIN, 1981).

Misturas de proporções de ácidos graxos, carboidratos e proteínas com quantidades de vitaminas e minerais, mostrados no Quadro 01, consideradas como requerimento adequado para QUADRO 01. Análise de *Eisenia foetida*.

COMPONENTE		CONCENTRAÇÃO (%)		COMPONENTE		CONCENTRAÇÃO (mg/kg)	
Cinzas	8,0**, 5,0*			Niacina		656,0**	
Proteínas	65,0*			Riboflavina		157,0**	
Carboidratos	21,0*			Ácido pantotênico		18,0**	
Ácidos graxos	9,0*			HCl-piridoxina		7,0**	
Fósforo	1,0**, 0,7*			HCl-tiamina		14,0**	
Potássio	1,0**, 0,7*			Ácido fólico		2,0**	
Cálcio	0,8*, 0,3*			Biotina		1,0**	
Enxofre	0,8**			Vitamina A		0,0**	
Magnésio	0,3**, 0,14*			Vitamina B ₁₂		4,0**	
Sódio	0,4**, 0,7*						
Alumínio	0,04**, 0,02*						
Ferro	0,05*, 0,04**						
Zinco	0,01*, 0,01**						
Cobre	0,008*, 0,001**						
Manganês	0,004*, 0,003**						

* Dados de "Producing Earthworm" por ABE *et al.*

** HARTENSTEIN *et al.* In Press.

Ambos citados por HARTENSTEIN (1981)

a dieta de *E. foetida*, não proporcionaram crescimento para as mesmas, que ao contrário morreram neste teste (NEUHAUSER *et al.* 1980 citado por HARTENSTEIN, 1981). Parece que para seu crescimento é necessário uma combinação de carboidratos (celulose), microorganismos e muitas vezes grãos de areia. Além de não suportarem condutividade elétrica acima de 8m.S cm^{-1} (FLACK & HARTENSTEIN, 1984).

Os sais solúveis tipo acetato de sódio e potássio, KCl, NaCl, NaH_2PO_4 , são letais numa concentração acima de 0,5%. Acetato de amônio proporcionou 100% de mortalidade em 0,1% (KAPLAN *et al.* 1980).

A vermicultura tem sido muito usada para conversão de resíduos de baixo valor econômico. ASTON (1984) mostrou que *Branchiura sowerbyi*, uma minhoca aquática, é capaz de obter energia a partir de celulose. A celulose é degradada durante este processo e parece que as minhocas inclusive se alimentavam das bactérias envolvidas ou dos produtos liberados pela ação microbiana.

O sucesso na conversão de um resíduo em material vivo requer uma quantidade adequada deste material, numa proporção ideal de todos elementos e moléculas necessárias para o crescimento dos macro e microorganismos. Os macro-microorganismos vão reter os elementos e moléculas numa taxa que forneça suficiente energia para que possibilite crescimento e a reprodução destes (HARTENSTEIN, 1981).

O resíduo para ser estabilizado deve ter adequada biomassa de minhocas, o suficiente para efetivo

processamento. E naquele tempo, espaço e custos requeridos para a vermiestabilização, deve competir economicamente com métodos convencionais de compostagem (HAINI & HUHTA, 1986).

A qualidade do resíduo neste processo, não deve ser afetada levando-se em conta, na avaliação, que a característica final do vermicomposto vai depender da característica do material original.

Os estudos sugerem que a vermicompostagem é uma tecnologia alternativa para processamento de resíduos e com baixo consumo de energia. Os resíduos neste processo podem ser estabilizados mais rapidamente e, além disto, as minhocas, quando fornecida como alimento, são altamente eficientes para a produção de proteínas para outros animais (CHAN & GRIFFITS, 1988).

Diferentes resíduos podem ser utilizados: resíduos industriais, resíduos domésticos, resíduos animais e restos de culturas vegetais. Estudos realizados, muitas vezes, utilizam os resíduos de interesse das regiões temperadas e nas condições de temperatura e umidade destas regiões. Muitas informações, ainda precisam ser geradas a nível de clima tropical, para elucidar melhor o comportamento das minhocas nestas condições.

2.5.1. Comparação entre compostagem convencional e vermicompostagem, baseado na alteração da composição química de diversos resíduos:

2.5.1.a. Lodo de esgoto

Sabe-se muito sobre vermicompostagem a partir de lodo de esgoto, portanto, faz-se justos comentários sobre algumas informações geradas de experiências realizadas com este resíduo.

O lodo de esgoto é produzido pelo tratamento das águas onde desembocam resíduos produzidos pelo homem e apresentam 40 a 60% de matéria orgânica (CARVALHO, 1982).

A aplicação ao solo de lodo de esgoto como fertilizante e/ou condicionador do solo, pode ser um método alternativo para se dispor deste resíduo, podendo minimizar os problemas econômicos e ecológicos causados, atualmente, por seu manejo. Para isto, tem se tornado importante compreender os processos de decomposição, estabilização, a disponibilidade de metais pesados e a produção de odores deste resíduo para estabelecimento efetivo do seu manejo.

Acredita-se que atualmente os rios Tietê e Pinheiros (SP) são formados por 2/3 de água e 1/3 de esgotos (CARVALHO, 1982). Com o tratamento dos esgotos gerados em São Paulo e cidades circunvizinhas podem ser produzidos cerca de 600 toneladas diárias de lodo de esgoto, rico em matéria orgânica, macro e micronutrientes (BETTIOL, 1982).

Quando *E. foetida* se alimenta de lodo ativado, ingere aproximadamente 25% do peso de seu próprio corpo (HARTENSTEIN *et al.* 1981), embora nem sempre possa consumir todo lodo disponível. Quando os coprólitos começam a ser produzidos podem entrar em contato com aquele material não digerido e segundo KAPLAN *et al.* (1980) os coprólitos são altamente tóxicos para *E. foetida*.

Segundo HARTENSTEIN *et al.* (1979) citados por HAIMI & HUHTA (1987) os coprólitos de *Eisenia foetida* são cobertos por uma membrana que previne a volatilização de substâncias tóxicas e a perda de água. Em contrapartida, os coprólitos têm elevada relação superfície:volume em comparação com o lodo não digerido, favorecendo a aeração e evaporação (HAIMI & HUHTA, 1987).

Nos Estados Unidos a redução e estabilização dos resíduos orgânicos das águas residuais produz anualmente cerca de 6 milhões de tonelada de lodo seco (HARRINGTON, 1978 citado por MITCHELL *et al.* 1980).

Os invertebrados afetam grandemente a decomposição do lodo, e especialmente, os Oligochaetas (*Eisenia foetida*) têm sido usados no manejo do lodo podendo alterar suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornando-os disponível para o uso (MITCHELL *et al.* 1980).

O lodo de esgoto fresco passa por processos anaeróbicos. Já na fase aeróbica os microorganismos que morreram na fase anterior e seus produtos metabólicos ficam sujeitos a putrefação (DAIGGER & GRADD, 1977 citados por

MITCHELL *et al.* 1982). *Eisenia foetida* é capaz de assimilar estes constituintes. O carbono assimilado pode ser usado tanto para aumento da biomassa, com a vantagem de que esta fração orgânica lábil do lodo estaria concentrado em proteína e além disto proporcionaria aceleração adicional da decomposição do lodo, como este carbono poderia ser usado na respiração das minhocas, o que contribuiria para o metabolismo total (MITCHELL, 1979 e MITCHELL *et al.* 1982).

O papel de *Eisenia foetida* em acelerar o processo de decomposição de lodo de esgoto tem sido muito discutido e as informações têm sido geradas em laboratório e em campo. Diferentes parâmetros são adotados para tal avaliação.

Segundo NEUHAUSER *et al.* (1980b) *Eisenia foetida* não pode crescer tão rapidamente em esterco de boi ou de cavalo como no lodo onde seu crescimento é 1,5 vezes maior. Embora em estercos seja capaz de maior multiplicação.

HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) demonstraram que *E. foetida* proporcionou um aumento adicional de 1,3 vezes na taxa de mineralização do lodo, comparado com aquele sem a minhoca.

MITCHELL *et al.* (1980) demonstraram que o potencial de *Eisenia foetida* em acelerar a decomposição e estabilização do lodo de esgoto, doméstico e industrial estava diretamente ligado ao potencial de oxi-redução que deve ser acima de 100 mV e abaixo de 250 mV (KAFLAN *et al.* 1980) e ao conteúdo de umidade, que deve ser abaixo de 375%. No sistema com predominância da decomposição aeróbica (60%) a minhoca teve

uma forte influência. Em outro sistema, inicialmente, anaeróbico, a influência só foi mostrada quando houve predominância da decomposição aeróbica (MITCHELL *et al.* 1980).

A decomposição aeróbica pode ser estimulada por *E. foetida* pelo aumento da área superficial dos lodos ingerido, facilitando a penetração do oxigênio e favorecendo o crescimento microbiano (MITCHELL, 1979), e este efeito não se opera em condições anaeróbicas (MITCHELL *et al.* 1980).

Em um experimento com 49 dias a 15°C, MITCHELL *et al.* (1982) avaliaram a decomposição da matéria orgânica do solo com resíduo de esgoto doméstico e observaram que o conteúdo da matéria orgânica da camada de 0 a 3 cm do microcosmos foi significativamente menor quando *E. foetida* estava presente.

HAMILTON *et al.* (1988) constataram a alteração referida anteriormente, embora provocada por *Lumbricus terrestris* e não por *Eisenia foetida*.

Nenhum outro animal capaz de passar grandes quantidades de solo através de seu trato digestivo se encontra presente em significativo número ou biomassa abaixo de poucos centímetros do solo como a minhoca. E como esta se alimenta do resíduo de esgoto misturado com o solo, a compostagem representa um caminho natural (BRENNAN & HARTENSTEIN, 1984).

Segundo HAMILTON *et al.* (1988) *Eisenia foetida* promove maior estabilidade dos agregados do solo misturado com o resíduo de esgoto, com tamanho das partículas entre 0,5 e

10,0 mm de diâmetro, comparado com *Lumbricus terrestris* que atingiu 4,0 mm de diâmetro.

Embora muito discutido que a minhoca (*Eisenia foetida*) seja capaz de acelerar a mineralização da matéria orgânica, HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) mostraram que neste processo cerca de 2% dos minerais disponíveis, inclusive metais pesados, são assimilados em seus tecidos durante a multiplicação. Este acúmulo de metais pesados nos tecidos é interessante do ponto de vista ambiental, diminuindo a poluição ambiental, por outro lado pode limitar o valor nutricional das minhocas como fonte alimentícia para peixes e outros animais (HARTENSTEIN, 1983a).

Uma perda adicional de N por um fator de 1,8 ocorreu em lodo com minhocas (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981). Igualmente HAIMI & HUHTA (1987) constataram redução no N total e amônio no vermicomposto.

HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) usaram os ácidos nucleicos como índice de biomassa microbiana e observaram maior concentração destes nos coprólitos. Concluem este autores que, provavelmente, uma parcela do nitrogênio tenha sido absorvida em biomassa, durante o crescimento das minhocas, a outra parcela em biomassa microbiana; constatado pelo aumento da concentração de ácidos nucleicos e P. Isto sugere que algum N amino e inorgânico tenha se transferido para os ácidos nucleicos.

KAPLAN *et al.* (1980) estudaram os requerimentos físico-químicos do ambiente para *Eisenia foetida* e observaram que

as minhocas morriam em valores de pH < 5 ou > 9 e que o pH ótimo é em torno de 7,0.

Os resíduos orgânicos ao passarem pelo trato digestivo das minhocas sofrem um abaixamento adicional de pH constatado por vários trabalhos em diferentes combinações de resíduos (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981 e HAIMI & HUHTA, 1987).

O mais baixo pH encontrado nos coprólitos pode ser devido ao CO₂ e ácidos orgânicos produzidos durante o metabolismo microbiano, cuja atividade é estimulada pela menor relação superfície:volume dos coprólitos em comparação com o material não ingerido (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981).

Em vários experimentos repetidos HAIMI & HUHTA (1987) não encontraram nenhuma diferença entre os materiais testados com ou sem minhocas na produção de CO₂. Apenas, no 5º e 15º dia observaram um aumento da evolução de CO₂ que foi nivelado nos dias subsequentes.

Uma fração responsável pelo abaixamento do pH pode ser devido a maior produção dos ácidos húmicos e fúlvicos no vermicomposto (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981). Embora nos testes realizados por PUSSARD *et al.* (1988) não tenha sido observado a maior produção de substâncias húmicas no vermicomposto.

Se o pH inicial do resíduo a ser vermicompostado já for baixo, o decréscimo induzido pelas minhocas pode não favorecer a qualidade do composto, mas o decréscimo de um

valor de pH alto pode ser importante na retenção de nitrogênio, visto que o amônio em pH alto pode ser perdido por volatilização como amônia (HAIMI & HUHTA, 1987).

2.5.1.a. Estercos em geral

De acordo com HARTENSTEIN (1981) os esterco contendo urina são extremamente tóxicos para as minhocas. No entanto, após os componentes iônicos serem assimilados pelos microorganismos, são adequada fonte de alimento para *E. foetida*. Esta toxidez pode ser devido a elevada condutividade eletrolítica, cerca de 15 mmhos, em esterco com urina (HARTENSTEIN, 1981 e KAPLAN *et al.* 1980) e 2,0 a 4,0 mmhos segundo HARTENSTEIN (1981) e 1,5 a 3,0 mmhos segundo KAPLAN *et al.* (1980) em esterco não contaminados por urina.

Segundo CHAN & GRIFFITS (1988) *Eisenia foetida* não cresce diretamente em esterco de porco sem um pré-tratamento. O autor recomenda a adição de 4% de sulfato de cálcio para controlar a amônia e após dois dias, nove lavagens do esterco para eliminar os sais da urina.

Após a compostagem do esterco de porco pré-tratado, CHAN & GRIFFITS (1988) demonstraram que aquele processado por *E. foetida* mostrava conteúdo de húmus 40 a 60% maior e um decréscimo de 7,8% da matéria orgânica no esterco vermicompostado comparado com a compostagem convencional.

ALBANELL *et al.* (1988) analisaram a mistura de esterco de carneiro e flocos de algodão (3:1) durante a vermicompostagem num espaço de tempo de três meses. As pilhas tinham 6m de comprimento, 0,6 m de largura e 0,4 m de altura; com e sem *Eisenia foetida*, com aproximadamente 3000/m² incluindo ovos, larvas e adultos. As amostras eram recolhidas a cada duas semanas. No final da avaliação, concluíram nas misturas com minhocas ocorria maiores perdas de matéria orgânica e C oxidável, produzindo uma redução na relação C/N. Além disto, as minhocas foram capazes de acelerar o processo de humificação, constatado pelo aumento do conteúdo dos ácidos húmicos. As minhocas contribuindo para a biotransformação das substâncias orgânicas em compostos húmicos estáveis, reflete na CTC (meq/100g) que foi maior nos coprólitos que nos materiais orgânicos.

A vermicompostagem com chorume tem sido investigada. HAND *et al.* (1988) misturaram o chorume com turfa e resíduo de papel neutralizado com carbonato de cálcio. A turfa sozinha não foi capaz de promover nutrientes suficientes para crescimento de *E. foetida*, mas a mistura de chorume com resíduo de papel produziu grande crescimento de minhocas e produção de casulos por unidade de chorume consumido.

Embora as minhocas possam acelerar a taxa de mineralização do material orgânico, constatado pelo aumento de fósforo assimilável, Na⁺ e K⁺ (ALBANELL *et al.* 1988), CHAN & GRIFFITS (1988) demonstraram que de modo geral há assimilação de 1,5% do que foi ingerido pelas minhocas.

ALBANELL *et al.* (1988) igualmente observaram queda do nitrogênio nos coprólitos em comparação com aquele material não digerido, postulam baseado nas especulações de HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) que tenha ocorrido incorporação de N nos tecidos das minhocas como proteínas, similar ao que ocorre em lodos de resíduos industriais e domésticos.

HAND *et al.* (1988) afirmaram que a mineralização do chorume foi maior na presença das minhocas e o N foi retido na forma de nitrato.

NEEDHAM (1957) demonstrou que similar conteúdo de N orgânico assimilado pelas minhocas é excretado, provavelmente, como mucoproteína e uma grande porcentagem como uréia e amônia.

HAND *et al.* (1988) não constatarem aumento do nível de N-amônio na presença das minhocas, mas sim de N-nitrato, pode ser que o N-amônio excretado tenha sido rapidamente convertido a nitrato.

HARTENSTEIN (1981) afirmou diante de observações em laboratório que esterco não habitados por *E. foetida* favorecem a rápida proliferação dos fungos e que se alimentam do esterco somente, quando protozoários, que estavam encistados proliferavam novamente, sugerindo que necessitam destes microorganismos em sua dieta.

Por outro lado, HARTENSTEIN (1981) em outras observações constata que certos microorganismos e seus produtos metabólicos podem ser tóxicos para as minhocas e

que se alimentariam de tipos particulares de microorganismos, selecionando, inclusive, favoravelmente aqueles que são responsáveis pela transformação das substâncias orgânicas (GRAPELLI *et al.* 1983 citados por ALBANELL *et al.* 1988).

3. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REPRODUTIVA DE OLIGOCHAETA EM
ESTERCO BOVINO E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADO COM
BACTÉRIA FIXADORA DE N₂ (*Acetobacter diazotrophicus*)

3.1. RESUMO

Avaliou-se a capacidade reprodutiva de minhocas adultas, previamente introduzidas em vasos de 4,5 litros, usando como substrato esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, picado, nas seguintes proporções, p/p: 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0. As misturas foram feitas com base em peso seco de substrato num total de 0,5 kg. Esse experimento foi realizado no período de fevereiro a maio de 1989. Num segundo experimento em vasos de 1 litro usou-se esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, moído, com as proporções, v/v: 1:3 e 1:1, selecionadas do primeiro experimento. As misturas foram feitas com base em volume num total de 800 ml. Esse experimento foi realizado de fevereiro a abril de 1990. Todos os tratamentos foram realizados com e sem inoculação de *Acetobacter*

diazotrophicus. Os experimentos foram realizados em galpão coberto da EMBRAPA/CNPBS - Seropédica, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Com exceção da proporção esterco/bagaço 0:1 todas as misturas proporcionaram condições à reprodução das minhocas. O maior número de indivíduos, cerca de 150, foi encontrado em 1:1 e 3:1 e a maior sobrevivência dos adultos ocorreu em 1:3 com bagaço picado. Nos vasos com bagaço moído não se constatou nenhuma mortalidade dentro do período investigado. Em ambos os experimentos não houve diferença estatística entre os tratamentos inoculados e não inoculados com *A. diazotrophicus* quanto à multiplicação das minhocas.

3.2. - INTRODUÇÃO

A utilização das minhocas na conversão do bagaço de cana-de-açúcar e esterco bovino numa forma mais estabilizada e a possível utilização destas minhocas, que representam um sub-produto rico em proteína (SCHULZ & GRAFF, 1977), na alimentação de outros animais, requer maiores conhecimentos a cerca de sua capacidade de reprodução no resíduo orgânico que se tem disponível.

A capacidade reprodutiva de Oligochaeta varia entre espécies e dentro da mesma espécie pode variar, dentre outros fatores, com as condições ambientais e com a disponibilidade do substrato orgânico (NEUHAUSER *et al.* 1979; KALE *et al.* 1982; HAND *et al.* 1988; GRAFF, 1974; REINECKE & VILJOEN, 1990).

Vários trabalhos indicam o aumento da taxa de transformação de resíduos orgânicos como palha de trigo pelo aumento do conteúdo de N proveniente da inoculação de microorganismos fixadores de N_2 (HILL & PATRIQUIN, 1988).

O presente trabalho teve como objetivos: verificar a multiplicação do Oligochaeta em diferentes misturas de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar e avaliar os possíveis efeitos do aumento de N com a inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* nestas misturas, na atividade reprodutiva do Oligochaeta.

3.3. - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em galpão coberto da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo - Seropédica, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

3.3.1 - Substrato.

O bagaço de cana-de-açúcar, procedente de pequeno comércio de caldo para consumo de bebida fresca e localizado nas imediações da EMBRAPA/CNPBS foi picado, em picadeira para forragens, em pedaços de aproximadamente 4 cm de tamanho para ser utilizado no experimento I e foi moído em moinho para ser utilizado no experimento II.

O esterco bovino, procedente de rebanho leiteiro da PESAGRO-RIO, criado em regime semi-extensivo utilizando pasto de digitarias e com complementação alimentar no cocho (silagem de sorgo e sais minerais), foi recolhido fresco e cerca de 20 dias após o seu recolhimento, quando a temperatura já se encontrava estabilizada, foi utilizado nos experimentos.

3.3.2 - Delineamento experimental.

O experimento I foi split plot em blocos ao acaso, num fatorial de $2 \times 2 \times 5$, coletas na sub-parcela, com e sem inoculação da bactéria fixadora de N_2 , nas seguintes

proporções de esterco/bagaço: 0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0 (p/p). As misturas foram feitas com base em peso seco num total de 0,5 kg e acondicionadas em vasos com capacidade de 4,5 litros.

O experimento II foi realizado em blocos ao acaso, num fatorial de 2x2x3, com e sem inoculação da bactéria fixadora de N_2 , nas seguintes proporções de esterco/bagaço: 1:1 e 1:3 (v/v). As misturas foram feitas com base em volume, num total de 800 ml. Três coletas foram realizadas.

Ambos experimentos foram realizados com 3 repetições.

O experimento I, desenvolvido de fevereiro a maio de 1989, visou a seleção da(s) mistura(s) que proporcionasse(m) melhores condições de reprodução para as minhocas e representassem, ao mesmo tempo, mais baixo custo. O experimento II, desenvolvido de fevereiro a abril de 1990 visou a utilização das misturas selecionadas para avaliar a influência do bagaço moído na atividade reprodutiva das minhocas. Segundo NEUHAUSER *et al.* (1980b) menores partículas de alimento proporcionam maior taxa de crescimento das minhocas.

Os vasos foram irrigados quando visualmente necessário e constatou-se nas amostragens realizadas, cerca de 75% de umidade a 30°C. Segundo REINECKE & VENTER (1987) este teor de umidade é favorável ao crescimento e reprodução de *Eisenia foetida*.

3.3.3. - Oligochaeta.

Cinco minhocas adultas foram inoculadas por vaso em ambos os experimentos. Estas foram recebidas como vermelha-da-Califórnia, apresentando através da morfologia externa, características comuns à *Eisenia* e *Lumbricus*. As minhocas do experimento I foram coletadas de vermicultura localizada em Resende-RJ, e do experimento II de vermicultura localizada em Itaguaí-RJ (EMBRAPA/CNPBS).

A avaliação da multiplicação das minhocas nos substratos foi realizada aos 60 e 120 dias do experimento I e aos 21, 46 e 86 dias do experimento II, através da contagem manual das minhocas jovens e adultas e dos casulos produzidos.

3.3.4. - Inóculo da bactéria fixadora de N_2 (*Acetobacter diazotrophicus*)

A bactéria fixadora de N_2 , isolada e identificada como *Acetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988; GILLIS *et al* 1989) foi isolada de colmo, folhas, raízes e restos culturais de cana-de-açúcar, estirpe PAL 3 - Alagoas (DOBEREINER *et al.* 1988) e obtida da coleção de culturas da EMBRAPA/CNPBS.

A bactéria anteriormente liofilizada cresceu em meio batata (DOBEREINER, 1980) suplementado com 10% de açúcar cristal, sem malato, por 3 dias em agitador horizontal.

Posteriormente, o meio de cultura, contendo as bactérias, foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm (912,5 g, r = 51,25 mm). Após centrifugação substituiu-se o meio anterior pelos sais de LGI- P (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988) sem fonte carbonada e nitrogenada, para que a bactéria utilizasse estas fontes do meio em que foi inoculada. Nos tratamentos com bactérias, foram adicionados 5 ml de inóculo por vaso no experimento I; para o experimento II usou-se 1 ml de inóculo por vaso, na implantação e igual volume aos 50 dias após a sua implantação. O inóculo usado no experimento II continha $2,97 \times 10^7$ células/ml e $5,0 \times 10^8$ células/ml respectivamente, na primeira e segunda aplicação. As células foram contadas em câmara de "Petroff Hauser".

3.4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

Como observado pelo QUADRO 1.1, as cinco minhocas introduzidas nos vasos contendo apenas bagaço de cana-de-açúcar picado não sobreviveram neste substrato. Ao contrário, repeliram-no imediatamente e aquelas que persistiram morreram em poucas horas. Esta observação está em concordância com NEUHAUSER *et al.* (1980b) que constatarem, com relação à *Eisenia foetida*, a impossibilidade desta extrair nutrientes de celulose e similares, quando presentes, exclusivamente.

QUADRO 1.1. Médias para os 5 substratos, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados e as 2 épocas de amostragens, Experimento I^(*).

Substrato: Relação esterco/bagaço	Nº de minhocas ^(*)		Casulos
	Adultas	Jovens	
p/p			
0:1	0,0 c	0,0 d	0,0 c
1:3	4,7 a	43,8 b	33,0 b
1:1	4,0 a	93,2 a	70,0 a
3:1	3,8 a	85,5 a	57,0 ab
1:0	2,1 b	9,3 c	0,8 c
CV (%)	21,7	27,8	35,0

- (1) A análise de variância foi realizada a partir dos dados transformados por raiz quadrada de $X + 1$, sendo apresentado neste quadro os dados originais.
- (2) Médias acompanhadas de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

O QUADRO 1.1 nos indica a média do número de minhocas e de casulos produzidos nos diferentes substratos, independente da amostragem. Embora muitos pesquisadores desconsiderem esta média e de fato com certa razão, por se tratar de parâmetro biológico, é interessante ressaltar a diferença existente entre os substratos, dada por estas médias.

As proporções intermediárias de esterco e bagaço 1:1 e 3:1 não diferiram entre si quanto ao número médio de minhocas-jovens e nem quanto ao número médio de minhocas adultas.

No entanto o substrato 1:1 produziu mais casulos que os demais substratos.

A qualidade do esterco varia consideravelmente com o regime alimentar do bovino (WAKSMAN, 1938) dificultando, algumas vezes, comparações entre resultados de outros experimentos. Mas, de maneira geral, o esterco bovino é considerado excelente fonte de alimento para *E. foetida*, dentre outras espécies (REINECKE & VILJOEN, 1990).

Verificou-se aos 60 dias do experimento I baixo número médio de minhocas adultas em esterco bovino puro em comparação com as misturas contendo bagaço (Figura 1.1 e 1.2). No entanto foi observado que dos seis vasos contendo este substrato, incluindo os tratamentos com e sem inoculação de *A. diazotrophicus*, cinco desses continham as cinco minhocas previamente introduzidas e em apenas um destes vasos não foi encontrado nenhuma minhoca adulta, o

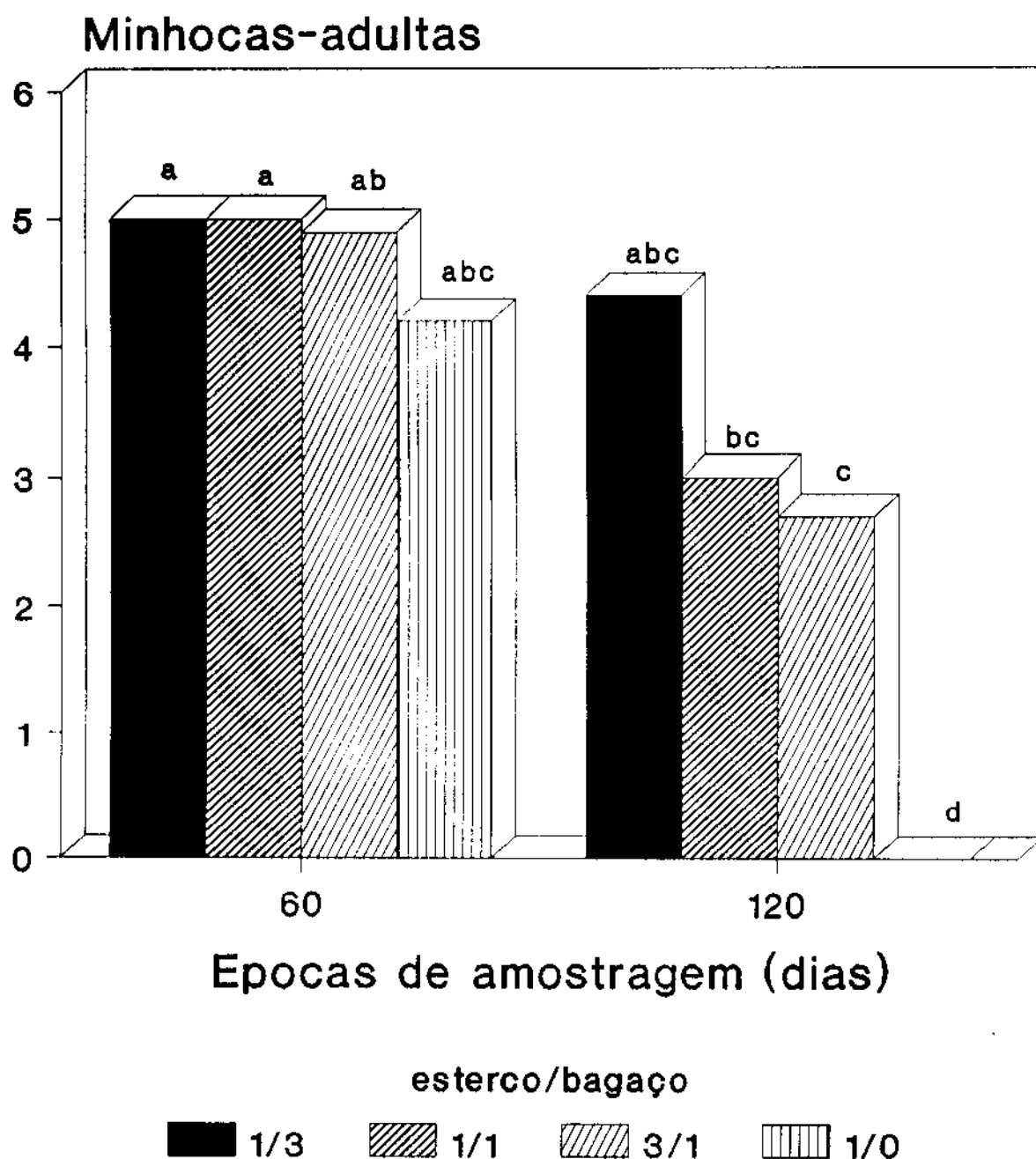


Figura 1.1 Número de minhocas adultas e vivas das misturas de esterco/bagaço de 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento I. Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

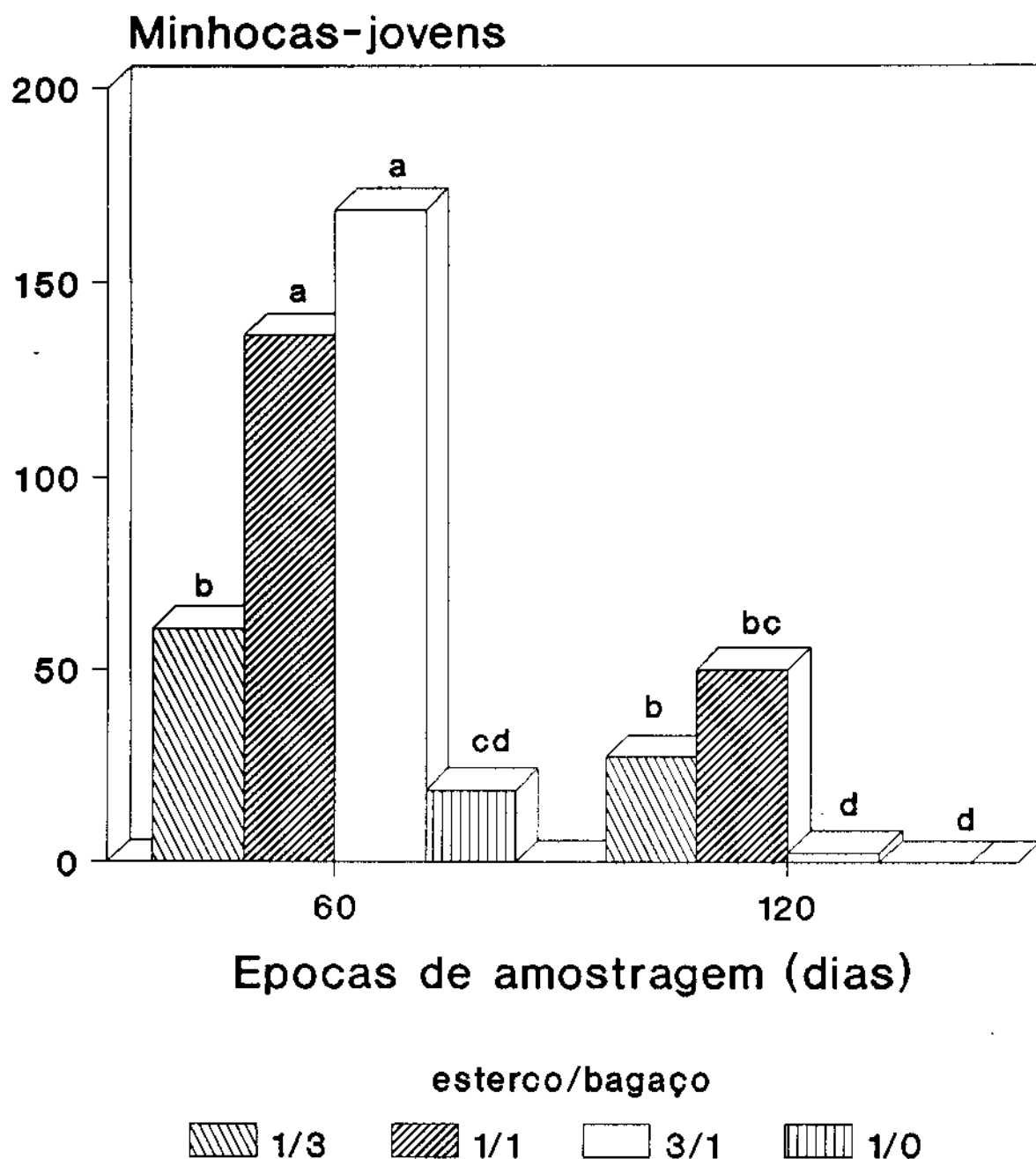


Figura 1.2 Número de minhocas-jovens produzidas das misturas de esterco/bagaço: 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento I. Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

que causou uma redução na média final do número de minhocas observadas (Figura 1.1). A produção de minhocas-jovens por estas adultas foi mais baixa que nas outras misturas contendo bagaço (Figura 1.1 e Figura 1.2).

A preferência das minhocas pelo substrato contendo bagaço se deve, possivelmente, como sugerido por FLACK & HARTENSTEIN (1984) para *E. foetida*, à preferência por celulose na sua dieta, uma vez que já foi constatada, inclusive, atividade celulásica no seu trato digestivo (HARTENSTEIN, 1982 e LOQUET & VINCESLAS, 1987). Além disto, utiliza mais eficientemente os nutrientes do substrato na presença de celulose, baseado na experimentação de HARTENSTEIN (1983b) que encontrou em lodo de esgoto com 5% de N a mesma produção de biomassa que quando celulose foi misturada e o N reduzido para 1,2%, sugerindo que *E. foetida* possa extrair quantidade considerável de energia a partir de celulose e remover seletivamente uma grande proporção de microorganismos do ambiente celulósico.

BOWNAM & REINECKE (1991) igualmente constataram que *E. foetida* reduziu seu crescimento na ausência de celulose. Assume-se que celulose realmente tenha importante papel em sustentar seu crescimento uma vez que esta vive em planta em decomposição.

Deve ser levado em consideração, também, que o bagaço de cana-de-açúcar picado quando misturado ao esterco favorece a circulação de água e a aeração do ambiente, possibilitando melhor atividade das minhocas que são

extremamente dependentes destes fatores (KAISERLAUTERN, 1985).

Por outro lado, considerando-se os aspectos citados anteriormente, pode ser que antes do 60º dia, quando ocorreu a amostragem, tenha ocorrido uma situação diferente da que foi apresentada nesta amostragem a qual, no entanto, pode não ter sido detectada, pois não foi planejada amostragem anterior para tal verificação.

A mortalidade de 100% das minhocas adultas (Figura 1.1) e jovens (Figura 1.2) em esterco puro, constatada aos 120 dias, pode ser mais facilmente compreendida pelo fato de que nesta época o esterco já estava estabilizado e como as minhocas não praticam coprofagismo (KAPLAN *et al.* 1980, citado por NEUHAUSER *et al.* 1980b) não sobreviveram neste substrato. Isto sugere que estas minhocas requeiram material orgânico que não esteja totalmente estabilizado para extraírem os nutrientes necessários à sua sobrevivência. Além disto o material orgânico estabilizado pode não dispor quantitativa e/ou qualitativamente de determinada população microbiana necessária à sua dieta (LEE, 1985).

Nas misturas testadas de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar 1:3, 1:1 e 3:1 verificou-se a reprodução das cinco minhocas previamente introduzidas nos vasos (Figuras 1.2 e 1.3). A mais elevada taxa de multiplicação, dentre as misturas testadas, avaliada aos 60 dias, ocorreu nas proporções de 1:1 e 3:1 com cerca de 150 minhocas, (Figura 1.2). Estes resultados sugerem que o esterco e o bagaço

nestas proporções tenham favorecido o desenvolvimento de microorganismos, possivelmente celulolíticos, que consequentemente tenham tornado o bagaço uma fonte alimentar mais acessível às minhocas, proporcionando maior atividade reprodutiva destas.

Aos 120 dias, as 2 proporções mencionadas apresentaram redução do número de minhocas-jovens de 65% e 99%, respectivamente (Figura 1.2) e mortalidade de cerca de 40% das minhocas adultas (Figura 1.1). Esta mortalidade pode ser explicada como uma resposta ao estresse provocado pela alta densidade populacional (KAISERLAUTERN, 1985 e NEUHAUSER *et al.* 1980b) que ocorreu nas misturas referidas, sendo também possível a redução na oferta de alimento.

A amostragem realizada aos 120 dias indica que a mistura de esterco e bagaço, picado, de 1:3 proporcionou não somente a reprodução das minhocas (Figuras 1.2 e 1.3) como também a sobrevivência de 87% das minhocas adultas que foram introduzidas inicialmente (Figura 1.1).

Experimento II

No experimento II constatou-se que aos 21 dias as minhocas já haviam produzido seus casulos (Figura 1.4). Dentre os períodos amostrados a produção máxima de casulos foi aos 21 dias para a proporção de esterco/bagaço de 1:1, resultado em concordância com os de VENTER & REINECKE (1988), e aos 46 dias para a proporção 1:3 (Figura 1.4). O

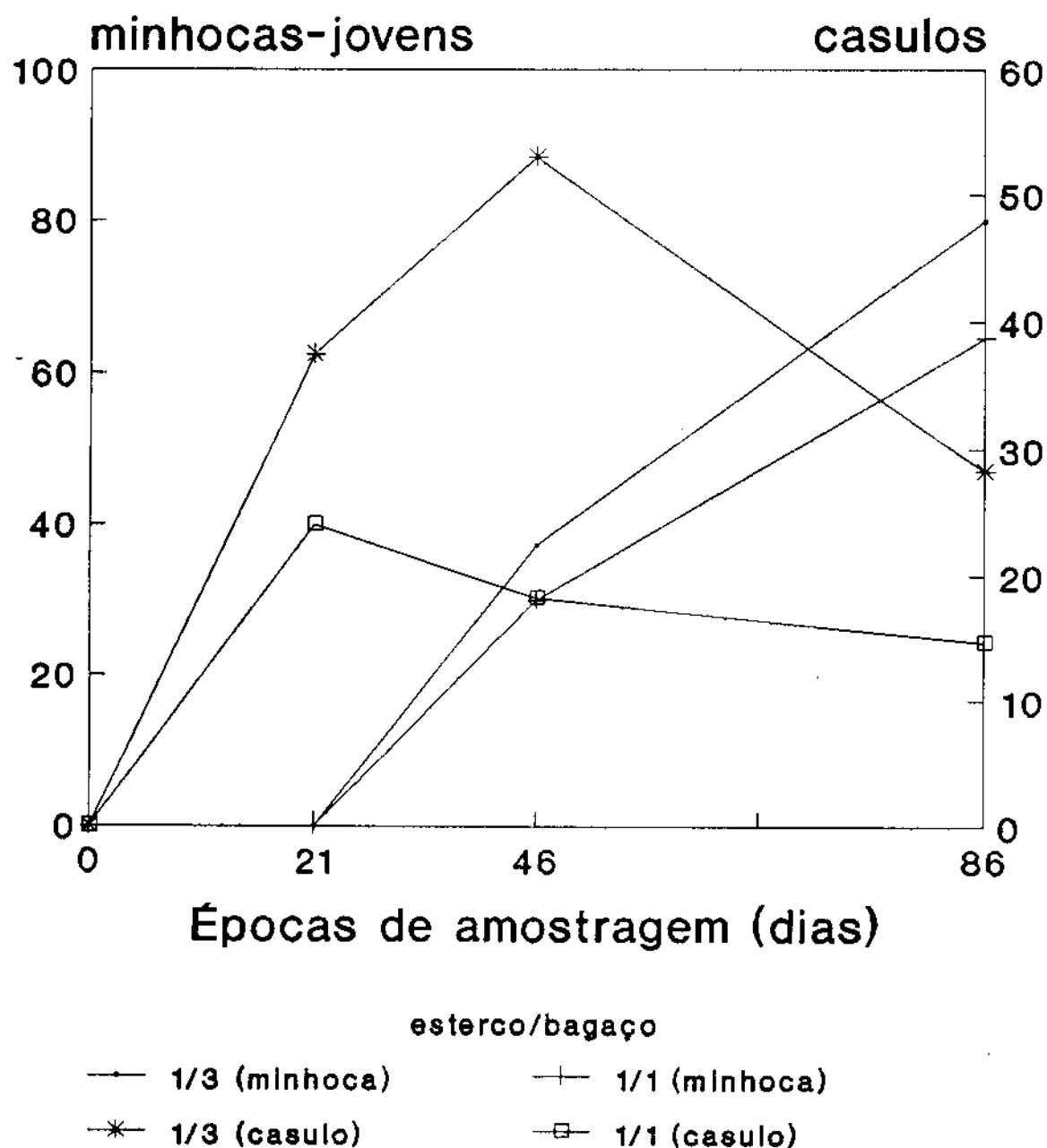


Figura 1.3 Número de minhocas-jovens e de casulos produzidos nas misturas de esterco/ bagaço: 1:3 e 1:1 (média dos tratamentos inoculados e não inoculados *Acetobacter diazotrophicus*). Experimento II. Não houve diferença significativa entre substratos e as diferentes épocas de amostragens.

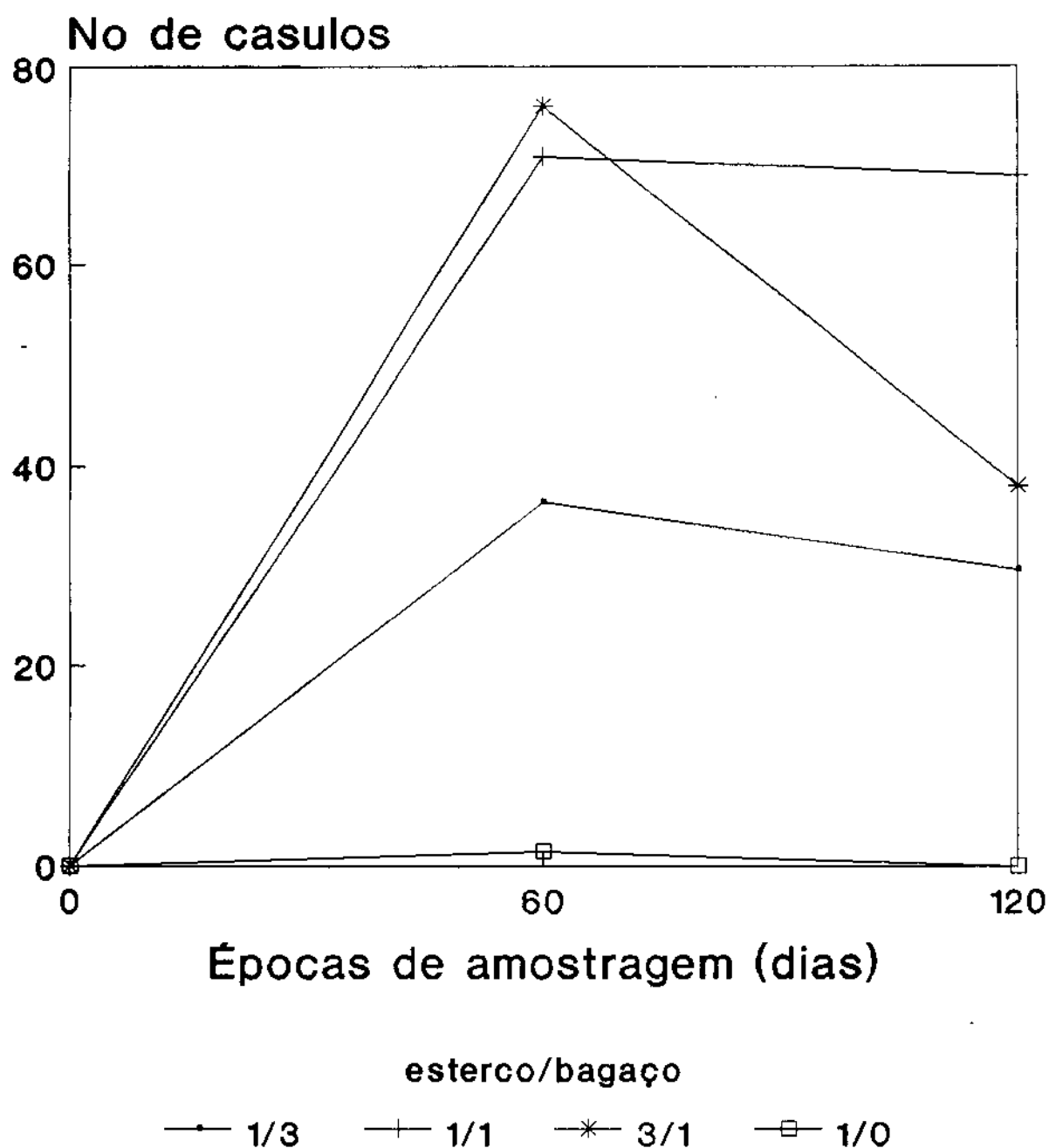


Figura 1.4 Número de casulos produzidos nas misturas de esterco/bagaço: 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento I. Não houve diferença significativa entre substratos e as diferentes épocas de amostragens.

pico na produção de casulos ocorrido em 1:1 antecedente a 1:3 pode significar estratégia para garantir a sobrevivência da espécie. Embora não tenham mencionado diretamente esta questão, HAIMI & HUHTA (1990), constataram que o solo "raw humus" não era um substrato adequado para *Lumbricus rubellus*, no entanto, esta espécie reproduziu-se prodigiosamente neste substrato.

As médias obtidas do número de minhocas-jovens produzidos aos 60 e 120 dias (Figura 1.2) indicam que no substrato 1:3, com bagaço moído, a multiplicação das minhocas foi cerca de 50% superior que em bagaço picado (Figura 1.4). Embora as amostragens do experimento I e as do experimento II tenham ocorrido em datas diferentes.

Os resultados acima não se repetiram na mistura de esterco/bagaço, moído, 1:1. Neste a multiplicação das minhocas foi 30% inferior à obtida na mistura com bagaço picado.

O tamanho das partículas do resíduo utilizado como alimento é importante na nutrição das minhocas, e segundo NEUHAUSER *et al.* (1980b), *Eisenia foetida* aumenta de peso com o decréscimo do tamanho das partículas de alimento. Possivelmente, a maior área específica da menor partícula possibilita maior acessibilidade aos microorganismos, e conseqüentemente torna-se um suprimento alimentar potencialmente maior para as minhocas. Logo, era de se esperar que o bagaço moído utilizado no experimento II

proporcionasse maior atividade das minhocas e fornecesse melhores condições de reprodução.

Possivelmente no experimento I a proporção 1:1 mostrou-se favorecida, no tocante à sua aeração, pelas maiores dimensões do bagaço (picado), quando confrontada com a mesma proporção no experimento II. Além disso, as condições de drenagem eram diferentes, pois os vasos no experimento II não eram dotados de dreno. Ao serem comparados os substratos 1:3 e 1:1 no experimento II, verificou-se a ocorrência de mistura mais compactada na proporção 1:1. Assim, a oferta aparentemente maior de alimento, representada pela maior quantidade de esterco em 1:1, foi possivelmente contrabalançada pela condição de aeração menos adequada ao crescimento de organismos aeróbicos.

Embora não tenha ocorrido diferença estatística entre os substratos e as diferentes épocas amostradas quanto a produção de minhocas-jovens e casulos no experimento II, ao se avaliar a média geral verifica-se que o substrato 1:3 produziu significativamente mais casulos e mais minhocas que o substrato 1:1, independentemente da amostragem.

Independentemente do substrato, a média de casulos produzidos em cada época amostrada indica que ocorreu significativamente menor produção de casulos aos 86 dias, de acordo com o teste de Duncan. Apesar da significância estatística deste parâmetro de acordo com o valor de F, o teste de Tukey desconsidera as diferenças destas médias.

Embora o número de minhocas e casulos produzidos nos experimentos I e II não tenham diferido significativamente nos tratamentos com e sem inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* (QUADROS 1.2 e 1.3), verifica-se tendência da inoculação afetar negativamente a multiplicação das minhocas, especialmente nas misturas constituídas de bagaço picado.

Este efeito é mais marcante na quantidade de casulos produzidos, especialmente no substrato com proporção 1:3, tanto aos 60 como aos 120 dias (QUADRO 1.2) onde se verifica redução superior a 60% a quantidade de minhocas produzidas no tratamento não inoculado. Entretanto, quanto ao número de minhocas jovens e adultas esta tendência não é consistente, ocorrendo inclusive inversão da mesma.

As razões para tal efeito são de difícil estabelecimento e poderiam estar ligadas à concorrência estabelecida entre a população microbiana espontânea e a bactéria inoculada; e quando o substrato era constituído por maiores proporções de esterco, ocorreria maior diversidade/quantidade de outros componentes da biota e o efeito da inoculação seria menor.

QUADRO 1.2 Número de minhocas adultas que se mantiveram vivas após serem introduzidas em substrato com diferentes proporções de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, picado, e número de minhocas jovens e de casulos produzidos a partir das minhocas adultas introduzidas, inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* (média de 3 repetições). Experimento I.

Substrato	épocas de amostragem ⁽¹⁾							
	Nº de minhocas							
Relação esterco/ bagaço	Adultas				Jovens			
	60 dias		120 dias		60 dias		120 dias	
p/p	i ⁽²⁾	ni	i	ni	i	ni	i	ni
0:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1:3	5,0	5,0	4,7	4,0	47,7	73,3	25,3	29,0
1:1	5,0	5,0	3,0	3,0	113,3	159,3	54,3	45,7
3:1	4,7	5,0	3,3	2,3	142,7	194,3	2,0	3,0
1:0	5,0	3,3	0,0	0,0	31,0	6,0	0,0	0,0
Média ⁽³⁾	3,6a		2,4b		76,8a		15,9b	

Substrato	épocas de amostragem ⁽¹⁾			
	Nº de casulos			
Relação esterco/ bagaço	60 dias		120 dias	
	i ⁽²⁾	ni	i	ni
0:1	0,0	0,0	0,0	0,0
1:3	16,7	56,0	14,7	44,7
1:1	61,0	80,7	66,0	72,0
3:1	84,0	68,0	20,0	56,0
1:0	3,0	0,0	0,0	0,0
Média ⁽³⁾	37,0a		21,9a	

- (1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.
 (2) Médias acompanhadas de mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.
 (3) Comparação estatística do efeito dos substratos em cada época de amostragem, vide Figura 1.1 para minhocas adultas, 1.2 para minhocas jovens e 1.3 para casulos.

QUADRO 1.3 Número de minhocas-jovens e de casulos produzidos em substrato com esterco e bagaço de cana-de-açúcar, moído, inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, a partir das 5 minhocas adultas previamente introduzidas nos vasos (média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:	épocas de amostragem ⁽¹⁾							
Relação	Nº de minhocas-jovens ⁽²⁾							
esterco/bagaço	21 dias		46 dias		86 dias		Média ⁽³⁾	
v/v	i ⁽⁴⁾	ni	i	ni	i	ni		
1/3	0,0	0,0	39,3	35,3	74,3	85,3	39,0A	
1/1	0,0	0,0	34,0	26,0	56,3	72,7	31,5B	
Média ⁽⁴⁾	0,0c		37,7b		72,5a			

Substrato:	épocas de amostragem ⁽¹⁾							
Relação	Nº de casulos							
esterco/bagaço	21 dias		46 dias		86 dias		Média	
v/v	i ⁽²⁾	ni	i	ni	i	ni		
1/3	24,3	50,7	64,0	42,0	22,3	34,3	39,6A	
1/1	26,3	21,7	22,0	14,3	14,8	14,3	18,9B	
Média ⁽⁴⁾	30,8a		35,6a		21,4b			

- (1) As 5 minhocas adultas previamente introduzidas nos vasos permaneceram vivas até o final da observação.
- (2) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.
- (3) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.
- (4) Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.
- (5) Comparação estatística do efeito dos substratos em cada época de amostragem vide Figura 1.4.

3.5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que se desenvolveu o presente trabalho foi possível concluir que:

As minhocas repeliram o bagaço de cana-de-açúcar fresco, quando presente sem esterco bovino. No entanto, as proporções de esterco e bagaço de 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 permitiram a multiplicação das minhocas.

As misturas esterco e bagaço 1:3, 1:1 e 3:1 permitiram que a sobrevivência e a reprodução das minhocas se estendessem por período maior que em esterco puro (1:0).

As misturas com bagaço picado proporcionaram melhores condições de reprodução para as minhocas, comparadas com as misturas com bagaço moído. Dentre as misturas testadas, as proporções esterco/bagaço, picado, de 1:1 e 3:1 proporcionaram maior atividade reprodutiva, constatada pelo número de minhocas, cerca de 150, aos 60 dias. Esta alta densidade populacional, provocou possivelmente estresse das minhocas, que resultou na alta mortalidade das minhocas, observada aos 120 dias.

Nas misturas contendo bagaço picado as minhocas adultas decresceram em número ao longo do tempo. O substrato 1:3 possibilitou a maior sobrevivência destas em relação aos demais substratos. O que é bastante interessante para aquele que visa a vermicompostagem.

A inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* não influenciou consistentemente na atividade reprodutiva das minhocas.

O teste de Duncan foi mais adequado para a separação de médias na avaliação da multiplicação das minhocas que o teste de Tukey.

4. CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO VERMICOMPOSTO DE ESTERCO BOVINO E
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADO COM BACTÉRIA FIXADORA DE
N₂ (*Acetobacter diazotrophicus*)

4.1. RESUMO

Foi avaliado quimicamente, substratos constituídos por esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, picado, nas seguintes proporções, p/p: 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0. As misturas foram feitas com base em peso seco num total de 0,5 kg em vasos de 4,5 litros (experimento I). Este experimento foi realizado no período de fevereiro a maio de 1989. Um segundo experimento foi realizado em vasos de 1 litro utilizando-se esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar, moído, nas proporções, v/v: 1:3 e 1:1. As misturas foram feitas com base em volume num total de 800 ml. Este experimento foi realizado de fevereiro a abril de 1990. Ambos experimentos constaram de tratamentos com e sem minhocas e com e sem inoculação de *Acetobacter*

diazotrophicus. Os experimentos foram realizados em galpão coberto da EMBRAPA/CNPBS - Seropédica, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Verificou-se que independente dos tratamentos houve consumo de C e que o esterco bovino favoreceu as transformações do bagaço de cana-de-açúcar. A minhoca e a inoculação com *A. diazotrophicus* não favoreceram significativamente o consumo de C. A minhoca parece ter assimilado o N, provocando menor ganho no teor de N. Nas misturas constituídas por bagaço moído a minhoca contribuiu significativamente para o decréscimo da relação C/N, especialmente na proporção esterco/bagaço 1:3. Nessa proporção a interação bactéria inoculada x minhoca contribuiu para o decréscimo da relação C/N. Observou-se tendência da maior perda de C dos ácidos fúlvicos e menor perda de C dos ácidos húmicos nos tratamentos com minhoca. De acordo com a relação C_{AH}/AF ocorreu intensa atividade microbiana em 1:3. O $pH_{(H_2O)}$ e a atividade microbiana, medida pela evolução de CO_2 , tenderam a decrescer ao longo do processo, independente dos tratamentos. Verificou-se expressiva atividade da nitrogenase em 1:1 aos 60 dias do experimento I e aos 21 dias do experimento II, em média 200 nmoles C_2H_4 .

4.2. INTRODUÇÃO

DARWIN realizou, em 1881, trabalho pioneiro, mostrando a influência do *Oligochaeta* nas propriedades físicas e químicas do solo. Desde então, vários trabalhos foram publicados demonstrando o potencial deste grupo e dentre os aspectos explorados está a capacidade de transformação do material orgânico numa forma mais estabilizada (MITCHELL *et al.* 1980; HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981; ALBANELL *et al.* 1988).

Embora a compostagem de resíduos orgânicos seja uma prática antiga, a vermicompostagem foi desenvolvida mais recentemente de pesquisas básicas realizadas por programas de manejo de minhocas em Rothamstead em 1940-1950. Após 1970 os cientistas se engajaram no estudo do potencial das minhocas na conversão de resíduos orgânicos numa forma mais estabilizada (CHAN & GRIFFITS, 1988).

A ação das minhocas sobre os resíduos orgânicos altera a composição química das substâncias húmicas, promovendo maior CTC (ALBANELL *et al.* 1988). O material mais estabilizado funciona como condicionador do solo, promovendo a liberação gradual de nutrientes.

Diferentes resíduos fazem parte destes estudos: resíduos industriais e domésticos, esterco, restos de cultura, especialmente os de baixo valor econômico.

A decomposição do material orgânico mais resistente não é ainda clara e precisa ser estudada (EDWARDS & LOFTY, 1977).

O bagaço de cana-de-açúcar contém cerca de 50% de celulose, 27,9% de hemicelulose e 9,8% de lignina (KEWALRAMANI *et al.* 1988). Em decorrência da grande proporção destes carboidratos resulta elevada relação C/N que pode variar de 100-200 segundo ORLANDO FILHO *et al.* (1983). A inoculação com a bactéria fixadora de N₂ pode suprir o baixo nível de N que ocorre neste material, especialmente, durante a decomposição deste resíduo, conseqüentemente pode promover melhor atividade do Oligochaeta no decorrer do processo.

O propósito deste estudo foi determinar as variações na composição química de bagaço de cana-de-açúcar e esterco bovino provocadas pelo Oligochaeta e pela bactéria fixadora de N₂ no processo de compostagem destes resíduos.

A avaliação da multiplicação das minhocas em bagaço de cana-de-açúcar e esterco bovino em diversas proporções foi discutida no Capítulo I.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e métodos usados na avaliação da multiplicação das minhocas no Capítulo I, referentes à preparação do substrato, preparação do inóculo de *Acetobacter diazotrophicus*, obtenção do *Oligochaeta* e delineamento experimental foram os mesmos utilizados neste Capítulo, à exceção da inclusão de tratamentos sem minhocas.

Os parâmetros analisados para a caracterização do vermicomposto dos experimentos I e II foram os seguintes:

- a) pH(H₂O) na relação amostra:H₂O de 1:2,5 (HAIMI & HUHTA, 1987);
- b) C total (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1983);
- c) N total (BREMNER *et al.* 1965);
- d) Respiração microbiana, medida através da evolução de CO₂ expressa em mg C (g.amostra seca.10 dias)⁻¹ (STOTZKY, 1956),
- e) Atividade da nitrogenase, indicativa da fixação biológica de N₂, expressa em nmoles C₂H₄.h⁻¹ (BERGERSEN, 1970).

As amostragens para a avaliação desses parâmetros foram feitas aos 60 e 120 dias após a implantação do experimento I e aos 21, 46 e 86 dias após a implantação do experimento II.

No experimento II, também foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Etileno endógeno: para avaliar se C₂H₄ era proveniente de formação natural do composto ou se da atividade da

nitrogenase. Foi utilizado tratamento controle com 0,05% de CaH_2 (NOHRSTEDT, 1983) aos 21 dias da implantação do experimento II. Como a formação deste foi insignificante, não foi realizado este teste em outras amostragens;

b) Crescimento da bactéria fixadora de N_2 inoculada em meio de cultura: O crescimento de *Acetobacter diazotrophicus* em meio de cultura procedeu-se de acordo com DOBEREINER (1980) e REIS *et al.* (1988); após retirada de amostra do composto onde foi inoculada aos 46 dias após a implantação do experimento,

c) Fracionamento das frações húmicas: foi utilizada a solução 0,5 M de NaOH (PETRUSSI *et al.* 1988) na relação de 1:40 amostra:extrator. Após centrifugação a 6000 rpm (4014,0 g, $r = 94,7$ mm) (SCHNITZER *et al.*, 1981) por 15 min a 25°C, os extratos foram filtrados em papel de filtro Whatman Nº 40.

O extrato líquido, fração solúvel em álcali, representa o material húmico total (AF + AH).

O ácido húmico, fração precipitada em ácido, foi separado da fração húmica total segundo SCHNITZER *et al.* (1981) e o ácido fúlvico foi determinado por diferença.

A determinação do C das frações extraídas foi feita segundo WALKLEY & BLACK (1934, modificado).

Estes métodos estão descritos com maiores detalhes no Apêndice.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Variação no teor de C

No processo de compostagem, 10% a 70% do carbono e 3% a 13% de N do material orgânico em transformação pode ser incorporado ao protoplasma microbiano, durante a multiplicação dos microorganismos (STEVENSON, 1982). Enquanto parte do C evolui para a atmosfera na forma de CO_2 , o N pode ser perdido do sistema por denitrificação, em condições de elevado conteúdo de umidade ou pode ser lixiviado. Nas condições experimentais usadas o N, diferentemente do C, pode aumentar no sistema através da fixação biológica de N atmosférico, mediada pelos microorganismos diazotróficos. Desta maneira, espera-se que ocorra ao longo do processo o decréscimo da relação C/N até a sua estabilização.

Ocorreu independentemente dos tratamentos consumo de C ao longo do período observado (QUADRO 2.1 e 2.2).

De acordo com o QUADRO 2.1, ao compararmos o consumo de C de 60 para 120 dias do experimento I, observa-se que o bagaço puro sofreu pouca transformação e que o acréscimo de esterco favoreceu expressivamente as alterações, que foram maiores à medida que aumentou a proporção de esterco (QUADRO 2.14).

QUADRO 2.1. Teor de C das 5 proporções de esterco/bagaço, picado, com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (Média de 3 repetições). Experimento I

Substrato:		% C			
Relação		épocas de amostragem ⁽²⁾			
esterco/bagaço minhoca		60 dias		120 dias	
p/p		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
0:1	com	51,95	47,60	46,03	43,85
	sem	55,31	50,65	49,40	48,64
1:3	com	43,29	41,49	39,80	37,33
	sem	45,08	45,14	39,92	38,84
1:1	com	37,94	43,86	34,48	37,00
	sem	41,41	41,14	37,89	33,78
3:1	com	40,90	41,38	36,01	35,86
	sem	40,51	38,52	34,87	32,89
1:0	com	35,76	38,58	32,44	33,23
	sem	35,88	41,04	30,71	33,49
Média ⁽²⁾		42,87A		37,80B	

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

QUADRO 2.2. Teor de C das 2 proporções de esterco/bagaço, moído, com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (Média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:		% C ⁽¹⁾					
Relação		Épocas de amostragem					
esterco/bagaço minhoca		21 dias		46 dias		86 dias	
v/v		i ⁽²⁾	ni	i	ni	i	ni
1:3	com	42,70	46,89	45,18	44,83	43,09	43,09
	sem	45,29	47,46	46,58	45,18	43,98	43,57
1:1	com	39,87	39,76	38,02	39,42	32,76	35,65
	sem	41,72	39,35	36,79	37,81	35,24	37,26
Média ⁽³⁾		42,88a		41,55b		39,28c	

(1) % C_(mistura) = 48,88 em 1:3 e 42,98 em 1:1

(2) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(3) Médias diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

QUADRO 2.3 Teor de C das 2 misturas de esterco e bagaço, moído (média dos tratamentos com e sem minhoca, inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*). Experimento II.

Substrato:		% C*		
Relação		Épocas de amostragem		
esterco/bagaço		21 dias	46 dias	86 dias
v/v				
1:3		45,59 a	45,09 a	43,33 b
1:1		40,18 c	38,00 d	35,23 e

* Médias acompanhadas de mesma letra, entre linhas e colunas, não diferem significativamente entre si ao nível de 10% pelo teste de Duncan.

O QUADRO 2.3 referente ao experimento II, nos indica que não ocorreram grandes transformações biológicas do substrato 1:3 aos 46 dias, quando comparado com a amostragem anterior. Ao observarmos o QUADRO 2.2 podemos verificar que aos 46 dias este substrato inoculado e com ou sem minhoca, apresentou maior teor de C que na amostragem realizada aos 21 dias. Como a amostragem era de caráter destrutivo e as misturas de esterco e bagaço previamente feitas com base em volume, entende-se que ocorreu possivelmente alguma diferença entre os vasos que pode não ter sido detectada na implantação do experimento.

Comparando-se as perdas de C do experimento I (QUADRO 2.1) com as perdas de C do experimento II (QUADRO 2.3), verificou-se que o consumo de C neste último foi muito menor. Isto indica que algum fator não diretamente determinado limitou a transformação nas condições do experimento II. Há de se considerar que neste experimento as condições de drenagem e aeração eram diferentes do experimento I. Possivelmente, a falta de drenagem livre e a pouca aeração tenham limitado a atividade dos microorganismos decompositores, da mesma forma como limitaram a atividade reprodutora das minhocas discutida no Capítulo I.

A minhoca, quando está presente no processo, incorpora parte do C em seu tecido durante a sua multiplicação e parte evolui como CO_2 para a atmosfera, proveniente da sua própria respiração. Como a atividade dos microorganismos é

estimulada pelo material orgânico digerido pelas minhocas (LEE, 1985), era de se esperar maior queda de C do resíduo submetido a ação da minhoca.

Na amostragem realizada aos 60 dias (experimento I) foi possível correlacionar teor de C com número de minhocas adultas ($r = -0,476$). Igual correspondência ocorreu entre o número de casulos com o teor de C ($r = -0,849$).

De acordo com os teores de C dos compostos de ambos os experimentos apresentados nos QUADROS 2.1 e 2.2 se observa a tendência do maior consumo de C nos tratamentos com minhoca. No entanto esta tendência se inverte em algumas amostragens e substratos.

Embora vários trabalhos demonstrem claramente o maior consumo de C nos vermicompostos (ALBANELL *et al.* 1988), em experimento realizado por FERNANDES (1991, dados não publicados) igualmente não foi constatada diferença estatística entre os tratamentos com e sem minhoca.

A média dos teores de C dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, considerando os tratamentos com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens do experimento I, indica que nos substratos inoculados, especialmente no substrato 0:1 ocorreu menor consumo de C que nos tratamentos não inoculados (QUADRO 2.4). Possivelmente ocorreu, ao contrário do esperado, competição por nutrientes entre os microorganismos decompositores e a bactéria inoculada.

QUADRO 2.4 Teor de C das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (médias dos tratamentos com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens) Experimento I.

Substrato:		% C*	
Relação esterco/bagaço		Relação	
		inoculado	não inoculado
p/p			
0:1		50,7 a	47,7 b
1:3		42,0 c	40,7 cd
1:1		37,8 de	38,9 de
3:1		38,1 de	37,2 e
1:0		33,7 e	36,6 f

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste Duncan.

Já no experimento II o menor consumo de C nos tratamentos inoculados não foi tão expressivo. Em algumas amostragens, aos 21 dias no substrato 1:3 e aos 46 dias no substrato 1:1, pode-se notar, inclusive, maior consumo nos tratamentos inoculados e de acordo com o teste de Duncan esta diferença foi significativa (QUADRO 2.5).

QUADRO 2.5 Teor de C das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* (médias dos tratamentos com e sem minhoca). Experimento II.

Substrato:		% C ⁽²⁾					
Relação		Épocas de amostragens ⁽³⁾					
esterco/ bagaço		21 dias		46 dias		86 dias	
v/v		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni
1:3		44,0bc	47,2a	45,9ab	44,3bc	43,5bc	43,5bc
1:1		40,8d	39,6de	37,4ef	38,6def	34,0g	36,5f

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

4.4.2 Variação no teor de N

De acordo com o QUADRO 2.6 e 2.7 observa-se que houve aumento no teor de N independentemente dos tratamentos em ambos os experimentos realizados.

Esse aumento era esperado, uma vez que com a perda de massa do substrato, em função do consumo de C pelos macro-microorganismos e consequente evolução de CO₂, ocorre concentração dos nutrientes que não são voláteis.

QUADRO 2.6 Teor de N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 dias e 120 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca e inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*). Experimento I.

Substrato:		% N*	
Relação		épocas de amostragem	
esterco/bagaço		60 dias	120 dias
p/p			
0:1		0,4 e	0,4 e
1:3		0,9 d	2,1 bc
1:1		2,0 bc	2,5 a
3:1		1,8 c	2,6 a
1:0		2,2 b	2,6 a

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

QUADRO 2.7. Teor de N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus*. (Média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:		% N ⁽²⁾					
Relação		Épocas de amostragem					
esterco/bagaço	minhoca	21 dias		46 dias		86 dias	
v/v		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni
1:3	com	0,93	0,84	0,94	0,98	1,11	1,14
	sem	0,77	0,78	0,79	0,99	1,06	1,12
1:1	com	1,36	1,33	1,41	1,34	1,56	1,56
	sem	1,37	1,32	1,42	1,40	1,73	1,53
Média ⁽³⁾		1,09c		1,16b		1,34a	

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) % N_{inicial} = 0,59 em 1:3 e 0,90 em 1:1.

(3) Médias diferem entre si significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Os tratamentos inoculados com *A. diazotrophicus* contribuíram para esse ganho via fixação biológica de N_2 . Pode-se verificar aumento significativamente maior de N no substrato 1:1 do experimento II quando inoculado com *A. diazotrophicus*, que quando não inoculado (QUADRO 2.8) e a mesma tendência no mesmo substrato para o experimento I, aos 60 dias (QUADRO 2.9).

O incremento de N dos tratamentos sem minhoca e não inoculados de outros substratos como por exemplo de 0:1, indica que independentemente da inoculação, houve fixação biológica de N_2 (QUADRO 2.9). Isto sugere a ocorrência de microorganismos autóctones cuja determinação não foi realizada. O incremento de N dos tratamentos com minhoca no substrato referido acima, talvez possa ser atribuído à liberação de N dos tecidos das minhocas que morreram nestes substratos.

QUADRO 2.8 Teor de N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (média dos tratamentos com e sem minhoca e as 3 épocas de amostragens). Experimento II.

Substrato:		% N*	
Relação			
esterco/bagaço	inoculado		não inoculado
v/v			
1:3	0,93 c		0,97 c
1:1	1,48 a		1,41 b

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Em experimento relatado por ABRAHANSEN (1990), na presença de Enchytraidae (*Cognettia sphagnetorum*), ocorreu aumento de 18% no nível de NH_4^+ e NO_3^- , mas segundo o autor 40% desta diferença foi proveniente dos tecidos das minhocas que haviam morrido no ambiente.

Os teores de N dos substratos 1:3 e 1:1, experimento I (QUADRO 2.9), foram maiores que os do experimento II (QUADRO 2.7). Possivelmente isto possa ser reflexo do conteúdo inicial de N, que talvez por ser mais baixo que no experimento II não tenha interferido sobre a fixação biológica de N_2 .

QUADRO 2.9. Teor de N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetabacter diazotrophicus* (média de 3 repetições). Experimento I.

Substrato:		% N			
Relação		Épocas de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	60 dias		120 dias	
p/p		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
0:1	com	0,54	0,41	0,34	0,48
	sem	0,26	0,19	0,55	0,38
1:3	com	0,86	0,53	1,77	2,43
	sem	0,80	1,37	2,12	1,89
1:1	com	1,85	1,60	2,43	2,57
	sem	2,56	2,04	2,43	2,54
3:1	com	1,36	2,09	2,76	2,58
	sem	2,10	1,83	2,62	2,50
1:0	com	2,30	2,36	2,45	2,63
	sem	2,02	2,20	2,60	2,55
Média ⁽²⁾		1,74b		1,76a	

(1) i = inoculado inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

Na vermicompostagem das misturas de esterco e bagaço, picado, de 1:3 e 1:1 ocorreu menor ganho de N que na compostagem convencional, de acordo com o teste de Duncan (QUADRO 2.10). Em bagaço moído isto não foi observado. Ao contrário, o teste de Duncan revelou significativamente maior ganho de N do vermicomposto em 1:3 (QUADRO 2.11).

QUADRO 2.10 Teor de N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, com e sem minhoca aos 60 dias e 120 dias (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, com e sem minhoca). Experimento I.

Relação esterco/bagaço p/p	Épocas de amostragem			
	60 dias		120 dias	
	minhoca		minhoca	
	com	sem	com	sem
	% N*			
0:1	0,5 fg	0,2 g	0,4 fg	0,5 fg
1:3	0,7 f	1,1 e	2,1 bcd	2,0 cd
1:1	1,7 d	2,3 abc	2,5 ab	2,5 ab
3:1	1,7 d	2,0 cd	2,7 a	2,6 a
1:0	2,3 abc	2,1 bcd	2,5 a	2,6 a

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Vários autores têm demonstrado que a mineralização de N é acelerada na presença da minhoca (MITCHELL *et al.* 1977; HARTENSTEIN & HARTENSTEIN, 1981; ALBANELL *et al.* 1988) e que o nível da influência varia com a espécie de minhoca (HAIMI & HUHTA, 1990). Mas, a disponibilidade desse nitrogênio é assunto de controvérsias, pois as minhocas podem assimilar em sua biomassa o que se tornou disponível.

A ação das minhocas altera a composição química das substâncias húmicas dos materiais orgânicos, promovendo maior estabilização destes resíduos (ALBANELL *et al.* 1988). Por outro lado, HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) e ALBANELL *et al.* (1988) constataram que durante a vermicompostagem ocorre a diminuição da quantidade de N do sistema, em função da assimilação desse nutriente em sua biomassa.

QUADRO 2.11 Teor de N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, com e sem minhoca e as 3 épocas de amostragens). Experimento II.

Substrato: Relação esterco/bagaço	% N*	
	com minhoca	sem minhoca
v/v		
1:3	0,99 b	0,92 c
1:1	1,43 a	1,46 a

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Em ambos os experimentos observou-se que a maior produção de casulos ocorreu com maior teor de N do substrato. No experimento I aos 120 dias o grau de correlação entre este dois parâmetros foi 0,395 e no experimento II da época da implantação aos 86 dias foi 0,417.

4.4.3. Variação na relação C/N

Através da relação C/N é possível estabelecer qual a influência da queda do C e do incremento de N sob a estabilização do material orgânico.

Independentemente dos tratamentos verifica-se o decréscimo da relação C/N dos compostos ao longo da observação. Nos compostos com menor proporção de bagaço este decréscimo não diferiu estatisticamente de uma amostragem para outra (QUADRO 2.12 e QUADRO 2.13).

QUADRO 2.12 Relação C/N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 dias e 120 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca e inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*). Experimento I.

Substrato:			Relação C/N*
Relação			épocas de amostragem
esterco/bagaço			60 dias 120 dias
p/p			
0:1	190,2 a		120,3 b
1:3	60,5 c		19,5 d
1:1	22,4 d		14,5 d
3:1	24,9 d		13,4 d
1:0	17,3 d		12,7 d

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

QUADRO 2.13 Relação C/N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído (média dos tratamentos com e sem minhoca e inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*). Experimento II.

Substrato:				Relação C/N*
Relação				épocas de amostragem
esterco/bagaço				21 dias 46 dias 86 dias
v/v				
1:3	56,2 a	49,9 b		39,2 c
1:1	29,8 d	27,3 d		22,4 e

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Dentre as misturas testadas, independentemente dos tratamentos, observa-se que a compostagem de esterco puro ocorre mais rapidamente que a das demais misturas que contém o bagaço. De acordo com o teste de Duncan o composto

de esterco/bagaço, picado, 1:3 diferiu significativamente do composto de esterco puro, pela maior relação C/N, consequência do menor consumo de C e menor incremento de N (QUADRO 2.14). A mais alta atividade microbiana desta proporção, indicada pela evolução de CO_2 (QUADRO 2.22), confirma a sua instabilidade.

QUADRO 2.14 Médias para as 5 misturas de esterco e bagaço, picado, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens). Experimento I.

Substrato:			
Relação	% C*	% N	Relação C/N
esterco/bagaço			

p/p			
0:1	49,18 a	0,39 c	159,59 a
1:3	41,36 b	1,47 b	39,98 b
1:1	38,37 c	2,52 a	18,43 bc
3:1	37,62 c	2,23 a	19,11 bc
1:0	35,14 d	2,39 a	15,02 c
CV (%)	7,31	17,60	45,30

* Médias acompanhadas de mesma letra e na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

Se observa pelo QUADRO 2.15 que os substratos 1:0, 3:1 e 1:1 aos 120 dias já se encontravam estabilizados com a relação C/N em torno de 15.

Embora tenha havido queda da relação C/N ao longo do tempo (QUADRO 2.19), esta não foi suficiente para a estabilização dos substratos 1:1 e 1:3 nas condições do experimento II (QUADRO 2.16).

QUADRO 2.15. Relação C/N do substrato por vaso com e sem minhoca com e sem inoculação da bactéria fixadora de N₂, *Acetobacter diazotrophicus* (média de 3 repetições). Experimento I.

Substrato:		Relação C/N ⁽¹⁾			
Relação		Épocas de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	60 dias		120 dias	
p/p		i ⁽²⁾	ni	i	ni
0:1	com	148,20	161,13	145,25	91,87
	sem	212,24	174,10	111,39	131,50
1:3	com	50,93	87,80	22,72	15,40
	sem	64,72	38,77	19,21	20,60
1:1	com	20,63	27,95	14,32	14,32
	sem	17,11	23,81	15,39	13,47
3:1	com	35,60	19,81	18,06	13,89
	sem	19,23	24,82	13,31	13,15
1:0	com	15,53	16,32	13,25	12,65
	sem	19,00	18,45	12,49†	11,84
Média ⁽³⁾		64,84A		36,06B	

(1) Este parâmetro foi calculado a partir das médias das relações C/N das unidades experimentais.

(2) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(3) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

A proporção de 1:1 atingiu significativamente menor relação C/N que 1:3. Isto era esperado uma vez que este substrato continha originalmente maior proporção de material mais resistente a biodegradação.

QUADRO 2.16 Médias para as 2 misturas de esterco e bagaço, moído, referentes aos tratamentos inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus*, com e sem minhoca e as 3 épocas de amostragens. Experimento II.

Substrato: Relação esterco/bagaço	% C*	% N	Relação C/N
v/v			
1:3	44,67 a	0,95 b	48,4 a
1:1	37,81 b	1,45 a	26,5 b
CV (%)	4,84	7,84	11,7

* Médias da mesma coluna diferem ao nível de 5 % de probabilidade de acordo com os valores de F.

De acordo com os dados do QUADRO 2.17 foi possível constatar que nas proporções contendo bagaço picado a minhoca não contribuiu significativamente para o decréscimo da relação C/N. Em bagaço puro, possivelmente devido a decomposição das minhocas que morreram nestes substratos, ocorreu maior queda da relação C/N nos tratamentos com minhocas.

Segundo HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) a assimilação de N nos tecidos das minhocas em multiplicação provoca muitas vezes o nivelamento da relação C/N do vermicomposto com o composto.

Já no experimento II a média da relação C/N dos tratamentos com minhoca, independentemente dos substratos, foi estatisticamente menor que do tratamento sem minhoca, de acordo com os valores de F (relação C/N = 36,2 com minhoca e 38,7 sem minhoca).

QUADRO 2.17 Relação C/N das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, com e sem minhoca (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* e das 2 épocas de amostragens). Experimento I.

Substrato:		épocas de amostragens			
Relação		60 dias		120 dias	
esterco/		Minhoca		Minhoca	
bagaço		com	sem	com	sem
Relação C/N*					
p/p					
0:1	155,2 b	243,2 a	119,1 c	121,4 c	
1:3	69,2 d	51,8 de	19,1 f	19,9 f	
1:1	24,3 de	20,5 ef	14,5 f	14,4 f	
3:1	27,7 f	22,0 ef	13,5 f	13,2 f	
1:0	15,9 f	18,7 f	13,0 f	12,5 f	

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

Considerando, ambos substratos, observa-se que a maior contribuição foi dada especialmente pela influência que as minhocas exerceram sob o substrato 1:3 (Figura 2.1)

A preferência da minhoca por substrato celulolítico foi discutida por vários autores (HARTENSTEIN, 1983b; FLACK & HARTENSTEIN, 1984; LOQUET & VINCESLAS, 1987). Segundo HARTENSTEIN (1983b) a minhoca retira mais eficientemente os nutrientes do substrato na presença de celulose.

No substrato 1:3 aos 21 dias do experimento II a bactéria inoculada favoreceu significativamente a queda da relação C/N, de acordo com o teste de Duncan; em consequência do maior consumo de C e incremento de N nesta amostragem (QUADRO 2.18). Vários trabalhos mostram o aumento

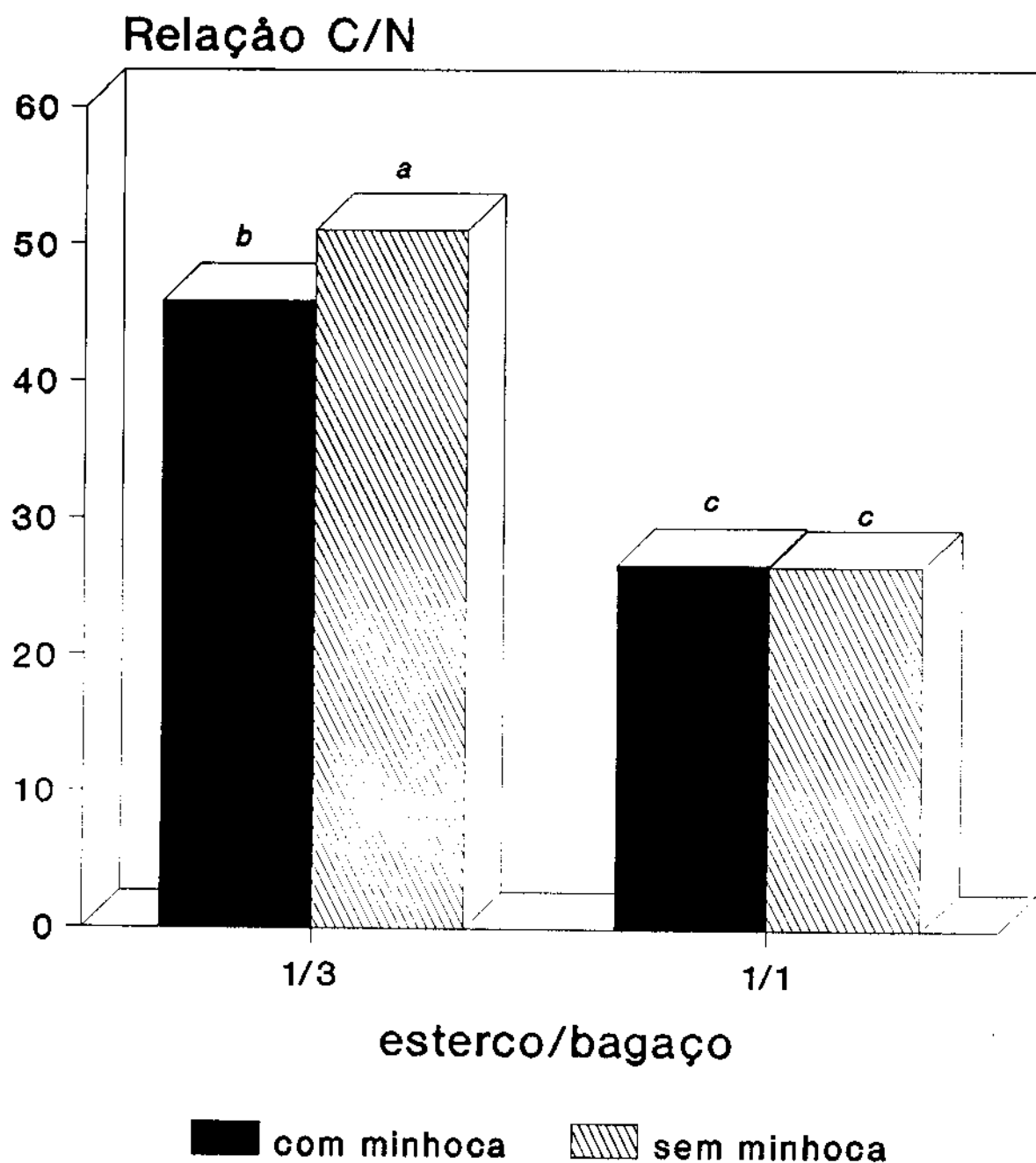


Figura 2.1 Relação C/N dos substratos 1:3 e 1:1 com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* e das diferentes épocas de amostragens) Experimento II. Letras iguais indicam que os valores não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

da taxa de transformação de resíduos orgânicos, como palha de trigo, pelo aumento do conteúdo de N proveniente da inoculação de microorganismos fixadores de N₂ (HILL & PATRIQUIN, 1988).

QUADRO 2.18 Relação C/N das 2 misturas de esterco e bagaço, moído, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus*, aos 21, 46 e 86 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca). Experimento II.

Substrato:		Relação C/N ⁽²⁾					
Relação		Épocas de amostragem					
esterco/bagaço		21 dias		46 dias		86 dias	
v/v		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni
1:3		53,0b	59,4a	54,0b	45,7c	39,0d	38,7d
1:1		29,7e	29,8e	26,5ef	28,2ef	20,7g	24,1fg
Média ⁽²⁾		41,4AB	44,6A	40,2BC	37,0C	30,2D	31,4D

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Médias acompanhadas de mesma letra e do mesmo tipo não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Nesta mesma proporção a interação da bactéria inoculada e a minhoca contribuiu significativamente para a maior queda da relação C/N (Figura 2.2).

Esta tendência não foi consistente nos substratos e épocas de amostragens do experimento I (QUADRO 2.15).

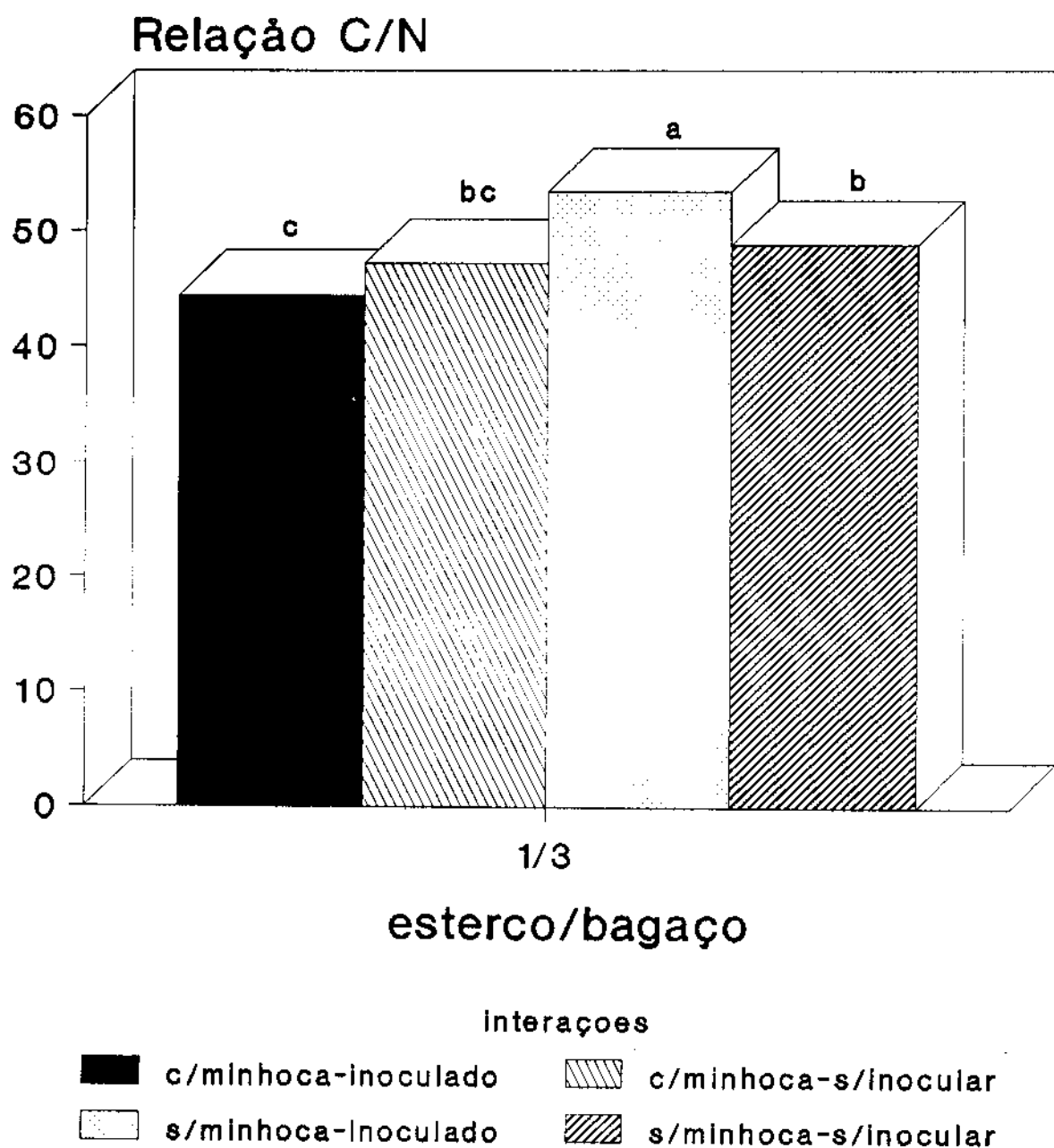


Figura 2.2 Relação C/N do substrato 1:3 na interação da minhoca e da bactéria inoculada, *Acetobacter diazotrophicus* (média das diferentes épocas de amostragens) Experimento II. Letras iguais indicam que os valores não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

O coeficiente de variação deste parâmetro no experimento I, considerando diferentes tratamentos e épocas, foi 45% provavelmente, decorrente da heterogeneidade das amostragens, inerente ao próprio substrato que foi constituído por bagaço picado e não moído como no experimento II.

QUADRO 2.19 Relação C/N do substrato por vaso com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus*. (média de 3 repetições) Experimento II.

Substrato:		Relação C/N ⁽¹⁾					
Relação		Época de amostragem ⁽²⁾					
esterco/bagaço minhoca		21 dias		46 dias		86 dias	
v/v							
1:3		i ⁽³⁾ ni		i ni		i ni	
	com	46,44	56,56	48,22	45,94	38,70	37,84
	sem	59,54	61,19	59,81	45,53	40,50	39,50
1:1		i ⁽³⁾ ni		i ni		i ni	
	com	29,32	29,90	27,04	29,42	21,05	22,01
	sem	30,36	29,79	25,90	27,03	20,38	25,17
Média ⁽⁴⁾		42,89a		38,62b		30,78c	

(1) Este parâmetro foi calculado pela média das relações C/N das unidades experimentais.

(2) Relação C/N_(inicial) = 97,76 em 1:3 e 47,76 em 1:1.

(3) i= inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(4) Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

QUADRO 2.22 Médias para as 5 misturas de esterco e bagaço, picado, referentes aos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens. Experimento I.

Substrato:			
Relação esterco/bagaço	pH* (H ₂ O)	Massa seca	Evolução de CO ₂
p/p		--- g ---	---- mg c ----
0:1	6,1 b	370,6 a	4,99 b
1:3	6,5 a	136,0 c	7,29 a
1:1	6,5 a	122,5 c	7,00 a
3:1	6,4 a	143,6 c	5,81 b
1:0	6,5 a	180,7 b	3,05 c
CV (%)	4,0	15,6	30,2

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

4.4.4. Fracionamento de C.

A denominação de ácidos fúlvicos, empregada nesta discussão, refere-se às substâncias que não sofreram precipitação em meio ácido. Deve ser considerado que estas foram determinadas por diferenças entre outras substâncias, portanto não é possível assegurar que substâncias diferentes de ácidos fúlvicos possa ter sido incluído nesta determinação.

Os teores de C dos ácidos fúlvicos e húmicos da relação esterco:bagaço de 1:3 foram originalmente maiores que da relação esterco/bagaço de 1:1 (QUADRO 2.23).

A causa do exposto acima, possivelmente, se deva a extração alcalina, onde foi utilizado o NaOH, considerado extrator forte (SCHNITZER, 1978). Este extrator,

provavelmente, provocou oxidação parcial e hidrólise dos hidratos de carbono, especialmente a celulose que constitui 50% do bagaço, hemicelulose que constitui 27,9 e menos expressivamente a lignina que constitui 9,8% (KEWALRAMANI *et al.* 1988), que estão contidos em maior proporção na relação esterco:bagaço de 1:3 do que em 1:1, superestimando os valores de C fracionados.

PETRUSSEI *et al.* (1988) utilizaram diferentes extratores para o fracionamento de esterco bovino e igualmente observaram mais baixo teor de C do material humificado após a compostagem. De acordo com estes autores isto limita a clara correlação entre a concentração do C orgânico nos extratos e o grau de humificação atingido pelo composto.

QUADRO 2.23 Médias para os ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) e AH + AF em relação ao C total, para as 2 misturas de esterco e bagaço, moído, referentes aos tratamentos com e sem minhoca, inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* e as 2 épocas de amostragens⁽⁴⁾. Experimento II.

Substrato:			
Relação	AH ⁽¹⁾	AF ⁽²⁾	AH + AF ⁽³⁾
esterco/bagaço			

	----- % -----		
v/v			
1:3	1,41 a	2,09 a	3,5 a
1:1	0,80 b	1,47 b	2,3 b
CV (%)	25,12	35,67	20,7

(1) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

(2) AH_(inicial) = 1,43 em 1:3 e 1,14 em 1:1.

(3) AF_(inicial) = 3,79 em 1:3 e 2,44 em 1:1.

(4) AH + AF_(inicial) = 5,22 em 1:3 e 3,58 em 1:1.

O esterco difere do bagaço entre outros, especialmente, por ter sofrido transformações precedentes no trato digestivo do bovino. De modo que o esterco fresco contém frações húmicas, embora ainda "jovens", com moléculas pouco polimerizadas e de baixo peso molecular. Isto possivelmente explica a quantidade de C do material humificado que ocorreu antes de se iniciar o processo. Devido a atividade biológica ocorre a policondensação das moléculas e muito C pode ser perdido neste processo na forma de CO₂ (mineralização secundária).

Segundo SUGAHARA & INOKO (1981), o C dos ácidos húmicos dos rejeitos em compostagem aumenta consideravelmente até cerca de 60 dias, enquanto que o conteúdo de C dos ácidos fúlvicos segue uma tendência oposta.

Verificou-se esta tendência na proporção de esterco/bagaço 1:3 (Figuras 2.3 e 2.4), mas não em 1:1. A partir do 46º dia se verificou aumento de C da fração fúlvica em ambos.

Ocorreu possivelmente que na fase inicial do processo a minhoca e/ou microorganismos estavam degradando os ácidos fúlvicos que são menos condensados que os ácidos húmicos e o N destes compostos sob a forma alifática é mais facilmente degradável. A partir do 46º dia, certamente, as moléculas simples oriundas da mineralização primária foram utilizadas pelos microorganismos para sua síntese celular e quando estes morreram, provavelmente, neste período, os polissacarídeos de sua própria biodegradação participaram do processo de humificação, provocando o aumento de C da fração fúlvica.

Os substratos utilizados inicialmente já apresentavam diferenças na resistência ao ataque dos macro-microorganismos. O esterco foi utilizado após cerca de 20 dias de curtimento, quando a temperatura estava estabilizada, portanto, esperava-se a formação das substâncias humificadas mais rapidamente onde este resíduo foi utilizado em maior proporção. Ao invés disto ocorreu queda de C dos ácidos húmicos na proporção de esterco/bagaço de 1:1 (Figura 2.3), sugerindo que os macro e microorganismos atacaram além do C dos ácidos húmicos o C dos ácidos fúlvicos.

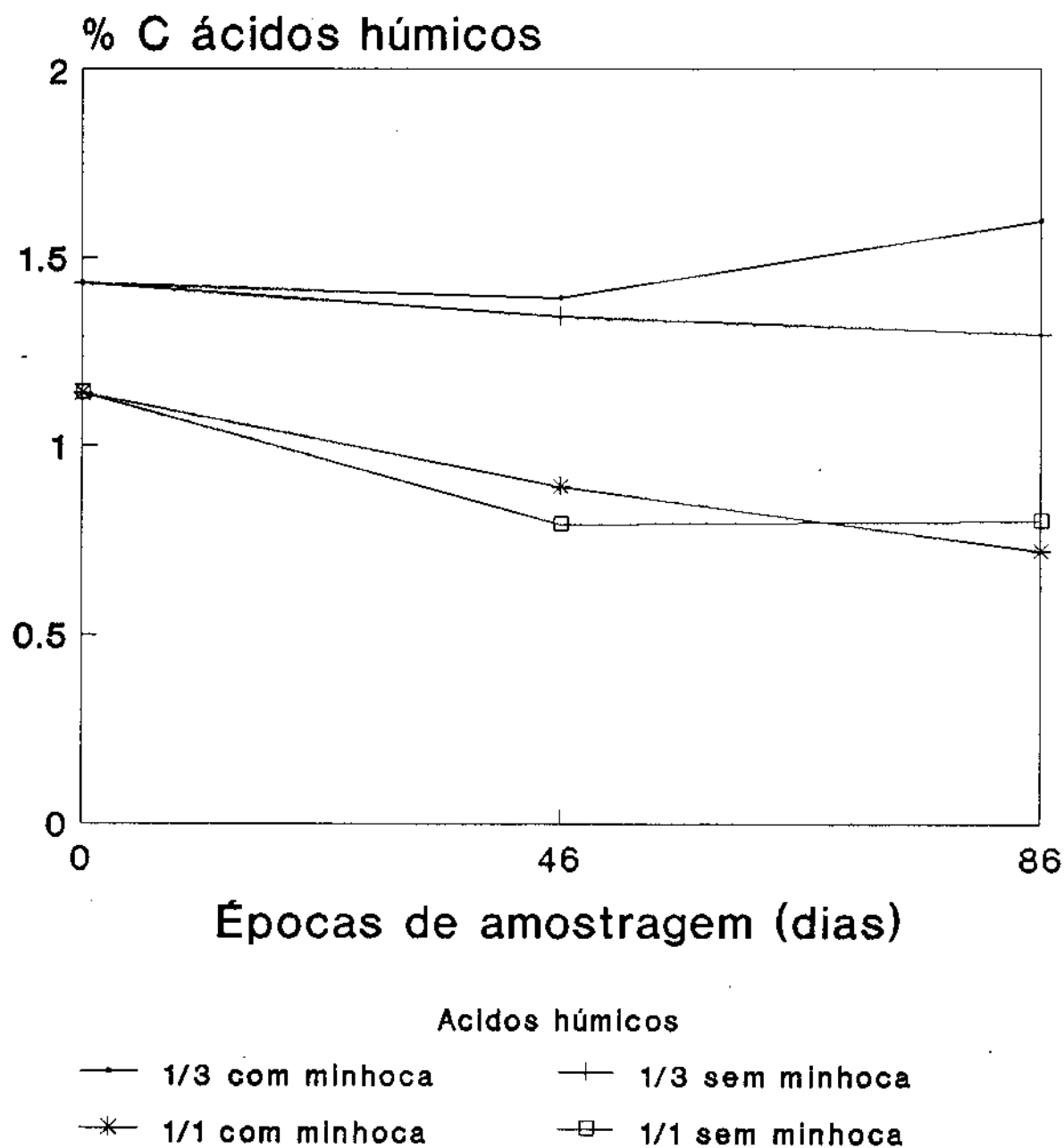


Figura 2.3 Teor de C dos ácidos húmicos, em relação ao C total, dos substratos 1:3 e 1:1 com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento II (Não houve diferença estatística entre os tratamentos).

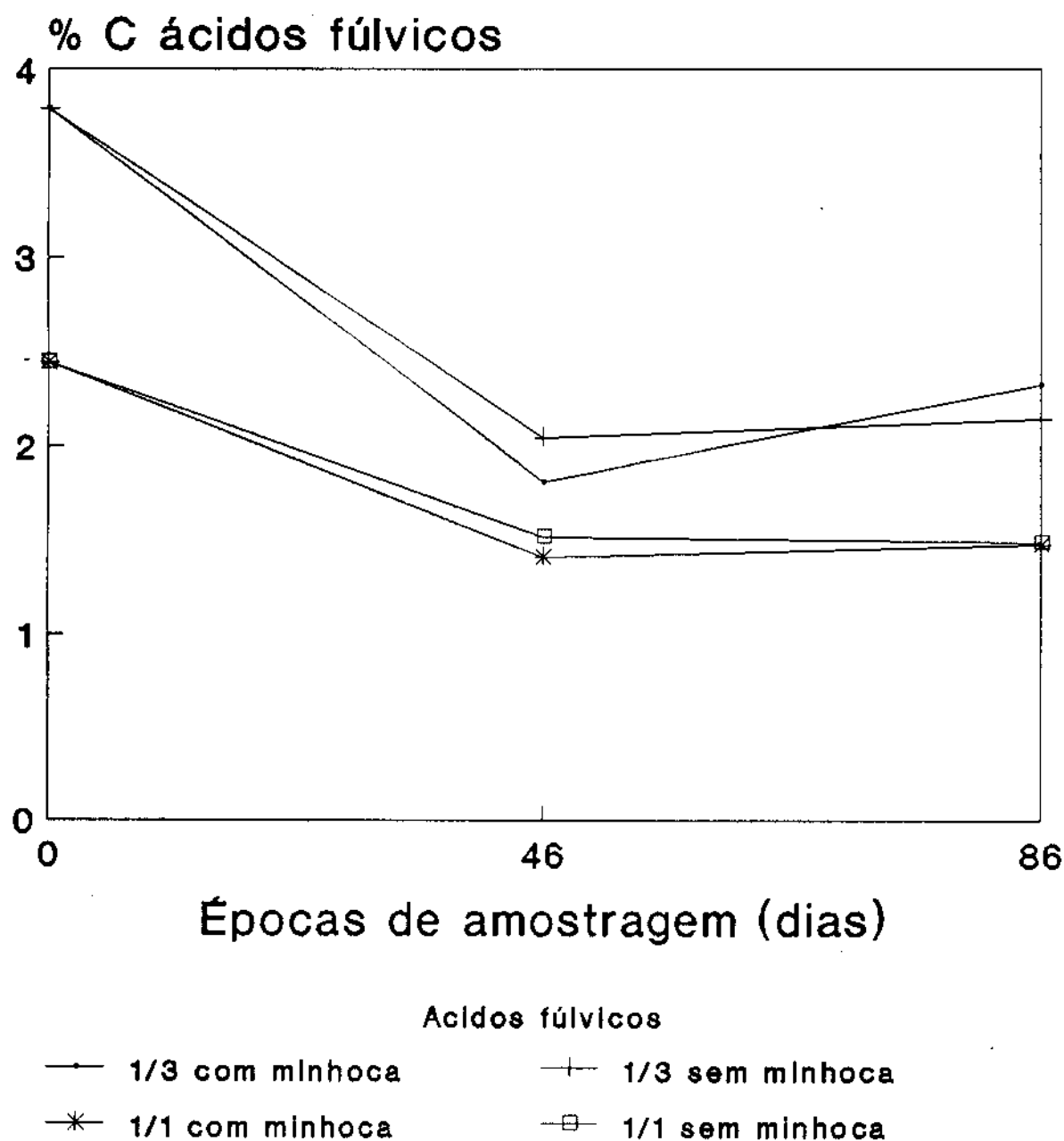


Figura 2.4 Teor de C dos ácidos fúlvicos, em relação ao C total, dos substratos 1:3 e 1:1 com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento II (Não houve diferença estatística entre os tratamentos).

O decréscimo e o aumento das frações húmicas não ocorreu de forma contrabalançada. De modo, que aos 86 dias se verificou menor quantidade de material humificado em ambos os substratos (Figuras 2.3 e 2.4). Provavelmente, o restante esteja na forma de humina. A humina não foi estimada porque o método utilizado para o fracionamento do húmus não permitiu a separação desta da matéria orgânica pouco transformada.

Em experimento relatado por ALBANELL *et al.* (1988) e HARTENSTEIN & HARTENSTEIN (1981) as transformações provocadas pelas minhocas proporcionam maior estabilidade ao resíduo orgânico, indicado pela maior quantidade de material humificado encontrado no composto submetido à ação das minhocas. ALMEIDA (1989, dados não publicados) encontrou 30% mais de AH + AF no vermicomposto de esterco bovino comparado com a compostagem.

No atual experimento não se constatou tal estabilidade tão claramente, mas a análise dos resultados obtidos nos leva a crer que na presença das minhocas houve maior perda de C dos ácidos fúlvicos e menor perda de C dos ácidos húmicos (Figuras 2.3 e 2.4), sugerindo que a passagem do material orgânico utilizado como alimento, através do seu sistema digestivo, onde sofre a ação das enzimas e microflora presente, tenha favorecido a estabilização do material humificado.

Ao considerarmos a média dos substratos com e sem minhoca e as diferentes épocas de amostragens, constatou-se

que o tratamento com a bactéria inoculada, *A. diazotrophicus*, apresentou significativamente, de acordo com os valores de F, menos material humificado que o tratamento não inoculado ($AH + AF = 2,66$ inoculado e $3,09$ não inoculado). Considerando a época observa-se que a maior diferença ocorreu aos 86 dias, cerca de 20% (QUADRO 2.24). Possivelmente, tenha ocorrido ao contrário do proposto inicialmente, a competição entre os microorganismos decompositores e a bactéria inoculada, como talvez tenha ocorrido com o teor de C total.

As variações na medida de AF e AH indicadas pelo coeficiente de variação (QUADRO 2.25) são atribuídas à complexidade que envolve a quantificação das frações húmicas, de acordo com SUGAHARA & INOKO (1981).

Segundo SALFELD & SOCHTIG (1977) citado por RIFFALDI *et al.* (1986) a relação C_{AH}/C_{AF} aumenta no período de 2 meses aproximadamente 50%. Os resultados do experimento II revelaram semelhante aumento desta relação na proporção de esterco:bagaço de 1:3 em 1 mês e meio. Em contrapartida, após um mês e meio a relação C_{AH}/C_{AF} decresceu (QUADRO 2.25).

A mais baixa relação C_{AH}/C_{AF} em 1:3 inicial, encontrada no QUADRO 2.25, reflete o grau de polimerização deste substrato. Como o substrato 1:3 contém componentes mais resistentes ao ataque microbiano que 1:1 era de se esperar frações com menor polimerização.

QUADRO 2.24. Teor de C, extraído em NaOH 0,5 N, em relação ao C total total do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com bactéria fixadora de N₂, *Acetobacter diazotrophicus* (Média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:		Épocas de amostragem ⁽⁴⁾							
Relação		Ácidos húmicos ⁽²⁾ dms = 0,9				Ácidos fúlvicos ⁽³⁾			
esterco/bagaço	minhoca	46 dias		86 dias		46 dias		86 dias	
----- % C -----									
		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni	i	ni
1:3	com	1,33	1,44	1,34	1,86	1,85	1,76	1,82	2,82
	sem	1,35	1,33	1,41	1,16	2,10	1,97	1,78	2,50
1:1	com	0,76	1,02	0,74	0,69	1,24	1,57	1,17	1,79
	sem	0,78	0,80	0,61	0,98	1,51	1,52	1,48	1,49

Substrato:		Épocas de amostragem ⁽⁴⁾			
Relação		AH + AF			
esterco/bagaço	minhoca	46 dias		86 dias	
----- % C -----					
		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
1:3	com	3,18	3,20	3,16	4,68
	sem	3,46	3,33	3,19	3,66
1:1	com	2,00	2,59	1,91	2,48
	sem	2,29	2,32	2,09	2,47

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Precipitado com H₂SO₄ 0,5 N. DMS = Diferença mínima significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

(3) AF = (AF + AH) - AH.

(4) Diferenças significativas entre substratos vide QUADRO 2.23.

QUADRO 2.25 Teor de $C_{AH/AF}$ e taxa de extração, $(AF+AH) \times C_{total}^{-1}$, do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com a bactéria fixadora de N_2 , *Acetobacter diazotrophicus*. (Média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:		Épocas de amostragem ⁽²⁾							
Relação		$C_{AH/AF}$				Taxa de extração			
		46 dias		86 dias		46 dias		86 dias	
1:3		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni	i	ni
	com	0,73	1,08	2,67	1,13	25	23	25	33
	sem	0,68	0,73	1,11	0,47	22	24	26	27
	Média ⁽³⁾	0,81		1,35		24b		28c	
1:1									
	com	0,65	0,69	1,04	0,38	21	25	38	31
	sem	0,54	0,53	0,45	0,99	25	25	31	40
	Média	0,60		0,72		24c		35a	
Média ⁽⁴⁾		0,70		1,03		24B		31A	
CV (%)				115,2				9,7	

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) $C_{AH/AF}$ (inicial) = 0,4 em 1:3 e 0,5 em 1:1 e taxa de extração (inicial) = 22 em 1:3 e 19 em 1:1

(3) Médias acompanhadas de mesma letra e do mesmo tipo não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

(4) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

Nas amostragens subsequentes (46 e 86 dias) constatou-se pelo aumento desta relação a intensa atividade microbiana no substrato 1:3, comparada ao substrato 1:1.

Ocorreu tendência da minhoca promover o aumento desta relação (QUADRO 2.25). Este aumento significa a formação do material mais polimerizado.

A maior taxa de extração (QUADRO 2.25) do substrato 1:3, inicial, confirma a ocorrência de material em estado mais condensado, quando comparado com 1:1.

A taxa de extração aumentou ao longo das observações, o que indica que os substratos, independentemente dos tratamentos, sofriam transformações no sentido da humificação.

A influência da ação minhoca e da bactéria inoculada em relação à taxa de extração não ocorreu de forma consistente (QUADRO 2.25).

4.4.5. Atividade da nitrogenase.

Embora *A. diazotrophicus* fixe N_2 somente em meio microaeróbico (GILLIS *et al.* 1989), ocorre normalmente em clima quente alta atividade microbiana e consequentemente grande consumo de O_2 , que tende a reduzir a concentração de O_2 na vizinhança dos microorganismos diazotróficos, protegendo a nitrogenase, contra efeitos deletérios (HILL & PATRIQUIN, 1990). Desta maneira, supõe-se que a taxa de O_2 do sistema em avaliação não tenha sido fator limitante para a fixação biológica de N_2 .

Os resultados obtidos na avaliação da atividade da nitrogenase não apresentaram diferenças estatisticamente detectáveis entre os tratamentos com e sem inoculação. Contudo, constatou-se que o substrato 1:1, aos 60 dias do experimento I sem minhoca (QUADRO 2.26) e aos 21 dias do

experimento II (QUADRO 2.27) com minhoca, se destacou dos demais substratos, apresentando expressiva atividade desta enzima no tratamento que foi inoculado, superando 200 nmoles C_2H_4 (h. 50 g substrato)⁻¹.

Ainda que a atividade detectada tenha superado todas as demais medições, é difícil estabelecer seu verdadeiro significado à luz dos demais dados obtidos no trabalho.

A avaliação deste parâmetro deve ser criteriosa, pois a atividade da nitrogenase sofre tremendamente as influências do momento. Além disto, a análise cromatográfica de etileno está sujeita a vários fatores que podem contribuir para o erro analítico, dentre os quais estão, principalmente, a heterogeneidade das amostras e a instabilidade do aparelho de medição deste parâmetro (cromatógrafo).

Considerando o valor isolado da atividade da nitrogenase medida aos 60 dias do experimento I (QUADRO 2.26) e comparando com o teor de N do mesmo tratamento (QUADRO 2.8), poder-se-ia dizer que houve efetivo ganho de N.

Entretanto, para as demais medições desse parâmetro e os teores de N correspondentes, não existe consistência dos dados obtidos, pois não se conseguiu que *Acetobacter*

QUADRO 2.26 Atividade da nitrogenase (nmoles $C_2H_4 \cdot h^{-1}$) do composto com e sem minhoca, inoculado e não com *Acetobacter diazotrophicus* após 6 horas de incubação com C_2H_2 . Experimento I

Substrato		Atividade da nitrogenase ⁽²⁾			
Relação		Épocas de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	60 dias ⁽²⁾		120 dias	
p/p		nmoles.h ⁻¹			
		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
0:1	com	0,1	0,0	7,5	1,6
	sem	2,3	1,5	7,5	0,3
1:3	com	37,3	13,3	2,7	4,5
	sem	3,4	2,7	2,3	1,0
1:1	com	0,9	5,5	0,1	0,1
	sem	269,3	11,1	1,1	1,2
3:1	com	1,1	2,7	0,1	1,4
	sem	5,6	0,0	0,3	0,9
1:0	sem	0,4	0,4	1,8	0,0
	com	0,5	0,5	0,2	0,2
CV (%)		598,4			

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Média de 2 e 3 repetições aos 60 dias e 120 dias, respectivamente.

(3) Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

diazotrophicus crescesse em meio de cultura. Porém, a atividade da nitrogenase, medida neste dia, foi praticamente nula em todos os tratamentos. Isto sugere que os substratos não dispunham de fonte de energia adequada ou suficiente à fixação do N_2 ou o teor de N teria inibido a atividade da nitrogenase. Tanto que aos 50 dias, foi realizada

reinoculação dos tratamentos correspondentes e igualmente não foi detectada a atividade da nitrogenase, aos 86 dias.

Os coeficientes de variação obtidos na avaliação deste parâmetro foram extremamente altos (QUADRO 2.26 e 2.27). Assim, considerou-se mais apropriado não se utilizar a medição deste parâmetro para a inferência de efeitos tanto da minhoca quanto da inoculação sobre a qualidade final de cada substrato.

Há de se considerar a possibilidade de estarem presentes outros microorganismos fixadores mais adaptados à vermicompostagem que *A. diazotrophicus*, que podem estar tendo sua atividade mascarada por fatores não estudados neste trabalho.

QUADRO 2.27 Atividade da nitrogenase (nmoles $C_2H_4 \cdot h^{-1}$) do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* após 6 horas de incubação com C_2H_2 . (Média de 3 repetições) Experimento II.

Substrato		Atividade da nitrogenase ⁽²⁾					
Relação		épocas de amostragem					
esterco/bagaço minhoca		21 dias		46 dias		86 dias	
		nmoles.h ⁻¹					
		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni
1:3	com	5,8	6,8	0,1	0,3	0,4	0,9
	sem	21,5	6,7	0,1	0,2	4,0	36,9
1:1	com	218,3	19,0	0,1	0,3	0,1	3,9
	sem	1,1	32,5	0,1	0,5	2,2	3,3
CV (%)		510,0					

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*,

(2) Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

4.4.6. pH_(H₂O)

No processo de transformação do material orgânico ocorre a síntese de compostos que determinam o pH do sistema e que caracterizam alguma fase, num dado instante. O mais baixo pH, na fase inicial do processo, indica a existência dos ácidos orgânicos. A diferença de pH dos substratos 1:3 (pH 4,5) e 1:1 (5,8) denota a diferença do estágio inicial de transformação do esterco e do bagaço que constituem as misturas de ambos substratos.

No decorrer do processo da compostagem, sob a atividade microbiana, ocorre a quebra das proteínas e liberação da amônia refletindo sob o pH, que tende à alcalinidade, e isto pode ser evidenciado através do QUADROS 2.28 2.29 (21 e 46 dias do experimento II).

Quando os constituintes mais resistentes do substrato já são atacados pelos microorganismos, ocorre novamente o abaixamento do pH, podendo ser evidenciado aos 86 dias do experimento II (QUADRO 2.29) e aos 120 dias do experimento I (QUADRO 2.28) como esperado segundo SUGAHARA & INOKO (1981).

Com exceção do bagaço puro as médias de pH dos demais compostos não diferiram significativamente entre si (QUADRO 2.22).

Alguns resultados indicam que o pH dos coprólitos tende mais para a neutralidade que o pH do solo circunvizinho a este (LEE, 1985).

No entanto, em relação aos compostos orgânicos muitos outros resultados demonstram que a minhoca (*E. foetida*) tende a decrescer o pH do composto, indiretamente por promover estímulo à atividade microbiana e pelo aumento dos ácidos húmicos (HARTENSTEIN & HARTENSTEIN 1981, HAIMI & HUTHA, 1987 e ALBANELL *et al.* 1988).

QUADRO 2.28 Médias das 5 misturas misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 e 120 dias (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*, com e sem minhoca) Experimento I.

Substrato:	pH*	
	Épocas de amostragem	
Relação		
esterco/bagaço	60 dias	120 dias
p/p		
0:1	6,3 c	6,0 de
1:3	6,8 a	6,2 cd
1:1	6,9 a	6,1 cd
3:1	7,0 a	5,8 e
1:0	6,5 b	6,5 b

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

Não foi detectada nenhuma diferença estatística entre os tratamentos estudados no experimento II, quanto a este parâmetro (QUADRO 2.29). Mas, encontrou-se no vermicomposto das misturas de esterco e bagaço de 1:3 e 1:1, experimento I, maior queda do pH dos 60 para os 120 dias que no composto (QUADRO 2.30). Pode ser que numa amostragem posterior à realizada no experimento II seja possível registrar alguma influência das minhocas sobre o pH.

QUADRO 2.29 $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (Média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:		$\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$					
Relação		Épocas de amostragem					
esterco/bagaço	minhoca	21 dias		46 dias		86 dias	
v/v		i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni
1:3	com	6,5	6,4	6,6	6,6	5,9	5,8
	sem	6,4	6,4	6,6	6,5	6,3	5,8
1:1	com	7,0	7,1	7,2	7,0	6,6	6,3
	sem	7,1	7,1	7,2	7,0	6,7	6,5
Média ⁽²⁾		6,8(a)		6,9(a)		6,3(b)	

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado *A. diazotrophicus*.

(2) Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

QUADRO 2.30 $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 dias e 120 dias (médias dos tratamentos com e sem minhoca e inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*). Experimento I.

Substrato:		Épocas de amostragens			
Relação		60 dias		120 dias	
esterco/		Minhoca		Minhoca	
bagaço		com	sem	com	sem
pH^*					
p/p					
0:1		6,3 def	6,2 efg	6,0 fgh	6,0 fgh
1:3		6,8 bc	6,7 c	5,7 hi	6,6 cd
1:1		6,8 bc	7,1 ab	6,2 efg	6,0 gh
3:1		6,7 c	7,2 a	6,0 fgh	5,6 i
1:0		6,7 cd	6,5 cde	6,5 cde	6,5 cde

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

De acordo com o QUADRO 2.31 verifica-se tendência do menor pH nos vermicompostos que nos compostos.

De acordo com FERNANDES (1991, dados não publicados) o pH do vermicomposto tende a ser mais baixo que o do composto em 30-60 dias, após o que decresce significativamente dos 75 para 90 dias.

QUADRO 2.31 pH_{H₂O} das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* e as 2 épocas de amostragens) Experimento I.

Substrato: Relação esterco/bagaço	pH*	
	com minhoca	sem minhoca
p/p		
0:1	6,17 de	6,08 e
1:3	6,28 cde	6,62 a
1:1	6,49 bcd	6,57 ab
3:1	6,33 bcd	6,41 abc
1:0	6,54 ab	6,47 abc

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

Segundo HAIMI & HUTHA (1990) *Lumbricus rubellus* aumenta a proporção de N-NH_4^+ em relação ao N-NO_3^- do substrato ingerido, reduzindo temporariamente o "pool" de H^+ ; após a oxidação do NH_4^+ a NO_3^- então o pH decresce. Os dados de FERNANDES (1991, dados não publicados) demonstram que após 90 dias de vermicompostagem ocorreu aumento de 41% de N-NO_3^- em relação ao composto.

Muitas vezes, torna-se difícil avaliar a influência direta da minhoca sobre o pH, especialmente das espécies da família Lumbricidae, que apresentam as glândulas calcíferas,

as quais podem ser responsáveis pela excreção de carbonato de cálcio no intestino destas, e na verdade pouco se sabe sobre as alterações que estas glândulas podem provocar no pH do sistema. Além disto, há de se considerar que a liberação de nutrientes, devido a morte das minhocas entre os períodos amostrados do experimento I, pode alterar o equilíbrio iônico do sistema em dado momento.

De maneira geral, as bactérias fixadoras de N_2 , quando reduzem o N_2 a NH_3 , através da nitrogenase utilizando carboidratos como fonte de energia, tendem a acidificar o meio em que se encontram (POSTGATE & HILL, 1979).

No entanto, não se verificou pelos dados apresentados nos QUADROS 2.32 e 2.33 tal tendência. Mas, considerando-se o substrato 1:1 aos 120 dias do experimento I, o mais baixo valor de pH encontrado na interação da minhoca com a bactéria inoculada, sugerem possível atividade desta bactéria.

QUADRO 2.32 $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com, *Acetobacter diazotrophicus* (média de 3 repetições). Experimento I

Substrato:		$\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ (°)			
Relação		épocas de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	60 dias		120 dias	
p/p		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
0:1	com	6,2	6,5	5,6	6,4
	sem	6,4	6,0	6,0	6,0
1:3	com	6,9	6,8	5,8	5,7
	sem	6,7	6,7	6,7	6,4
1:1	com	6,8	6,7	6,4	6,0
	sem	7,1	7,1	5,5	6,5
3:1	com	6,7	6,7	6,1	5,8
	sem	7,2	7,3	5,8	5,5
1:0	com	6,4	6,4	6,8	6,3
	sem	6,7	6,3	6,7	6,2
Média (3)		6,7A		6,2B	

(1) $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ inicial do esterco = 7,2 e do bagaço = 3,2;

(2) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*;

(3) Médias diferem ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

QUADRO 2.33 $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ das 5 misturas de esterco e bagaço, picado, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (médias dos tratamentos com e sem minhoca e as 2 épocas de amostragens). Experimento I.

Substrato:		pH^*	
Relação			
esterco/bagaço		inoculado	não inoculado
p/p			
0:1		6,1 e	6,2 de
1:3		6,5 abc	6,4 bcd
1:1		6,5 bc	6,6 ab
3:1		6,4 bcd	6,3 cd
1:0		6,7 a	6,3 cd

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si a nível de 5% pelo teste Duncan.

4.4.7. Respiração microbiana

A medida da respiração microbiana, através da evolução de CO_2 , indica a atividade dos microorganismos e esta atividade decresce à medida que vai ocorrendo a estabilização do material orgânico. Este decréscimo foi constatado nos compostos de ambos os experimentos, como esperado, independentemente dos tratamentos (QUADRO 2.34 e 2.35).

QUADRO 2.34 Evolução de CO_2 - mg C (g . mistura seca. 10 dias)⁻¹ do substrato com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (Média de 3 repetições). Experimento I.

Substrato		Evolução de CO ₂			
Relação		Épocas de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	60-70 dias		120-130 dias	
p/p		mg C			
		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
0:1	com	5,51	6,48	3,74	5,88
	sem	6,20	4,70	4,44	2,99
1:3	com	6,93	7,38	8,47	6,44
	sem	8,36	9,31	5,05	6,35
1:1	com	7,67	9,68	4,43	4,32
	sem	9,97	9,86	5,18	4,84
3:1	com	5,61	8,19	3,79	3,26
	sem	8,53	7,60	4,58	4,58
1:0	com	3,00	2,90	3,51	2,07
	sem	4,53	3,50	2,36	2,49
Média ⁽²⁾		6,80A		4,45B	

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*,

(2) Médias diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade acordo com os valores de F.

QUADRO 2.35 Evolução de CO₂ - mg C (g . mistura seca . 10 dias)⁻¹ do substrato com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus* (média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato		Evolução de CO ₂ ^(a)			
Relação		Épocas de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	46-56 dias		86-96 dias	
v/v		mg C			
		i ⁽¹⁾	ni	i	ni
1:3	com	17,0	18,2	0,7	0,7
	sem	17,0	17,2	0,7	0,7
1:1	com	17,5	16,4	0,7	0,6
	sem	17,5	21,5	0,8	1,0
Média ⁽²⁾		17,8a		0,7b	
CV (%)		19,3			

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*;

(2) Médias diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F,

(3) Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A evolução de CO_2 medida nas condições do experimento I (QUADRO 2.34) foi maior que a medida no experimento II (QUADRO 2.35). Isto indica que as melhores condições de aeração e drenagem do experimento I proporcionaram maior estímulo à atividade microbiana.

O composto de esterco bovino apresentou mais baixa atividade microbiana segundo QUADRO 2.36. De acordo com a relação C/N, em torno de 13, isto confirma sua estabilização nos períodos amostrados. Ao contrário do bagaço puro, em que a baixa atividade microbiana se deva possivelmente a sua alta relação C/N. A adição de esterco ao bagaço parece ter provocado estímulo à atividade microbiana.

Nos tratamentos com minhocas, os resultados encontrados na avaliação deste parâmetro refletem apenas a ação da minhoca sobre o resíduo, uma vez que a medição deste parâmetro foi realizada em amostras dos substratos após terem sido retiradas as minhocas.

A minhoca pode estimular a atividade microbiana, possibilitando maior superfície específica do resíduo digerido e ainda, muitas vezes, quando pouco digerido, os coprólitos contém células microbianas vivas, produtos nitrogenados, além dos produtos excretados pelo metabolismo da minhoca (LEE, 1985). Embora nas condições que sejam excretados sejam grandemente anaeróbicos, normalmente, são depositados numa situação aeróbica e fornece microambiente favorável para uma gama de microorganismos decompositores.

QUADRO 2.36 Evolução de CO_2 -mg C (g.mistura seca.10 dias)⁻¹ das misturas de esterco e bagaço, picado, aos 60 e 120 dias (médias dos tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus* e com e sem minhoca). Experimento I.

Substrato:		Evolução de CO_2 *	
Relação		épocas de amostragem	
esterco/bagaço		60-70 dias	120-130 dias
p/p		mg C	
0:1		5,7 cd	4,3 de
1:3		8,0 ab	6,6 bc
1:1		9,3 a	4,7 de
3:1		7,5 b	4,1 e
1:0		3,5 ef	2,6 f

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

De acordo com o QUADRO 2.37 se observa que os tratamentos com minhoca diferiram significativamente dos tratamentos sem minhoca, especialmente pelo teste de Duncan, indicando através da mais baixa evolução de CO_2 , medida na faixa de 60-70 dias que as minhocas possivelmente possibilitaram maior estabilização do composto comparado com aquele sem minhoca.

O estímulo à atividade microbiana constatado na amostragem seguinte, constatado no QUADRO 2.37, talvez tenha sido dado pela adição de matéria orgânica fresca, oriunda das minhocas que morreram nestes substratos, como pode ser confirmada no Capítulo I e igualmente verificado por HAIMI & HUTHA (1990).

QUADRO 2.37 Evolução de CO_2 - mg (g.mistura seca.10 dias)⁻¹ das misturas de esterco e bagaço, picado, com e sem minhoca aos 60 e 120 dias (médias dos 5 substratos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento I.

Evolução de CO_2 *		
	60-70 dias	120-130 dias
	mg C	
com minhoca	6,3 b	4,6 c
sem minhoca	7,3 a	4,3 d

* Médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Em ambos experimentos, não ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos inoculados e não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*.

4.4.8. Vermicompostagem quanto a parâmetros não medidos quimicamente

Num processo como a compostagem há de se considerar que os fenômenos biológicos de degradação e síntese ocorrem rapidamente e muitas vezes simultaneamente e as periódicas amostragens experimentais, comumente, não permitem explanações muito claras a respeito da dinâmica do processo.

Em vermicompostagem, a compreensão desta dinâmica se torna ainda mais complexo, pois a possibilidade existente das minhocas morrerem nos compostos e alterarem a composição química do mesmo não permite que a amostragem nos dê uma idéia real desta contribuição. Além disto, as minhocas introduzidas, mesmo que pertencentes à mesma espécie e

estejam na mesma fase de desenvolvimento, podem apresentar diferenças entre si no tocante à adaptação ao meio em que foram submetidos.

Diante da variabilidade encontrada se entende a princípio que o número de repetições usado poderia ter sido maior.

Diante das inconveniências relatadas quanto à quantificação da real contribuição da minhoca no processo, tornou-se interessante acrescentar as alterações provocadas pelas minhocas que foram observáveis a olho nu.

HAIMI & HUHTA (1987), que igualmente encontraram inconsistência em seus resultados, admitem como no atual trabalho a possibilidade de utilização das minhocas na conversão de resíduos orgânicos.

A produção de "coprólitos" e a boa estrutura física adquirida pelo vermicomposto foi visualmente constatada em ambos os experimentos, especialmente no experimento I.

Neste experimento foi estabelecido "graus de compostagem" que variavam de zero a cinco, na tentativa de estabelecer níveis de comparações entre as alterações que eram facilmente visíveis a olho nu. Os mais baixos valores correspondiam aos tratamentos com transformações visivelmente menores, quando comparados com aqueles com transformações visualmente maiores e que correspondiam aos mais altos valores. A partir destes dados se obteve diferenças altamente significativas para os substratos que foram "trabalhados" pelas minhocas, os quais apresentavam

graus maiores de compostagem que os tratamentos sem minhocas (Figura 2.5).

A vermicompostagem de esterco bovino já se encontra bem estabelecida entre os produtores de adubo orgânico. Embora de acordo com a Figura 2.5 os graus de compostagem atribuídos aos substratos com a maior proporção de esterco praticamente não diferiram entre os tratamentos com e sem minhoca, há de se considerar que o período da observação (60 e 120 dias) foi longo para este tipo de resíduo. O vermicomposto de esterco puro diferiu do composto convencional aparentemente pela sua estrutura física, mas como ambos já se encontravam estabilizados, a cor e cheiro dos destes compostos não diferiram.

No experimento II baseou-se no volume atingido pelo composto, uma vez que o bagaço moído dificultava as comparações visuais pela sua própria estrutura. Além disto, as misturas de esterco e bagaço que constituíam ambos substratos foram efetuadas com base em volume.

Ao se observar a Figura 2.6, constatou-se redução altamente significativa do volume dos vermicompostos, quando comparado com o volume dos compostos.

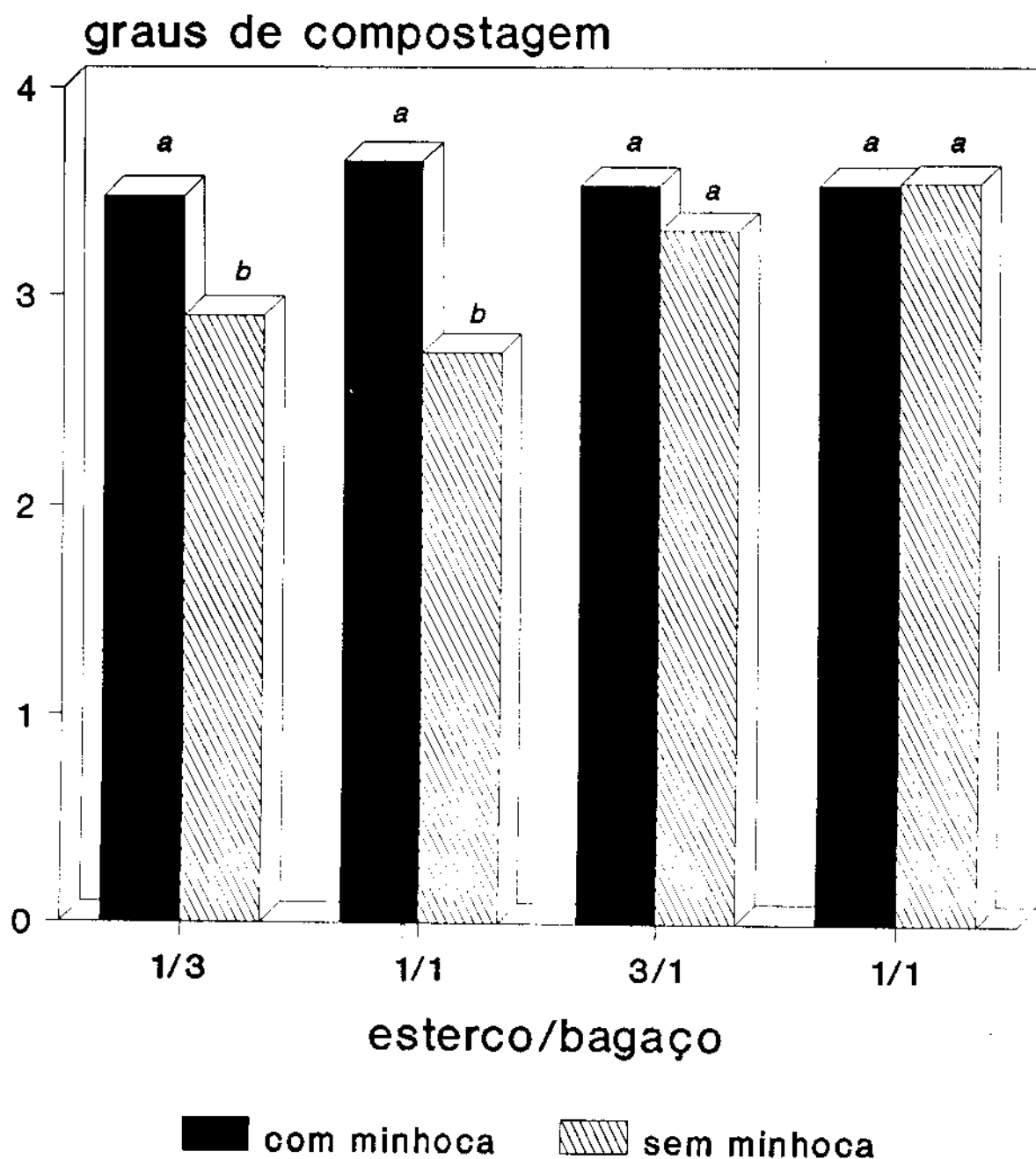


Figura 2.5 Graus de compostagem dos substratos 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 com minhoca e sem minhoca (média dos tratamentos inoculados e não inoculados *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento I. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

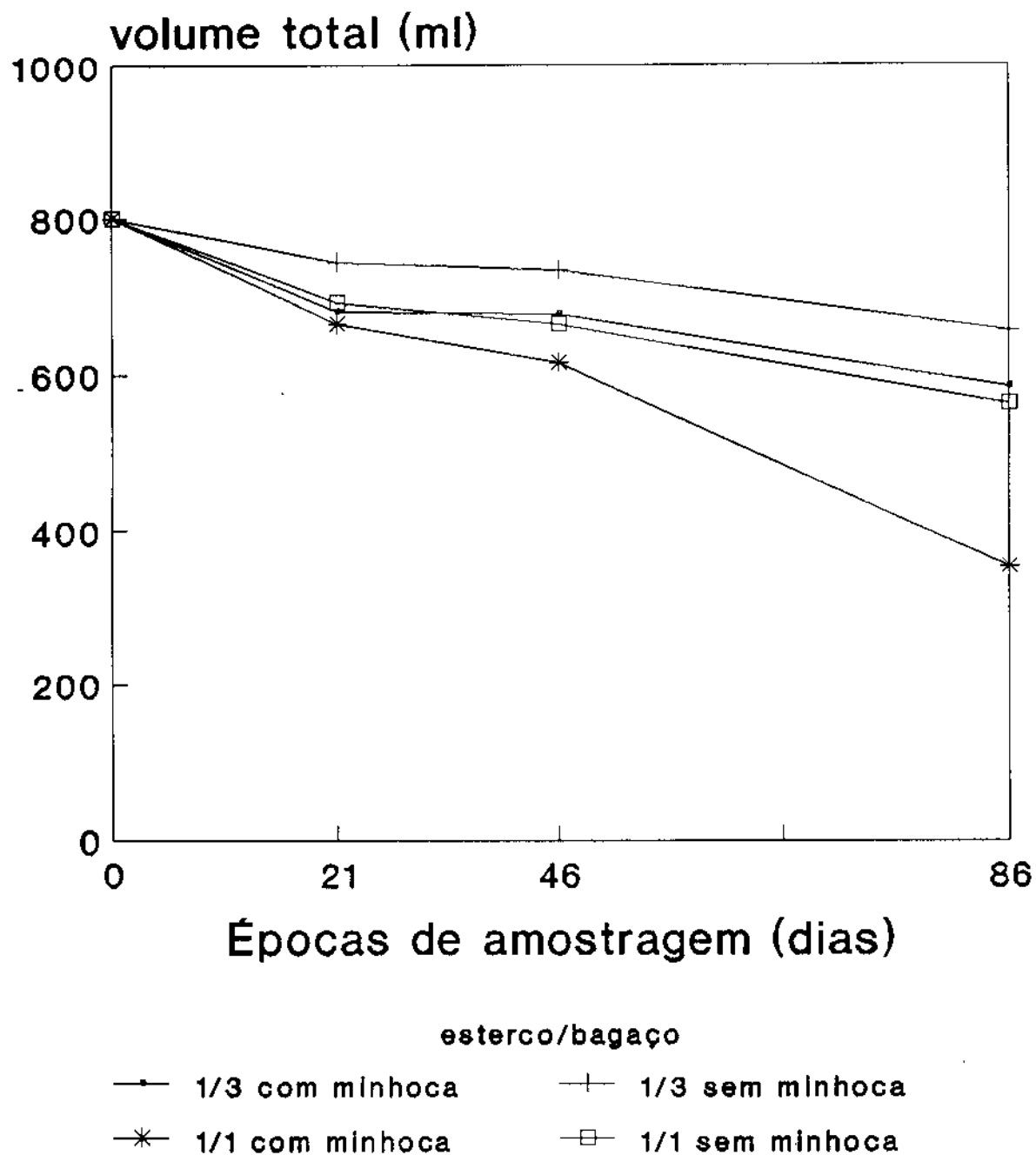


Figura 2.6 Volume total dos substratos com e sem minhoca (média dos tratamentos inoculado não inoculados com *Acetobacter diazotrophicus*) Experimento II.

4.5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que se desenvolveu o presente trabalho foi possível concluir que:

Independente dos tratamentos ocorreu a compostagem dos resíduos orgânicos, que foram ao longo das observações demonstrando maiores declínios da relação C/N em consequência do consumo de C e concentração de N.

O esterco bovino favoreceu as transformações do bagaço de cana-de-açúcar, as quais foram maiores à medida que aumentou a proporção de esterco.

Os compostos constituídos de esterco e bagaço, picado, de 1:0, 3:1 e 1:1 já se encontravam estabilizados com relação C/N em torno de 15, de acordo com a amostragem realizada aos 120 dias. Os resíduos constituídos de bagaço moído não sofreram compostagem ao nível da estabilização.

A melhor aeração e drenagem dos vasos contendo bagaço picado (experimento I) em relação às misturas contendo bagaço moído (experimento II), favoreceram as transformações biológicas, indicada pela menor relação C/N das misturas de esterco e bagaço de 1:3 e 1:1 do experimento I.

A influência da minhoca sobre o consumo de C dos substratos não foi consistente.

A inoculação da bactéria fixadora de N_2 , *Acetobacter diazotrophicus*, tendeu a favorecer o consumo de C das misturas contendo esterco e bagaço moído (1:3 e 1:1), e não

nas misturas de bagaço picado. O incremento de N, via fixação biológica de N_2 , especialmente em 1:1 em ambos experimentos possibilitou maior queda da relação C/N.

A mesma proporção referida acima (1:1) demonstrou aumento da atividade da nitrogenase com a inoculação, destacando-se das demais misturas aos 60 dias do experimento I e aos 21 dias do experimento II, com atividade da nitrogenase em torno de 200 nmoles C_2H_4 (k. 50 g substrato)⁻¹. Associado às referidas evidências, o fato de *A. diazotrophicus* ter crescido em meio de cultura, após ter sido retirada amostra dos substratos inoculados do experimento II, indica serem promissores maiores estudos neste aspecto.

Exceto nas misturas de esterco e bagaço, moído, de 1:3, de modo geral, a vermicompostagem tendeu a reduzir o N dos compostos. Há de se considerar que o N incorporado à sua biomassa não foi computado.

A interação da bactéria inoculada, *Acetobacter diazotrophicus*, e a minhoca favoreceu o decréscimo da relação C/N da proporção de esterco/bagaço, moído, de 1:3.

A estabilidade dos substratos, medida pela fração húmica, tendeu a ser maior nos tratamentos com minhoca. O mesmo não foi verificado nos tratamentos inoculados.

Outros estudos são necessários para adequar melhor a metodologia utilizada para a extração das frações húmicas do composto.

O $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ tendeu a ser mais baixo nos tratamentos com minhoca, nos substratos 1:1, 3:1 aos 60 dias e 1:3 aos 120 dias do experimento I e nos substratos 1:1 e 1:3 aos 86 dias do experimento II.

Não ocorreram alterações no $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ em função da atividade da nitrogenase da bactéria inoculada, exceto no substrato 1:1 aos 120 dias do experimento II.

A medida da atividade microbiana, via evolução de CO_2 , através da incubação de amostras dos substratos não mostrou influência clara dos tratamentos.

Os substratos submetidos à ação da minhoca foram visualmente mais transformados que os substratos sem minhoca.

Em função do alto coeficiente de variação encontrado em vários parâmetros conclui-se que o número de repetições deveria ter sido maior.

O teste de Duncan em relação ao teste de Tukey foi mais adequado para separação das médias na avaliação química dos resíduos orgânicos.

CONCLUSÕES GERAIS

5. CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais em que se desenvolveu o presente trabalho foi possível concluir que:

- A utilização do esterco bovino favorece as transformações do bagaço de cana-de-açúcar. Estas transformações são maiores à medida que aumenta a proporção de esterco.
- É possível a multiplicação das minhocas nas misturas de esterco e bagaço. Em bagaço puro as minhocas não sobrevivem.
- A nível de vermicultura, que visa a reprodução das minhocas, podem ser recomendadas as proporções de esterco e bagaço, picado de 1:1 e 3:1. Cinco minhocas adultas em 500 g destas misturas, podem produzir 30 vezes mais minhocas em 60 dias.

- O vermicomposto de esterco e bagaço nas proporções de 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 demonstraram do ponto de vista dos parâmetros químicos estudados ser possível a sua utilização na agricultura. A proporção de 1:3, especificamente, pode favorecer o produtor do ponto de vista de custo, em função da menor quantidade de esterco.
- O vermicomposto destacou-se do composto convencional pela aparência tipo "pó de café" e por apresentar menor volume.
- Os resultados encontrados quanto à inoculação da bactéria fixadora de N_2 , sugerem que seja promissor estabelecer maiores estudos nesta área.
- A utilização do bagaço de cana-de-açúcar como alternativa para substituição parcial do esterco no processo de vermicompostagem compreende uma das contribuições deste trabalho.
- Diante do pioneirismo deste trabalho, conclui-se que a nível de Brasil, este estudo já representou algum avanço de pesquisa com o grupo das minhocas produtoras de húmus, mas muito ainda há de saber.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSEN, G. Influence of *Cognettia sphagnetorum* (Oligochaeta: Enchytraidae) on nitrogen mineralization in homogenized mor humus. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 9, n. 2, p. 159-162, 1990.
- AICHBERGER, R. VON. Untersuchungen über die Ernährung des Regenwurmes. *Kleinwelt*, v. 6, p. 53-58, 1914.
- AITA, C. Efeito da aplicação de esterco bovino e efluente de biodigestor sobre a atividade microbiana do solo e na disponibilidade de nitrogênio para a cultura de sorgo

- (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Santa Maria : UFSM, 1984. 92p. Tese de Mestrado.
- ALBANELL, E., PLAIXATS, J., CABRERO, T. Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia fetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 6, p. 266-269, 1988.
- ALEXANDER, N. *Introduction to soil microbiology*, 2. ed. New York : John Wiley & Sons, 1977. 467p.
- ALLISON, F. A. The fate of nitrogen applied to soils. *Advances in Agronomy*, New York, v. 18, p. 219-58, 1966.
- ASTON, R.J. The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 40, p. 89-94, 1984.
- ASTON, R.J., SALDER, K., MILNER, A.G.P. The effects of temperature on the culture of *Branchiura Sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 29, p. 137-145, 1982.
- ATLAVINYTE, O., POCIENE, C. The effect of earthworms and their activity on the amount of algal in the soil. *Pedobiologia*, Jena, v. 13, p. 445-455, 1973.

BASSALIK, K. On silicate decomposition by soil bacteria. *Z. Gärungs-physiol.*, n. 2, p. 1-32, 1913.

BERGERSEN, F. J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Australian Journal of Biological Sciences*, Victoria, v. 23, p.1015-1025. 1970.

BETTIDL, W. Utilização do lodo de esgoto como fertilizante. In: COLÓQUIO REGIONAL SOBRE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO, Piracicaba, 1982. *Anais...* Piracicaba : USP / CENA, 1982. p. 227-232.

BOWMAN, H., REINECHE, A. J. A defined medium for the study of growth and reproduction of the earthworm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 10, p. 285-289, 1991.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. *Análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes; métodos oficiais*. Brasília, 1983. 104p.

BREMNER, J. M. Organic Nitrogen in Soils. In: BTHOLOMEW, W. V., CLARK, F. eds. *Soil Nitrogen*. Madison : American Society of Agronomy, 1965 p. 93-132. (Agronomy, n. 10).

- BRENNAN, J., HARTENSTEIN, R. Use of earthworms in sludge management. *Journal WECF*, v. 56, n. 10, p. 1136-9, 1984.
- BRUSEWITZ, G. Investigations on the effects of earthworms on the population, species, distributions and activity of microorganisms in soil. *Archiv für Mikrobiologie*, Berlin, v. 33, p. 42-82, 1959.
- CARVALHO, P. de C. T. Utilização do lodo de esgoto na agricultura. In: COLÓQUIO REGIONAL SOBRE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO, Piracicaba, 1982. *Anais...* Piracicaba : USP / CENA, 1982. p. 223-32.
- CAVALCANTE, V. A., DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and soil*, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CHAN, P. L. S. & GRIFFITHS, D. A. The vermicomposting of pre-treated pig manure. *Biological wastes*, England v. 24, p. 57-69, 1988.
- CITERNESI, U., NEGHA, R., SERRITI, A., LEPICHI, A.A., FILIPPI, C., BAGNETI, G., NUTI, M.P.; GALLUZZI, R., Nitrogen fixation in gastroenteric cavity of soil animal. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 9, p. 71-72, 1977.

- COOKE, A. The effects of fungi on food selection by *Lumbricus terrestris* L. In: SATCHELL, J.E. ed. Earthworm Ecology; from Darwin to vermiculture. New York : Chapman and Hall, 1983 p. 365-373.
- COOKE, A., LUXTON, M. Effect of microbes on food selection by *Lumbricus terrestris*. *Revue d'écologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 17, n. 3, p. 365-70, 1980.
- CRUSIUS, I. H. S. Interação de microorganismos e decomposição no solo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 1, Jaboticabal, 1989. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 20, p. 68-71, 1989. Suplemento. Resumo.
- DARWIN, C. The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations of their habits. Murray, London : 1881. 326p.
- DAY, G. N. Influence of earthworms on soil microorganisms. *Soil Science*, Baltimore, v. 69, p. 175-84, 1950.
- DAWSON, R. C. Earthworm microbiology and the formation of water-stable aggregates. *Soil Science*, Baltimore, v. 69, p. 175-84, 1947.

- DE-POLLI, H., DOBEREINER, J. Uma bactéria para a agricultura. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 10, n. 55, p. 16, 1989.
- DE-POLLI, H., FRANCO, A.A., ALMEIDA, D.L., DUQUE, F.F., MONTEIRO, E.M.S., DOBEREINER, J. *A biologia do solo na agricultura*. Brasília : EMBRAPA/UAPNPBS, 48p. 1988. (EMBRAPA-UAPNPBS. Documentos, 5).
- DIETER KNIERIEMEN, K. Biomass production through the of thermophilic earthworms: A contribution to the utilization of organic wastes. *Animal Research and Development*, Tubigen, n. 21, p. 112-127, 1985.
- DILWORTH, N.J. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 127, p. 285-94, 1966.
- DOBEREINER, J. *Enriquecimento do composto de lixo com bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico*. Rio de Janeiro : Instituto de Biologia e Experimentação Agrícolas. 1961. 12p. (IEEA. Comunicado Técnico, 11).
- DOBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J., ed. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Chichester : John Wiley & Sons, 1980. p. 535-555.

DOBEREINER, J., REIS, V., LAZARINI, A. C. New N_2 fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In: BOTHE, H., DE BRUIJN, F. J., NEWTON, W. E., eds. Nitrogen Fixation: hundred years after; Proceedings of 7th International Congress on N_2 Nitrogen Fixation, Köln : Gustav Fisher, 1988. p. 711-722.

EDWARDS, C.A., FLETCHER, K.C. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 24, p. 235-47, 1988.

EDWARDS, C.A., LOFTY, J.R. *Biology of earthworms*. 2^o ed. New York : John Wiley & Sons, 1977. 333p.

EVANS, A.C., MCGUILD, W.J. McL. Studies on the relationships between earthworms and soil fertility. IV. On the life cycles of some British lumbricidae. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v. 35, n. 4, p. 471-84, 1948.

FLACK, F.M., HARTENSTEIN. Growth of the earthworm *Eisenia foetida* on microorganisms and cellulose. *Soil Biology and Biochemistry*, Washington, v. 16, n. 5, p. 491-5, 1984.

GATES, G.E. On taxonomic puzzle and the classification on the earthworms. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv.*, v. 50, n. 2, p. 414-9, 1954.

GILLIS, M., KERTERS, K., HOSTE, B., JANNS, D., KROPPENSTEDT, R. M. STEPHAN, M. P., TEIXEIRA, K. R. S., DOBEREINER, J. AND DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic bacterium associated with sugar cane. *International Journal Systematic Bacteriologic*, Washington, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GRAFF, O. Gewinnung von biomasse aus abfallstoffen durch kultur des kompostregenwurms *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). *Landbauforschung Volkenrode*, Volkenrode, v. 24, n. 2, p. 137-42, 1974.

GRANT, W.C. Temperature relationships in the megascolecid earthworm *Pheretima hupeiensis*. *Ecology*, Durhan, v. 36, n. 3, p. 412-7, 1955.

GRAY, K.R., BIDDLESTONE, A. J. The composting of agricultural wastes. In: STONEHOUSE, B. ed. *Biological Husbandry : a scientific approach to organic farming*, London : Butterworths, 1981. p.99-111.

GUERRA, R.T., BEZERRA, D. Comportamento de *Pontoscolex corethrurus* Mueller, 1857 (Oligochaeta, Glossocolecidae) em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 1057-64, 1989.

- GUPTA, U. Carbohydrates. In: McLAREN, A.D., PETERSON, G.H., eds. *Soil Biochemistry*, Part. IV. New York. 1967. p.91-118.
- HAIMI, J., HUHTA, Y. Capacity of various organic residues to support adequate earthworm biomass for vermicomposting. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 2, p. 23-7, 1986.
- HAIMI, J., HUHTA, V. Comparison of composts produced from identical waster by "vermiestabilization" and conventional composting. *Pedobiologia*, Jena, v. 30, p. 137-44, 1987.
- HAIMI, J., HUHTA, V. Effects of earthworms on decomposition processes in raw humus forest soil: A microcosm study. *Biology and Fertility of Soil*, Berlin, v. 10, p. 178-183, 1990.
- HAND, P., HAYES, W.A., FRANKLAND, J.C., SATCHELL, J.E. Vermicomposting of cow slurry, *Pedobiologia*, Jena, v. 31, p. 199-209, 1988.
- HANSEN, R.P. & CZOCHANSKA, Z. Earthworm lipids: Occurrence of phytanic, pristanic and 4, 8, 12-trimethyl-tridecamic acids. *Lipids*, Champaign, v. 9, p. 825-7, 1974.

- HANSEN, R.P. & CZOCHANSKA, Z. The fatty acid composition of the lipids of earthworms. *Journal Science Food and Agriculture*, London, v. 26, p. 961-971, 1975.
- HAMILTON, W.E., DINDAL, D.L., PARKINSON, C.M., MITCHELL, M.J. Interaction of earthworm species in sewage sludge-amended soil microcosms: *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v. 25, p. 847-852, 1988.
- HARTENSTEIN, R. Use of *Eisenia foetida* in Organic Recycling Based on Laboratory Experiments. In: APPELHOF, M. (ed) Workshop on the role of earthworms in the stabilization of organic residues. Vol I, 1980. PROCEEDINGS : Beech Leaf Press, Michigan, p. 155-165, 1981.
- HARTENSTEIN, R. Soil macroinvertebrates, aldehyde oxidase, catalase, cellulase and peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 14, p. 387-391, 1982.
- HARTENSTEIN, R. Research needs-sludges and invertebrates should use of invertebrates be considered in the final step of the Wastewater treatment process? *Soil Absorption of wastewater*, p. 50-63, 1983a.
- HARTENSTEIN, R. Assimilation by the earthworm *Eisenia foetida*. In: SATCHELL, J.E. ed. *Earthworm Ecology*; from

Darwin to vermiculture. New York : Chapman and Hall, 1983b. p. 297-308.

HARTENSTEIN, R. Rate of production and loss of earthworm biomass in relation to species and size. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v. 16, n. 6, p. 643-9, 1984.

HARTENSTEIN, R., AMICO, L. Production and carrying capacity for the earthworm *Lumbricus terrestris* in culture. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 15, p. 51-4, 1983.

HARTENSTEIN, R., HARTENSTEIN, F. Physicochemical changes effected in activated sludge by the earthworm *Eisenia foetida*. *Journal Environmental Quality*, Madison, v. 10, p. 377-82, 1981.

HARTENSTEIN, F., HARTENSTEIN, E., HARTENSTEIN, R. Gut load and transit time in the earthworm *Eisenia foetida*. *Pedobiologia*, Bozier, v. 22, p. 5-20, 1981.

HARTENSTEIN, R. NEUHAUSER, E.F. & KAPLAN, D.L. Reproductive potencial of earthworms *Eisenia foetida*. *Oecologia*, Berlin, v. 43, p. 329-40, 1979.

HILL, N.M., PATRIQUIN, D.G. Induction of aerobic nitrogen fixation and enhancement of the wheat straw decomposition by inoculation with a crude culture from sugarcane

litter. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 20, n. 5, p. 613-8, 1988.

HILL, N. M., PATRIQUIN, D. G. Evidence for the involvement of *Azospirillum brasiliense* and *Helicomyces roseus* in the aerobic nitrogen fixing/cellulolytic system from sugar cane litter. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 22, n. 3, p. 313-319, 1990.

HUTCHINSON, S.A., KAMEL, M. The effect of earthworms on the dispersal of soil fungi. *Journal of Soil Science*, Oxford, v. 7, p. 213-8, 1956.

IGUE, K. Dinâmica da matéria orgânica e seus efeitos nas propriedades do solo. In: *Adubação Verde no Brasil*. Campinas : Fundação Cargill, 1984. p. 232-67.

KAISERLAUTERN, D. K. Biomass production through the propagation of thermophilic earthworms: A contribution to the Utilization of Organic Wastes. *Animal Research & Development*, Tubingen, v. 21, p. 112-127, 1985.

KALE, R.D., BANO, K., KRISHNAMOORTHY, R.V. Potential of *Perionyx excavatus* for utilizing organic wastes. *Redobiologia*, Jena, v. 23, p. 419-25, 1982.

- KAPLAN, D.L., HARTENSTEIN, R. Absence of nitrogenase and nitrate reductase in soil macroinvertebrates. *Soil Science*, Baltimore, v. 124, p. 328-31, 1977.
- KAPLAN, D.L., HARTENSTEIN, R., NEUHAUSER, E.F., MALECKI, K.R. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 12, p. 347-52, 1980.
- KEOGH, R.G., CHRISTENSEN, M.J. Influence of passage through *Lumbriculus rubellus* Hoffmeister earthworms on viability of *Pythomyces chartarum* (Berk. and Curt.) M.B. Ellis spores. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 19, p. 255-6, 1976.
- KEWALRAMANI, N., KAMA, D.N., LALL, D., PATHAK, N.N. Bioconversion of sugarcane bagasse with rot fungi. *Biotechnology Letters*, Surrey, v. 10, n. 5, p. 369-72, 1988.
- KHAMBATA, S.R., BHAT, J.Y. A contribution to the study of the intestinal microflora of Indian earthworms. *Archiv für Mikrobiologie*, Berlin, v. 28, p. 69-80, 1957.
- KORSCHOLT, E. On transplantation experiments, diapause and longevity of Lumbricidae. *Zoologischer Anzeiger*, Jena, v. 43, p. 537-55, 1914.

- KOZLOVSKAYA, L. S., ZHDANNIKOVA, E. N. Joint action of earthworms and microflora in forest soils. *Dokl. Akad. Nauk*, n. 139, p. 470-473, 1961.
- KULINSKA, D. The effect of earthworms on the soil microflora. *Acta microbiol. Pol.*, v. 10, p. 339-346, 1961.
- LAINEZ, C., JORDANA, R. Contribución al conocimiento de los oligosetos (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) de Navarra. Pamplona : Ediciones Universidad de Navarra, 1987. 80 p. (Série Zoologia, 15).
- LEE, K.E. Earthworms; Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. Florida : Academic Press, 1985. 411 p.
- LESCHINE, S.B., HOLWELL, K., CONALE PAROLA, E. Nitrogen fixation by anaerobic cellulolytic bacteria. *Science*, Washington, v. 242, p. 1157-9, 1988.
- LIMA, E., BODDEY, R., DOBEREINER, J. Quantification of Biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 9, p. 165-70, 1987.

- LINHARES, L.F.T.L. Participação de pigmentos escuros (melaninas) produzidos por fungos microscópicos do solo na formação de húmus. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 1, Jaboticabal, 1989. Revista de Microbiologia, v. 20, n. 2, p. 63-67, 1989. Suplemento. Resumo.
- LO BIANCO, R.E., ORONÓZ, N.R., RODRIGUES, I.L. Tratado elemental de zoologia. 7. ed. México : Editorial E.C.L.A.L.S.A. Libreria de Porrua HNOS, 1966. 739 p.
- LOQUET, M., VINCESLAS, M. Cellulolytic and Ligninolytic Activities in the gut of *Eisenia foetida*. *Revue d'écologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 24, n.4, p. 559, 1987.
- LYNCH, J.M., HARPER, S.H.T. Straw as a substrate for cooperative nitrogen. *Journal of General Microbiology*, London, v. 129, p. 251-3, 1983.
- MARCEL, R. Recent data on some aspects of reproduction of Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). In: PORCHET, M., ANDRIES, J. C., DHAINAUT, A. (ed), ADVANCES IN INVERTEBRATE REPRODUCTION 4, Elsevier Science Publishers B. V. (Biochemical Division), 1986, p. 221-227.

- MILES, H.B. Soil protozoa and earthworm nutrition. *Soil Science*, Washington, v. 95, p. 407-9, 1963.
- MITCHELL, N.J. Functional relationships of macroinvertebrates in heterotrophic systems with emphasis on sewage sludge decomposition. *Ecology*, Durhan, v. 60, p. 1270-83, 1979.
- MITCHELL, N.J., NULLIGAN, R.N., HARTENSTEIN, R., NEUHAUSER, E.F. Conversion of sludges into "top soils" by earthworms. *Compost Science*, Emmaus, v. 18, p. 4, 1977.
- MITCHELL, N.J., HORNER, S.G., ABRANNS, B.I. Decomposition of sewage sludge in drying beds and the potential role of earthworm, *Eisenia foetida*. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v. 9, p. 373-8, 1980.
- MITCHELL, N.J., PARKINSON, C.N., HAMILTON, W.E., DINDAL, D.L. Role of earthworm, *Eisenia foetida*, in affecting organic matter decomposition in microcosms of sludge-amended soil. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v. 19, 805-12, 1982.
- NEEDHAM, A.E. Components of nitrogenous excreta in the earthworms *Lumbricus terrestris*, L. and *Eisenia foetida* (Savigny). *Journal of Experimental Biology*, London, v. 34, n. 4, p. 425-46, 1957.

- NEUHAUSER, F., KAPLAN, D.L., HARTENSTEIN, R. Live history of the earthworm *Endrilus engelae*. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 16, p. 525-34, 1979.
- NEUHAUSER, E.F., HARTENSTEIN, R., KAPLAN, D.L. Growth of the earthworm *Eisenia foetida* in relation to population density and food rationing. *Oikos*, Copenhagen, v. 35, p. 93-8, 1980a.
- NEUHAUSER, E.F., KAPLAN, D.L., MALECKI, M.R., KARTENSTEIN, R. Materials supporting weight gain by the earthworm *Eisenia foetida* in waste conversion systems. *Agricultural Wastes*, Essex, v. 2, p. 43-6, 1980b.
- NIKIFOROFF, C. C. *Soils and Man - The yearbook of Agriculture*. Washington : U.S. Dep. Agric., 1938. p. 929-939. In: ALLISON, F. E. *Soil organic matter and its role in crop production*. Amsterdam : Elsevier Scientific, 1973. p. 99. (Developments in Soil Science, 3).
- NOHRSTEDT, H.O. Natural formation of ethylene in forest soils and methods to correct results given by the acetylene reduction assay. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v. 15, n. 3, p. 281-6, 1983.
- ORLANDO FILHO, J., SILVA, G. M., LEME, E. J. A. Utilização agrícola dos resíduos da agroindústria canavieira. In:

- ORLANDO FILHO, J., ed. *Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil*. Piracicaba : PLANALSUCAR, 1983. p. 229-264.
- PARLE, J.N. A microbiological study of earthworm casts. *Journal of General Microbiology*, London, v. 31, p. 13-22, 1963.
- PATRIQUIN, D. G. Nitrogen-fixation in sugar cane litter. *Biological Agriculture and Horticulture, Husbandry*, n. 4, p. 69-154, 1982.
- PEIXOTO, R.T.G. *Solubilização de fosfato natural durante a compostagem de lixo urbano e sua utilização por feijão e sorgo forrageiro*. Itaguaí : UFRRJ, 1984. 178p. Tese Mestrado.
- PETRUSSEI, F., NOBILI, M., VIDOTTO, M., SEGUI, P. Characterization of organic matter from animal manures after digestion by earthworms. *Plant and soil*, The Hague v. 105, p. 41-46, 1988.
- PIEARCE, T.G. The calcium relations of selected Lumbricidae. *Journal of Animal Ecology*, Oxford, v. 41, p. 167-85, 1972.

- PIEARCE, T.G. Gut contents of some lumbricid earthworms.
Redobiologia, Jena, v. 18, p. 153-7, 1978.
- PIEARCE, T., PHILLIPS, M. J. The fate of ciliates in the
 earthworms gut: an "in vitro" study. *Microbial Ecology*,
 New York, v. 5, p. 313-320, 1980.
- PINCINCE, A.B., DONOVAN, J.F., BATES, J.E. Vermicomposting
 municipal sludge: an economical estabilisation
 alternative. *Sludge*, v. 3, p. 26-30, 1980.
- POSTGATE, J. R., HILL, S. Nitrogen Fixation, In: LYNCH, J.
 M. & POOLE, N. J. eds. *Microbial Ecology, a conceptual
 approach*. Oxford : Blackwell, 1979. p. 191-213.
- PRENTO, P. Distribution of glutamate dehydrogenase in the
 intestine of the earthworm (*Lumbricus terrestris*), and
 some physiological implications. *Comparative Biochemistry
 and Physiology*, New York, v. 29, n. 2, p. 229-33, 1989.
- PUSSARD, M., FAYOLLE, L., ROUELLE, J. étude critique des
 fondements de la lombriculture. II. Valeur agronomique du
 lombricompost. *Comptes Rendus de L'Academie D'Agriculture
 de France*, Paris, v. 74, n. 3, p. 81-92, 1988.
- REINECKE, A.J., KRIEL, J.R. Influence of temperature on
 cocoon production of the earthworm *Eisenia foetida*

(Oligochaeta). *South African Journal Zoology*, África do Sul, v. 16, p. 96-100, 1981.

- REINECKE, A. J., VILJOEN, S. A. The influence of feeding patterns on growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 10, p. 184-187, 1990.
- REINECKE, A. J., VENTER, J.N. Moisture preferences, growth and reproduction of the compost worm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 3, p. 135-141, 1987.
- REINECKE, A.J., VENTER, J.N. The influence of moisture on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 22, n. 4, p. 473-481, 1985.
- REIS, Y.N., LAZARINI, A. C., DOBEREINER, J. Ocorrência de nova bactéria fixadora de N₂ em raízes e colmos de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO E FEIRA NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 1, Rio de Janeiro. Programa e Resumos... Área Focal 4, 1988.
- RIFFALDI, R., LEVI-MINZI, R., FERA, A., BERTOLDI, de M. Evaluation of compost maturity by means of chemical and

- microbial analyses. *Waste management & Research*, v. 4: p. 387-396, 1986.
- ROBERTSON, J. D. The function of calciferous glands of earthworm. *Journal of experimental Biology*, London, v. 13, p. 279-297, 1936.
- ROESSNER, J. Untersuchungen zur reduktion von nematoden im boden durch regenwurmer. *Med. Fac. Landbouww.*, v. 51, p. 1311-1318, 1986.
- RIGHI, G. Invertebrados (A minhoca), São Paulo, EDART, 1966. 83pp.
- RIGHI, G., KNAPPER, C. Ciclo anual de "*Pheretima indica*" (Horst, 1883) (Oligochaeta, Megascolecidae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 341-343, 1966.
- SATCHELL, J.E. Earthworm microbiology. In: SATCHELL, J.E. ed. *Earthworm Ecology; from Darwin to vermiculture*. New York : Chapman and Hall, 1983. p. 351-361.
- SCHNITZER, M., KHAN, S. U. *Soil organic matter*. Amsterdam : Elsevier Scientific Publishing, 1978. 319 p. (Development in Soil Science, 8).

- SCHNITZER, M., LOWE, L. E., DORMAAR, J. F., MARTEL, Y. A
 procedure for characterization of soil organic matter.
Canadian Journal of Soil Science, Ottawa, v. 61, p. 517-
 519, 1981.
- SCHOLLHORN, R., BURRIS, R.H. Study of the intermediates in
 nitrogenase fixation. *Federation Proceedings*, Baltimore,
 v. 24, p. 710, 1966.
- SCHULTZ, E., GRAFF, O. Zur Bewertung von Regenwurmmehl aus
Eisenia fetida (Savigny, 1826) als Eiweissfuttermittel.
Landbauforschung Volkenrode, Volkenrode, v. 27, p. 216-
 218, 1977.
- SIMEK, M., PIZL, V. The effect of earthworms (Lumbricidae)
 on nitrogenase activity in soil. *Biology and Fertility of
 Soils*, Berlin, v. 7, p. 370-3, 1989.
- STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, composition
 reactions*. Canada : John Wiley & Sons. 1982. 443p.
- STOCKLI, A. Studien über den Einfluss der Regenwürmer auf
 die Beschaffenheit des Bodens. *Landwirtsch. Jahrb.
 Schweiz*, v. 42, p.1, 1928.

- STOTZKY, G. Microbial respiration In: BLACK, C. A. ed.
Methods of soil analysis. Madison : American Society of
Agronomy. V. 2, p. 1550-72, 1956.
- SUGAHARA, K., INOKO, A. Composition analysis of humus and
characterization of humic acid obtained from city refuse
compost. *Soil Science and plant nutrition*, Tokyo, v. 27,
n. 2, p. 213-24, 1981.
- SYERS, J.K., SHARPLEY, A.N., KEENEY, D.R. Cycling of
nitrogen by surface casting earthworms in a pasture
ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, Berlin, v. 11,
p. 181-185, 1979.
- TILLINGHAST, E.K. Excretory pathways of ammonia and urea in
the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Journal*
Experimental Zoology, Philadelphia, v. 166, p. 295-300,
1967.
- TILLINGHAST, E. K. Variations in blood and coelomic fluid
ammonia and urea in the earthworm *Lumbricus terrestris* L.
Comparative Biochemistry and physiology, New York, v. 24,
p. 621-623, 1968.
- TOMLIN, A.D., MILLER, J.J. Development and fecundity of the
manure worm, *Eisenia foetida* (Annelida: Lumbricidae)
under laboratory conditions. In: APPELHOF, M., ed.,

Workshops on the role of earthworms in the stabilization of organic residues. v. 1. Proceedings Beach Leaf Press, Michigan. 1981, 673-8.

TSUKAMOTO, I., WATANABE, H. Influence of temperature on hatching and growth of *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Edaphobiologia*, Jena, v. 17, p. 338-42, 1977.

VARADACHARI, C., GHOSH, K. On humus formation. *Plant and Soil*, The Hague, v. 77, p. 305-315, 1984.

VENTER, J.M., REINECKE, A.I. Can the commercial earthworm *Eisenia foetida* (Oligochaeta) reproduce parthenogenetically or by self fertilization? *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 24, n. 2, p. 157-70, 1987.

VENTER, J.M., REINECKE, A.J. The life-cycle of the compost worm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology*, Africa do Sul, v. 23, n. 3, p. 161-163, 1988.

WAKSMAN, S.A. Humus; origin, chemical, composition, and importance in nature. 2. ed. Baltimore : The Williams & Wilkins, 1938. 526p.

- WALKEY, A., BLACK, I. A. An examination of the Degtareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of chromic acid, titration method. *Soil science*, Baltimore, v. 37, p. 29-38, 1934.
- WATANABE, H., TSUKAMATO, J. Seasonal change size class and stage structure of lumbricid *Eisenia foetida* population in a field compost and its practical application as the decomposer of organic waste matter. *Revue d'Ecologie du sol*, Paris, v. 13, p. 141-6, 1976.
- WATERBURY, J.B., COLLOWAY, C.B., TURNER, R.D. A cellulolytic nitrogen-fixing bacterium cultured from the gland of deshayes in shipworms (Bivalvia: Teredinidae). *Science*, Washington, v. 221, p. 1401-3, 1983.
- WRIGHT, M.A. Factors governing ingestion by the earthworm *Lumbricus terrestris* with special reference to apple leaves. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v. 70, p. 175-88, 1972.
- YEATES, G.W. Soil nematode populations depressed in the presence of earthworms. *Pedobiologia*, Jena, v. 22, p. 191-195, 1981.

ANEXO 1

ANEXO 1

1.1. Métodos

1.1.1. PH (H₂O)

Medido potenciometricamente, com eletrodos de vidro e calomelano na relação substrato/água 1:2,5 (HAIMI & HUHTA, 1987). A amostra permaneceu em repouso na água por 1 hora, após isto foi feita a leitura em medidor digital de pH - Analion-PM 600.

1.1.2. C total

Determinado através da queima da matéria orgânica total, em mufla a 550°C.

1.1.2.a. Cálculo de carbono da amostra

$$\% C = \frac{M.O \times 55,5}{\text{peso seco } 110^{\circ}\text{C}};$$

onde M.O. = matéria orgânica total, obtida pela diferença de pesos entre amostra seca a 110°C e 550°C (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1983).

1.1.3. N total

Foi feito por digestão de 200 mg de matéria seca em bloco digestor, após adição de $H_2O_2 + H_2SO_4$, para destruição da matéria orgânica e $K_2SO_4 + CuSO_4 + Se$ para acelerar o poder oxidante do ácido sulfúrico. A matéria orgânica se transforma em gás carbônico e água, o ácido sulfúrico em SO_2 , H_2O e sulfatos solúveis, inclusive sulfato de amônia. Os sulfatos solúveis são alcalinizados e a amônia destilada em semimicro Kjeldhal e titulada por acidimetria (BREMNER et al. 1965).

1.1.3.a. Cálculo do nitrogênio da amostra

$$\% N = \frac{N \text{ ácido} \times \text{Tit corrig} \times 14}{\text{peso seco da amostra (mg)}} \times 100;$$

onde Tit corrig = volume de ácido gasto na titulação da amostra menos o volume do branco.

1.1.4. Respiração microbiana

Para avaliar a atividade dos microorganismos através da respiração, amostra dos tratamentos foi incubada por 10 dias

juntamente com frasco contendo NaOH 1N, para fixar o CO₂ evoluído (ug C/g amostra seca). Após precipitação da soda carbonatada (Na₂CO₃) pela adição de BaCl₂ 10%, formando Ba₂CO₃, procedeu-se à titulação daquela soda que não reagiu com CO₂. O titulante utilizado foi HCl N/2, com fenolftaleína como indicador de pH, com faixa de viragem entre pH 8,2-10,0 (STOTZKY, 1956).

1.1.4.a. Cálculo da quantidade de C evoluído

$$\text{ug C/g amostra seca} = \frac{(\text{Br} - \text{Tit}) N_{\text{HCl}} \times 0,006 \times 10^4}{\text{peso seco da amostra}};$$

onde Br = volume gasto de ácido na titulação do branco e Tit volume gasto de ácido na titulação da amostra.

1.1.5. Atividade da nitrogenase

Para avaliação deste parâmetro, que é indicativo da fixação de nitrogênio atmosférico, amostra de 50 g das misturas no Experimento I e o vaso todo no Experimento II foi incubada em sistema fechado, com 10% de acetileno (C₂H₂). O acetileno é reduzido a etileno (C₂H₄), por sistemas enzimáticos fixadores de N₂.

A evolução de etileno deste sistema foi medida por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de

chamas de hidrogênio e nitrogênio como gás de arraste, em intervalos de 2 horas, num total de 6 horas.

O etileno forma um pico, acusado pelo registrador, cuja área é proporcional à quantidade do gás (BERGENSON, 1977).

1.1.5.a. Cálculo da atividade da nitrogenase (ARA)

$$ARA = \frac{(E_2 - E_1) \times F \times C_{EP}}{24,450 \times E_P \times t} \text{ } \mu\text{mol } C_2H_4 \cdot h^{-1};$$

onde E_2 = altura do pico de etileno na amostra final; E_1 = altura do pico de etileno na amostra inicial; F = volume do frasco utilizado para a incubação do C_2H_2 ; t = tempo (h) entre as amostragens; C_{EP} = concentração de etileno no padrão (ppm),

E_P = altura do pico de etileno do padrão e 24,450 corresponde ao volume gram molecular dos gases a 25 °C e 760 mm de mercúrio de pressão.

OBS: 1 μmol = 10^{-9} nmoles.

1.1.6. Etileno endógeno. Experimento II

Para avaliar se C_2H_4 era proveniente de formação natural do composto ou se atividade da nitrogenase, foi utilizado tratamento controle com incubação de 0,05% de C_2H_2 . A baixa concentração de acetileno evita a oxidação do etileno e inibe a atividade da nitrogenase. Existem outros

métodos para isto: incubação com 100 ml C_2H_2 l^{-1} , após adição de 0,05 a 0,10% $NH_4^{+}-N$ e incubação com 100 ml C_2H_2 l^{-1} com adição de 20 ml Co l^{-1} . O método utilizado detecta sua ocorrência e sua possível significância e os outros dois mencionados determina seu exato valor (NOHRSTEDT, 1983), o que no caso não era necessário.

Como foi testado a produção do etileno endógeno, a partir da amostragem de todos os tratamentos aos 21 dias e verificado que a formação deste foi insignificante não foi mais usado nenhum outro teste, quanto a este controle.

1.1.7. Fracionamento de C - Frações húmicas. Experimento II

A relação C/N é um critério, tradicionalmente, usado para determinar o grau de maturidade do composto e define sua qualidade agronômica. No entanto, a quantificação das frações dos materiais humificados pode nos dar uma idéia complementar das diferenças da estabilização do composto.

A extração destas frações é dificultada pela complexidade da matéria orgânica e varia muito com a natureza do material avaliado. No caso de compostos orgânicos PETRUSSI *et al.* (1988) fazem uma discussão interessante a cerca da eficiência dos seguintes extratores: 0,5 M NaOH; 0,1 M $Na_4P_2O_7$; 0,1 M NaOH + 0,1 M $Na_4P_2O_7$ para esterco e vermicompostos de bovino, suíno e carneiro. Baseado no custo e na eficiência relativa destas soluções

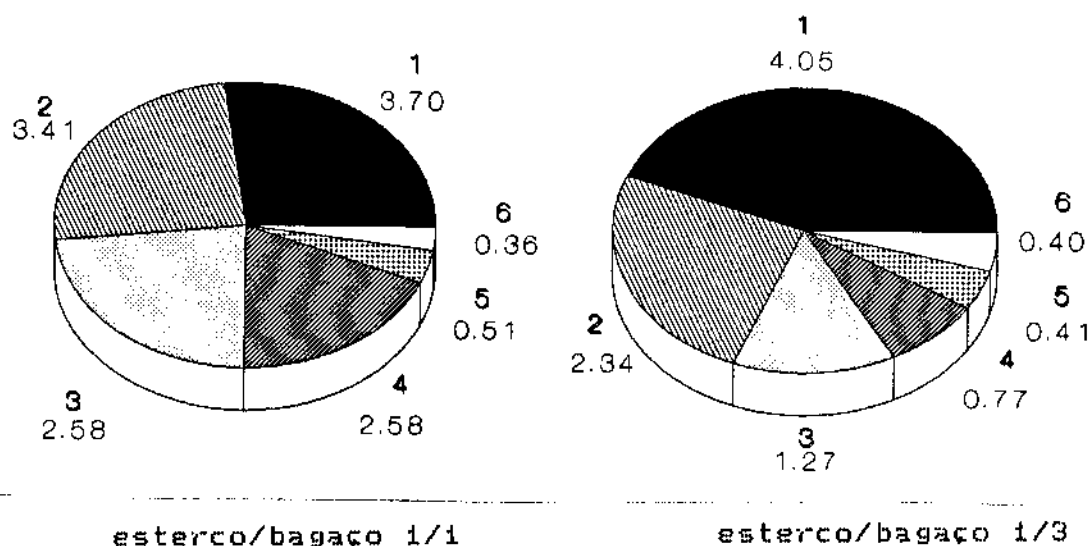
extratoras foi utilizada a sol. 0,5 M de NaOH para extração das frações húmicas.

Amostra original do material e amostra dos 46 e 86 dias após a implantação do experimento foram utilizadas a partir da relação amostra/extrator de 1:40. As amostras após 1 hora de contato com o extrator foram centrifugadas a 6000 rpm (SCHINETZER *et al.* 1981) por 15 min a 25°C. A fração húmica (AH + AF), solúvel em álcali, foi filtrada em papel de filtro (Whatman número 40) e recolhido para análise de C.

1.1.7.a. Número de extrações

O número de extrações por amostra foi determinado mediante teste preliminar em que foram realizadas um total de 6 extrações, a cada hora de contato com a sol. 0,5 M NaOH, sendo possível obter a seguinte distribuição:

% C frações húmicas totais



Este teste é um indicativo de que 4 repetidas extrações são suficientes para permitir eficiente extração (além de que é um processo extremamente laborioso tantas extrações), e a partir da 4ª extração já ocorre uma estabilização do conteúdo de C extraído.

1.1.7.b. Separação dos ácidos húmicos e ácidos fúlvicos

Alíquota de 25 ml das soluções extraídas (fração húmica total) foi acidificada a pH 1,4 com H_2SO_4 6N, para precipitação do ácido húmico, e permaneceu 4 h em geladeira para facilitar a decantação. Após centrifugar este material a 1500 rpm a 10°C por 5 minutos e eliminar o sobrenadante, o precipitado foi redissolvido com sol. 0,5 M NaOH (ácidos húmicos), para determinação de C desta fração.

1.1.7.c. Determinação de C das frações extraídas

O C da fração húmica total e C dos ácidos húmicos foram dosados por ataque sulfocrômico. Com o objetivo de concentrar o C das alíquotas, estas foram secas em placa aquecedora. Sobre o resíduo húmico seco foi adicionado 10 ml de dicromato de potássio 2% em meio ácido e foi aquecido até a fervura, com o auxílio de um condensador. Após o resfriamento foi realizada a titulação com sulfato ferroso amoniacal.

1.1.7.d. Cálculo de C das amostras extraídas

1.7.4.a. Fração húmica total e ácidos húmicos

$$\% C = \frac{(Br - Tit) \times eq Fe^{2+} \times Vt}{10 \times \text{alíquota extrato} \times \text{peso seco amostra}} \times 100;$$

onde Br = volume gasto de sulfato ferroso amoniacal na titulação do branco, Tit volume gasto na titulação das amostras, Vt = volume total da solução extraída e alíquota do extrato = 5 ml ácidos húmicos e 25 ml fração húmica total.

OBS: 0,2 N de sulfato ferroso amoniacal equivale a 0,6 mg de C, logo foi feita a correção para a normalidade exata do sal utilizado na titulação.

ANEXO 2

ANEXO 2

2.2. Meios de cultura utilizados

2.2.1. Meio batata

Este meio foi utilizado para o crescimento de *A. diazotrophicus*, quando obtida, liofilizada, da coleção de culturas da EMBRAPA/CNPBS.

Para 1 litro

200 g batata

2,5 g ác. málico

2,5 g sacarose (açúcar cristal)

2 ml sol. micronutrientes para meio de cultura

Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH com pH 6,8-7,0

1 ml de vitamina de meio de cultura⁽¹⁾

(1) 10 mg biotina

20 mg pyrimidoxol - HCl

100 ml H₂O destilada

2.2.2. Meio LGI-P

O meio LGI-P foi utilizado para o reisolamento de *A. diazotrophicus* do composto onde foi inoculada: semi-sólido: permitiu a identificação da película característica de microaerofilismo e sólido: permitiu a identificação das colônias arredondadas de coloração alaranjada típica desta bactéria neste meio (Reis *et al.*, 1989).

Para 1 litro

10% de sacarose

0,5% de caldo de cana-de-açúcar

2 ml H_2HPO_4 sol 10%

6 ml KH_2PO_4 sol 10%

2 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sol 10%

2 ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ sol 1%

2 ml $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ sol 0,1%

1 ml $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ sol 1 %

5 ml azul de bromotimol sol 0,5% em 0,2% em 0,2 N de KOH

pH 5,5 ajustado com ácido acético

sólido: 25 g de agar

50 mg extrato de levedura

semi-sólido: 2 g de agar

sem extrato de levedura

ANEXO 3

QUADROS NÃO APRESENTADOS NO CAPÍTULO II

QUADRO 2.20 Massa seca (g) do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com *Acetobacter diazotrophicus*. (Média de 3 repetições). Experimento I.

Substrato:		Massa seca ⁽¹⁾			
Relação		época de amostragem			
esterco/bagaço	minhoca	60 dias		120 dias	
p/p		g			
		i ⁽²⁾	ni	i	ni
0:1	com	409,0	383,2	358,0	379,5
	sem	363,0	412,0	277,8	382,1
1:3	com	176,5	150,6	130,0	131,3
	sem	134,3	144,4	103,7	116,4
1:1	com	156,4	128,3	113,8	100,1
	sem	138,7	141,9	141,4	88,0
3:1	com	165,6	168,1	128,6	105,0
	sem	168,5	161,5	135,6	116,3
1:0	com	194,9	202,5	144,9	175,1
	sem	208,2	204,4	156,0	147,3
Média ⁽³⁾		210,8a		170,1b	

(1) Massa inicial = 500 g.

(2) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(3) Médias diferem de 5% de probabilidade de acordo com os valores de F.

QUADRO 2.21 Massa seca (g) do composto com e sem minhoca, inoculado e não inoculado com a bactéria fixadora de N₂, *Acetobacter diazotrophicus*. (Média de 3 repetições). Experimento II.

Substrato:	Massa seca							
Relação	época de amostragem							
esterco/bagaço minhoca	Inicial	21 dias	46 dias	86 dias				
v/v	g							
	i ⁽¹⁾	ni	i	ni	i	ni	i	ni
1:3	com 97,1	85,4	79,1	78,1	62,1	63,9	61,0	52,1
	sem 95,8	104,2	79,3	77,8	63,9	72,4	58,3	56,7
1:1	com 98,4	91,6	78,8	77,2	65,4	63,5	43,2	49,4
	sem 97,3	95,8	76,4	77,4	63,9	62,3	54,8	43,4
Média ⁽²⁾	91,7a		78,1b		64,7c		52,4d	
CV (%)							12,1	

(1) i = inoculado com *A. diazotrophicus*, ni = não inoculado com *A. diazotrophicus*.

(2) Médias acompanhadas de mesma letra na mesma linha não diferem entre si significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

ANEXO 4

QUADRO 3.1 Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 1.1 - Experimento I
QUADRO 1.2 - Experimento II. (Valores transformados por raiz de $X + 1$)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Minhocas jovens	Casulos	Minhocas adultas
Valores de F				
Experimento I				
Repetição	2	3,2*	3,5*	5,3*
Substrato (S)	4	216,0*	18,8*	57,9*
Bactéria (B)	1	0,0ns	1,7ns	0,9ns
S x B	4	0,5ns	0,8ns	0,5ns
Resíduo	18			
época de amostragem (E)	1	139,2*	6,4*	29,3*
S x E	4	26,9*	1,8	6,2*
B x E	1	1,2ns	1,1ns	0,1ns
S x B x E	4	2,2ns	1,5ns	0,5ns
Resíduo	20			
CV (%)		27,8	35,0	21,7
Experimento II				
Repetição	2	2,2ns	1,6ns	
época de amostragem (E)	2	86,5*	3,9*	
Substrato (S)	1	0,8ns	19,3*	
S x E	2	0,4ns	1,3ns	
Bactéria (B)	1	0,1ns	0,1ns	
B x E	2	0,6ns	1,7ns	
S x B	1	0,0ns	0,7ns	
S x B x E	2	0,5ns	0,7ns	
Resíduo	22			
CV (%)		28,0	24,7	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 3.2. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.1 (%C), QUADRO 2.9 (%N), QUADRO 2.15 (Relação C/N), QUADRO 2.33 (pH) e QUADRO 2.20 (Massa seca)- Experimento I

Fonte de variação	Graus de Liberdade	% C	% N	Relação C/N	pH
Valores de F					
Repetição	2	0,8ns	6,2*	0,9ns	0,5ns
Substrato (S)	4	29,2*	144,4*	67,6*	10,0*
Minhoca (M)	1	9,0*	0,1ns	0,1ns	4,0*
S x M	4	1,6ns	1,3 n	2,1ns	2,5ns
Bactéria (B)	1	0,1ns	0,1ns	0,1ns	1,5ns
S x B	4	4,6*	0,8ns	0,1ns	4,5*
M x B	1	3,1**	1,6ns	0,4ns	0,7ns
S x M x B	4	1,3ns	0,4ns	1,2ns	7,2*
Resíduo	38				
Época de amostragem (E)	1	2344,7*	102,8*	47,6*	150,0*
S x E	4	7,3*	11,0*	11,44*	21,2*
M x E	1	0,4ns	0,9ns	2,2ns	1,2ns
S x M x E	4	0,2ns	2,3ns	5,0*	10,9*
B x E	1	0,3ns	2,9ns	2,3ns	0,0ns
S x B x E	4	0,4ns	0,2ns	1,6ns	3,7*
M x B x E	1	0,5ns	1,6ns	0,8ns	2,1ns
S x M x B x E	4	0,8ns	1,2ns	0,9ns	3,5*
Resíduo	40				
CV (%)		7,3	17,6	45,30	4,0

* Significativo ao nível de 5% probabilidade,
ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 3.3 Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.7 (%N), QUADRO 2.2 (%C), QUADRO 2.19 (Relação C/N), QUADRO 2.29 (pH) e QUADRO 2.21 (Massa seca) - Experimento II

Fonte de variação	Graus de Liberdade	% N	% C	Relação C/N	pH
Valores de F					
Repetição	2	1,6ns	1,9ns	4,1*	3,5*
Substrato (S)	1	490,3*	212,9*	449,7*	124,8*
Bactéria (B)	1	0,3ns	2,5ns	0,2ns	5,1*
S x B	1	5,3*	0,0ns	1,7ns	0,1ns
Minhoca (M)	1	0,7ns	1,6*	6,1*	2,6ns
S x M	1	5,7*	0,1ns	6,8*	0,5ns
B x M	1	0,2ns	1,6ns	3,1ns	0,6ns
S x B x M	1	3,2ns	0,0ns	2,9*	1,0ns
época de amostragem(E)	2	50,4*	20,0*	47,9*	47,3*
S x E	2	0,4ns	2,8ns	7,4*	0,3*
B x E	2	1,2ns	1,0ns	3,5*	2,2ns
S x B x E	2	1,4ns	5,9*	5,4*	0,2ns
M x E	2	0,8ns	1,7ns	0,9ns	0,9ns
S x M x E	2	0,0ns	1,9ns	1,1ns	0,1ns
B x M x E	2	1,6ns	1,0ns	1,4ns	0,2ns
S x B x M x E	2	0,2ns	0,3ns	0,3ns	1,1ns
Resíduo	46				
CV (%)		7,8	4,4	11,7	3,4

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 3.4. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.34 - Experimento I -

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Evolução de CO ₂
Valores de F		
Repetição	2	4,1*
Substrato (S)	4	27,8*
Bactéria (B)	1	1,2ns
S x B	4	1,5ns
Minhoca (M)	1	0,0ns
S x M	4	0,4ns
B x M	1	1,3ns
S x B x M	4	2,1ns
Resíduo	38	
Épocas de amostragens (E)	1	56,9*
S x E	4	5,2*
B x E	1	3,7*
S x B x E	4	1,0ns
M x E	1	0,7ns
S x M x E	4	0,3ns
B x M x E	1	2,9ns
S x B x M x E	4	0,5ns
Resíduo	40	
CV (%)		30,2

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade

QUADRO 3.5. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.35 - Experimento II

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Evolução de CO ₂

		Valores de F
Repetição	2	0,3ns
Substrato (S)	1	2,2ns
Bactéria (B)	1	0,8ns
S x B	1	0,1ns
Minhoca (M)	1	0,0ns
S x M	1	3,0ns
B x M	1	1,7ns
S x B x M	1	0,7ns
Época de amostragem(E)	1	152,1*
S x E	1	1,9ns
B x E	1	0,8ns
S x B x E	1	0,0ns
M x E	1	0,0ns
S x M x E	1	2,5ns
B x M x E	1	1,7ns
S x B x M x E	1	0,9ns
Resíduo	30	
CV (%)		19,3

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade..

QUADRO 3.6. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.26. - Experimento I

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Atividade da nitrogenase

		Valores de F
Repetição	1	0,9ns
Substrato	4	1,1ns
Minhoca (M)	1	0,8ns
S x M	4	1,3ns
Bactéria (B)	1	1,2ns
S x B	4	0,9ns
M x B	1	1,0ns
S x M x B	4	1,1ns
Resíduo	19	
Época de amostragem (E)	1	1,7ns
S x E	4	1,1ns
M x E	1	0,8ns
S x M x E	4	1,2ns
B x E	1	1,1ns
S x B x E	4	0,9ns
M x B x E	1	0,8ns
S x M x B x E	4	1,1ns
Resíduo	20	
CV (%)		598,4

ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 3.7. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.27 - Experimento II

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Atividade da nitrogenase
Valores de F		
Repetição	2	1,6ns
Substrato (S)	1	0,8ns
Bactéria	1	0,4ns
S x B	1	0,7ns
Minhoca (M)	1	0,4ns
S x M	1	1,4ns
B x M	1	1,3ns
S x B x M	1	0,9ns
época de amostragem(E)	2	1,7ns
S x E	2	1,3ns
B x E	2	0,9ns
S x B x E	2	0,4ns
M x E	2	0,9ns
S x M x E	2	0,9ns
B x M x E	2	0,8ns
S x B M x E	2	1,4ns
Resíduo	46	
CV (%)		510,9

ns = não significativo

QUADRO 3.8. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.24 - Experimento II -

Fonte de variação	Graus de liberdade	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos
Valores de F			
Repetição	2	15,0*	8,9*
Substrato (S)	1	56,0*	11,3*
Bactéria	1	2,3ns	3,1ns
S x B	1	0,1ns	0,2ns
Minhoca (M)	1	1,3ns	0,1ns
S x M	1	1,0ns	0,0ns
B x M	1	1,2ns	0,5ns
S x B x M	1	2,8ns	0,2ns
época de amostragem(E)	3	0,0ns	0,9ns
S x E	3	0,9ns	0,7ns
B x E	3	0,1ns	2,5ns
M x B x E	3	0,0ns	1,4ns
M x E	3	0,1ns	0,4ns
S x M x E	3	2,1ns	0,1ns
B x E	3	0,0ns	0,1ns
S x B x M x E	3	4,3*	0,0ns
Resíduo	62		
CV (%)		25,1	35,7

* Significativo a nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo a 5% de probabilidade.

QUADRO 3.9. Análise de variância relativa aos dados apresentados no QUADRO 2.25 - Experimento II -

Fonte de variação	Graus de liberdade	AH/AF	Taxa de extração	AH + AF
Valores de F				
Repetição	2	2,2*	10,6*	2,2ns
Substrato (S)	1	50,0*	8,4*	50,0*
Bactéria	1	6,3*	1,3ns	6,3*
S x B	1	0,1ns	0,0ns	0,1ns
Minhoca (M)	1	0,1ns	0,8ns	0,1ns
S x M	1	0,3ns	0,4ns	0,3ns
B x M	1	2,0ns	0,3ns	2,0ns
S x B x M	1	0,1ns	1,6ns	0,1ns
época de amostragem(E)	3	0,9ns	31,3*	0,9ns
S x E	3	1,7ns	0,9ns	1,7ns
B x E	3	3,1ns	2,5ns	3,1ns
S x B x E	3	1,6ns	0,3ns	1,6ns
M x E	3	0,8ns	0,3ns	0,8ns
S x M x E	3	1,3ns	0,4ns	1,3ns
B x E	3	0,2ns	0,1ns	0,2ns
S x B M x E	3	0,9ns	0,4ns	0,9ns
Resíduo	62			
CV (%)		115,3	13,3	20,7

* Significativo a nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo a 5% de probabilidade.

QUADRO 3.10. Análise de variância relativa ao item 5
- Experimento I -

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Graus de compostagem

		Valores de F
Repetição	1	1,2ns
Substrato	4	185,6*
Minhoca (M)	1	16,9*
S x M	4	4,8*
Bactéria (B)	1	2,6ns
S x B	4	0,4ns
M x B	1	4,3*
S x M x B	4	1,2ns
Resíduo	19	
época de amostragem (E)	1	734,7*
S x E	4	17,6*
M x E	1	10,1*
S x M x E	4	1,5ns
B x E	1	0,7ns
B x E	4	0,4ns
M x B x E	1	4,8*
S x M x B x E	4	0,6ns
Resíduo	20	
CV (%)		15,6

* significativo a nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo.

QUADRO 3.11. Análise de variância relativa ao item 5
- Experimento II -

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Volume total

		Valores de F
Repetição	2	2,1ns
Substrato (S)	1	40,82*
Bactéria (B)	1	0,0ns
S x B	1	2,7ns
Minhoca (M)	1	33,9*
S x M	1	1,3ns
B x M	1	0,0ns
S x B x M	1	3,4*
época de amostragem (E)	3	110,6*
S x E	3	11,6*
B x E	3	1,4ns
S x B x E	3	0,4ns
M x E	3	8,3*
S x M x E	3	0,5ns
B x M x E	3	3,5*
S x B x M x E	3	1,0ns
Resíduo	62	
CV (%)		7,4

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade,
ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.