

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

VICTOR MAURÍCIO DA SILVA

**ARTRÓPODES DA CLASSE DIPLOPODA: QUALIDADE E ATRIBUTOS DO
SOLO E DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE CAFEIEIRO**

ALEGRE - ES

2017

VICTOR MAURÍCIO DA SILVA

**ARTRÓPODES DA CLASSE DIPLOPODA: QUALIDADE E ATRIBUTOS DO
SOLO E DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE CAFEIEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal – Solos e Nutrição de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Renato Ribeiro Passos

Coorientador: Prof. PhD. Eduardo de Sá Mendonça

ALEGRE - ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S586a Silva, Victor Maurício da, 1985-
Artrópodes da classe Diplopoda: qualidade e atributos do solo e decomposição de resíduos de cafeeiro / Victor Maurício da Silva. – 2017.
119 f. : il.

Orientador: Renato Ribeiro Passos.

Coorientador: Eduardo de Sá Mendonça.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Biologia do solo. 2. Animais do solo. 3. Milípede. 4. Solos – Agregação. 5. Solos – Uso. 6. Decomposição. I. Passos, Renato Ribeiro. II. Mendonça, Eduardo de Sá. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 63

VICTOR MAURÍCIO DA SILVA

**ARTRÓPODES DA CLASSE DIPLOPODA: QUALIDADE E ATRIBUTOS DO
SOLO E DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE CAFEIEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, na linha de pesquisa em Solos e Nutrição de Plantas.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Renato Ribeiro Passos
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. PhD. Eduardo de Sá Mendonça
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador

Prof. Dr. Demetrius Profeti
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Felipe Vaz Andrade
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Otacílio José Passos Rangel
Instituto Federal do Espírito Santo

Aos meus pais, Vanderlei e Marinete

A minha irmã, Maria Izabel

A minha esposa, Ericka

A minha filha, Maria Cecília

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada momento vivido e cada aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES, pela concessão de bolsa de Pós-Graduação.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - INCAPER, na pessoa do Alex Fabian Rabelo Teixeira, devido ao apoio para as realizações dos trabalhos de campo.

À equipe do Laboratório de Solos da UFES, pelo apoio na realização das análises de solo. Aos professores e colegas do Laboratório de Biologia do Solo da Universidade Federal de Santa Maria, RS, em especial a Prof.^a Zaida I. Antonioli e Prof. Rodrigo J. S. Jacques, pela amizade, oportunidade de estudo e aprendizado em 2014/01.

Ao meu orientador Prof. Renato Ribeiro Passos e co-orientador Prof. Eduardo de Sá Mendonça, pelos cruciais ensinamentos, amizade e apoio aos meus objetivos profissionais.

Ao agricultor e Agrônomo Wanderlei Morgan e família pelo apoio e disponibilização das áreas do estudo de campo.

Aos meus pais, Vanderlei e Marinete, e a minha querida irmã, M^a Izabel, pelo enorme carinho e apoio incondicional.

À minha esposa Ericka por estar sempre ao meu lado e me apoiar durante todo o doutorado.

As amigas que eu fiz em Alegre-ES, em especial ao Amilton, Elias, Paulo Henrique (PH), Acácio, Paulo Roberto (Paulinho), Neto, Namara, João Paulo, Gabriel, Ramires, Walas, Felipe Gaspari, Cássio Henrique, Danilo (Lampião), Eduardo (Dudu), Fabiano, Camila, Patrícia, Stéfanie, Tamara, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Demetrius Profeti, pelos ensinamentos nas análises de Infravermelho.

Agradeço também aos professores e técnicos do Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF pela realização das análises de lignina, celulose e polifenóis do presente estudo.

Ao Pesquisador Ricardo Ott e a mestrande Patrícia Elesbão da Silva Rodrigues, pela identificação taxonômica dos diplópodes (Diplopoda) do estudo.

À Embrapa Solos, na pessoa do pesquisador Guilherme Kangussú Donagemma, pela realização das análises CHN.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	8
GENERAL ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 ASPECTOS GERAIS	12
1.2 OBJETIVOS GERAIS E ESTRUTURAÇÃO DA TESE	13
CAPÍTULO 1	14
1. INTRODUCTION	15
2. MATERIALS AND METHODS	18
2.1. INCUBATION EXPERIMENT WITH <i>Glyphiulus granulatus</i>	18
2.2. EVALUATION AFTER 28 DAYS OF INCUBATION	20
2.3. STATISTICAL ANALYSES	22
3. RESULTS	22
4. DISCUSSION	25
4.1 FORMATION OF AGGREGATES	25
4.2. TOTAL SOIL CARBON AND NITROGEN	26
4.3. PHOSPHORUS FRACTIONS	26
4.4. EXTRACELLULAR ENZYMATIC ACTIVITY	28
5. CONCLUSIONS	29
CAPÍTULO 2	30
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. EXPERIMENTO DE INCUBAÇÃO COM <i>Rhinocricus botocudus</i> E <i>Eisenia andrei</i>	34
2.2. EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	36
2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	37
2.4. ANÁLISES DE CARBONO E NITROGÊNIO	37
2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
3. RESULTADOS	38
3.1. COT, CSA E RELAÇÕES $C/N_{sólida}$ E $C/N_{solúvel}$ DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE RC + EB	38
3.2. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	40
3.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	41
4. DISCUSSÃO	44
4.1. COT, CSA E RELAÇÕES $C/N_{sólida}$ E $C/N_{solúvel}$ DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE RC + EB	44
4.2. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	46
4.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	47
4. CONCLUSÕES	49

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	51
CAPÍTULO 3	53
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1. EXPERIMENTO DE INCUBAÇÃO COM <i>Rhinocricus botocudus</i>	57
2.2. EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	59
2.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	59
2.4. MATÉRIA ORGÂNICA (MO), LIGNINA, CELULOSE, C ORGÂNICO TOTAL (COT) E N TOTAL (NT).....	60
2.5. C SOLÚVEL EM ÁGUA (CSA), N SOLÚVEL EM ÁGUA (NS) E POLIFENÓIS SOLÚVEIS (PS)	60
2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
3. RESULTADOS	61
3.1. EVOLUÇÃO DA MO, COT, NT, LIGNINA E CELULOSE DURANTE A INCUBAÇÃO DO RC	61
3.2. EVOLUÇÃO DO C SOLÚVEL EM ÁGUA (CSA), C/N _{solúvel} E POLIFENÓIS SOLÚVEIS	62
3.3. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH)	64
3.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	66
4. DISCUSSÃO	67
4.1. EVOLUÇÃO DA MO, COT, NT, LIGNINA E CELULOSE DURANTE A INCUBAÇÃO DO RC.....	67
4.2. EVOLUÇÃO DO C SOLÚVEL EM ÁGUA (CSA), C/N _{solúvel} E POLIFENÓIS SOLÚVEIS	69
4.3. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH)	71
4.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	72
5. CONCLUSÕES	72
INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	74
CAPÍTULO 4	76
1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1. ÁREA DE ESTUDO.....	79
2.2. AMOSTRAGENS E ANÁLISES	81
2.3. ANÁLISE DOS DADOS	83
3. RESULTADOS	84
3.1. PERÍODO SECO (1ª COLETA).....	84
3.2. PERÍODO CHUVOSO (2ª COLETA).....	88
4. DISCUSSÃO	91
4.1. PERÍODO SECO (1ª COLETA).....	91
4.2. PERÍODO CHUVOSO (2ª COLETA).....	94

5. CONCLUSÕES	96
INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
REFERÊNCIAS	102

RESUMO GERAL

SILVA, Victor Maurício da, D.r, Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2017. **Artrópodes da classe Diplopoda: qualidade e atributos do solo e decomposição de resíduos de cafeeiro**. Orientador: Renato Ribeiro Passos. Co-orientador: Eduardo de Sá Mendonça.

Os milípedes (Classe Diplopoda) são organismos da macrofauna edáfica importantes para a decomposição dos resíduos orgânicos aportados ao solo e também podem ser utilizados como indicadores de qualidade do solo. No entanto, estudos com esses organismos em regiões tropicais são incipientes. Nesse contexto, a presente tese se encontra estruturada em quatro capítulos. O Capítulo 1 se refere a um estudo de laboratório que avaliou o efeito de densidades populacionais crescentes do milípede tropical *Glyphiulus granulatus* sobre agregação, atividade enzimática e frações de P do solo. Os Capítulos 2 e 3 também foram desenvolvidos em condições de laboratório, e ambos utilizaram a espécie de milípede tropical *Rhinocricus botocudus*. Além dessa espécie de milípede, no Capítulo 2 foi utilizada a minhoca *Eisenia andrei* para avaliar a maturidade de uma mistura de esterco bovino e resíduos de cafeeiro (folhas e galhos < 5 mm de diâmetro) (1:1, v:v), ao longo de 120 dias de incubação. No Capítulo 3 foi investigado o potencial de *R. botocudus* na degradação e maturidade apenas dos resíduos de cafeeiro. No Capítulo 4 foi abordado o efeito de coberturas vegetais sobre a macrofauna epigeica e comunidades de milípedes por meio de relações com atributos de solo e serapilheira. O Capítulo 1 demonstrou que o aumento das densidades populacionais de *G. granulatus* otimizou a formação de agregados do solo entre 2,00-4,76 mm e reduziu agregados entre 1,00-2,00 mm. Além disso, a atividade da enzima extracelular β -glicosidase no solo foi potencializada nas maiores densidades de *G. granulatus* (6 e 12 milípedes por microcosmo). No Capítulo 2, por meio da análise de infravermelho em ácidos húmicos e fúlvicos, foram demonstradas reduções em moléculas orgânicas alifáticas e incrementos em grupos aromáticos ao longo de 120 dias de incubação dos resíduos orgânicos. Independentemente da presença de milípedes *R. botocudus*, essas alterações foram mais pronunciadas nos tratamentos com a presença de minhocas *E. andrei*, o que demonstra que essa espécie de minhoca otimizou a maturidade da mistura esterco mais resíduos de cafeeiro. O Capítulo 3 demonstrou que ao final de 120 dias de incubação dos resíduos de cafeeiro, o tratamento com *R. botocudus* comparado ao controle apresentou menores valores de celulose (366 e 290 g kg⁻¹ no controle e com milípede, respectivamente), e da relação celulose/lignina (0,92 e 0,63 no controle e com milípede, respectivamente), o que ressalta o potencial dessa espécie de

milípede para a degradação de componentes estruturais dos resíduos de cafeeiro. O Capítulo 4 demonstrou que no período seco a inserção do cedro australiano (*Toona ciliata*) com cafeeiros (*Coffea canephora*) melhorou a diversidade da comunidade de milípedes comparado ao sistema de cafeeiros em monocultivo, sendo que apresentaram valores para diversidade de Shannon (H') de 0,46 e 0,25, respectivamente. Por outro lado, em todos sistemas de cultivos ocorreram reduções da diversidade de milípedes entre períodos sazonais, e o fragmento de mata Atlântica nativa utilizado como referência demonstrou manutenção da diversidade entre períodos, o que reforça a baixa capacidade de suporte das comunidades edáficas nos agroecossistemas estudados.

Palavras-chave: Biologia do solo, fauna do solo, Diplopoda, agregação do solo, decomposição, solo - uso.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Victor Maurício da, D.r, Universidade Federal do Espírito Santo, february 2016. **Arthropods of Diplopoda Class: soil quality and attributes and coffee plants residue decomposition.** Adviser: Renato Ribeiro Passos. Co-Adviser: Eduardo de Sá Mendonça.

The millipedes (Diplopoda Class) are organisms of the edaphic macrofauna important for the decomposition of organic residues deposited in soil and can also be used as indicators of soil quality. However, studies with these organisms in tropical regions are incipient. In this context, this thesis is structured in four chapters. The Chapter 1 refers to a study of laboratory that evaluated the effect of increasing population densities of the tropical millipede *Glyphiulus granulatus* on aggregation, enzymatic activity and soil P fractions. The Chapters 2 and 3 were also developed under laboratory conditions, and both used the tropical millipede species *Rhinocricus botocudus*. In Chapter 2 was used also the earthworm *Eisenia andrei* to evaluate the maturity of a mixture of cattle manure and coffee plants residues (leaves and branches < 5 mm in diameter) (1: 1, v: v) along of 120 days of incubation. In Chapter 3 was study the potential of *R. botocudus* in the degradation and maturity of coffee plant residues. In Chapter 4 the effect of vegetation cover on epigeic macrofauna and millipede communities was discussed through relationships with soil and litter attributes. The Chapter 1 showed that the increase in population densities of *G. granulatus* optimized the formation of soil aggregates between 2.00-4.76 mm and reduced the aggregates between 1.00-2.00 mm. In addition, the activity of β -glycosidase soil enzyme was increased at the highest densities of *G. granulatus* (6 and 12 millipedes per microcosm). In Chapter 2, through infrared analysis in humic and fulvic acids, were demonstrated reductions in aliphatic organic molecules and increases in aromatic groups during 120 days of incubation of the organic residues. Regardless of the presence of *R. botocudus* millipedes, these changes were more pronounced with the presence of *E. andrei* earthworms, which demonstrates that this earthworm species optimized the maturity of the cattle manure + coffee residue. The Chapter 3 demonstrated that in the end of 120 days of the incubation of coffee plant residues, the treatment with *R. botocudus* compared to the control had lower values of cellulose (366 and 290 g kg⁻¹ in the control and with millipede, respectively), and lower values of cellulose/lignina ratio (0.92 and 0.63 in the control and with millipede, respectively). These results highlight the potential of this millipede species for the degradation of structural components of coffee plant residues. In the dry period, the insertion of the Australian cedar plants (*Toona ciliata*)

with coffee plants (*Coffea canephora*) improved the diversity of the millipede community compared to the coffee plants monoculture system, and presented values for diversity of Shannon (H') of 0.46 and 0.25, respectively. On the other hand, in all agroecosystems there were reductions in the diversity of millipedes between seasonal periods, and the fragment of native Atlantic forest used as the study reference demonstrated the maintenance of diversity between periods. These results reinforces the low support capacity of the edaphic communities in the studied agroecosystems.

Keywords: Soil biology, soil fauna, Diplopoda, soil aggregation, decomposition, soil - use.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ASPECTOS GERAIS

A fauna edáfica compreende invertebrados terrestres que habitam ou possuem alguma fase do seu ciclo de vida associada ao compartimento serapilheira-solo (BARDGETT, 2005). Dentro da Biologia do Solo esses organismos podem ser classificados de diferentes formas, entretanto a mais usual é por meio das dimensões corporais, sendo micro, meso e macrofauna. Em relação a largura corporal, a microfauna contempla invertebrados de 4 a 100 μm (e.g., nematóides, protozoários); a mesofauna compreende os organismos entre 101 μm a 2 mm (e.g., ácaros, colêmbolos, enquitreídeos); e a macrofauna se refere aos invertebrados entre 2,1 a 20 mm (SWIFT *et al.*, 1979; CORREIA; ANDRADE, 2008).

A importância da macrofauna edáfica reside em suas funções exercidas no solo, e, muitas dessas funções, estão relacionadas aos seus hábitos tróficos e comportamentais. Por meio das suas diferentes atividades (e.g., nidificação, construção de galerias, nutrição), a macrofauna pode alterar atributos químicos, físicos e microbiológicos do solo (KASCHUK *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2011; YVAN *et al.*, 2012), resultando, na maioria das vezes, em modificações importantes no crescimento de plantas (BARROS *et al.*, 2004). Além disso, a decomposição da matéria orgânica é exclusivamente biológica, dependendo principalmente dos microrganismos e da fauna para a desestruturação físico-química dos resíduos aportados ao solo (CORREIA; ANDRADE, 2008). Ressalta-se que diante da sensibilidade da fauna frente aos diferentes tipos de uso e manejo do solo, a mesma é considerada excelente ferramenta indicadora de qualidade do solo (LAVELLE; SPAIN, 2001; BARROS *et al.*, 2002). Por outro lado, em manejos inadequados, alguns táxons podem se tornar indesejáveis, ocasionando perdas econômicas aos agricultores.

Dentro da macrofauna, destacam-se os milípedes (Classe Diplopoda), conhecidos como piolho de cobra ou gongolo, que compreendem 10.000 espécies descritas, sendo o maior táxon dentre os Myriapoda (subfilo dos artrópodes). Os especialistas estimam que possam existir quase 80.000 espécies viventes (RUPPERT *et al.*, 2005). Esses organismos são importantes para a decomposição, uma vez que a maioria das espécies se alimenta de resíduos de plantas, favorecendo, conseqüentemente, a atuação bioquímica microbiana (RAWLINS *et al.*, 2006). Dessa forma, os milípedes representam de maneira eficiente a

atividade da fauna detritívora do solo, por constituírem um grupo que se alimenta basicamente de resíduos orgânicos provenientes de diversas espécies vegetais (RUPPERT *et al.*, 2005; BIANCHI; CORREIA, 2007).

1.2 OBJETIVOS GERAIS E ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Diante da importância exposta para a macrofauna, em especial para artrópodes da Classe Diplopoda, foram traçados quatro objetivos: (i) avaliar o efeito da atividade do milípede tropical *Glyphiulus granulatus* sobre agregação, atividade enzimática e frações de P do solo; (ii) investigar a eficácia do milípede tropical *Rhinocricus botocudus* e da minhoca epigéica *Eisenia andrei*, assim como a associação desses invertebrados, sobre a maturidade de uma mistura de esterco bovino e resíduo de cafeeiros (folhas e ramos < 5 mm de diâmetro); (iii) verificar a eficácia do milípede tropical *Rhinocricus botocudus* sobre a degradação e maturidade de resíduo de cafeeiros; e (iv) avaliar o efeito de coberturas vegetais sobre a macrofauna epigeica e comunidades de milípedes por meio de relações com atributos de solo e de serapilheira.

Embasada nos objetivos, a tese se encontra estruturada em quatro capítulos. O Capítulo 1 se trata de um estudo de laboratório que avaliou o efeito de densidades populacionais crescentes de *Glyphiulus granulatus* sobre atributos de solo de extrema importância para regiões tropicais e subtropicais (e.g., frações de P, agregados). Os Capítulos 2 e 3 também foram desenvolvidos em condições de laboratório e ambos utilizaram a espécie *Rhinocricus botocudus*. Além dessa espécie de milípede, no Capítulo 2 foi utilizada a minhoca *Eisenia andrei* (separadas e em conjunto) para estudar a maturidade de uma mistura de resíduo de café (folhas e galhos < 5 mm de diâmetro) e esterco bovino (1:1, v:v). Para isso, foram abordadas variáveis, tais como, relação C/N, relação C/N solúvel, análise de infravermelho e outras relevantes ao processo de decomposição, em diferentes estágios ao longo de 120 dias de incubação. No Capítulo 3 foi verificado o potencial de *R. botocudus* na degradação e maturidade de resíduo de cafeeiros. No Capítulo 4, é apresentada a caracterização da macrofauna que habita a superfície do solo (epigeica) sob diferentes coberturas vegetais. Além disso, nesse capítulo foram abordados índices de diversidade e equitabilidade das comunidades de milípedes sob a influência dessas coberturas vegetais.

CAPÍTULO 1

INFLUENCE OF THE TROPICAL MILLIPEDE, *Glyphiulus granulatus* (Gervais, 1847), ON AGGREGATION, ENZYMATIC ACTIVITY, AND PHOSPHORUS FRACTIONS IN THE SOIL¹

Victor Maurício da Silva^{a,*}, Zaida Inês Antonioli^b, Rodrigo Josemar Seminotti Jacques^b, Ricardo Ott^c, Patrícia Elesbão da Silva Rodrigues^c, Felipe Vaz Andrade^a, Renato Ribeiro Passos^a, Eduardo de Sá Mendonça^a

^a Department of Plant Production, Federal University of Espírito Santo (*Universidade Federal do Espírito Santo*), 29500-000, Alegre, State of Espírito Santo, Brazil. E-mails address: victormauriciodasilva@yahoo.com.br, felipevazandrade@gmail.com, renatoribeiropassos@hotmail.com, eduardo.mendonca@ufes.br

^b Department of Soil Science, Federal University of Santa Maria (*Universidade Federal de Santa Maria*), 97105-900, Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Brazil. E-mails address: zantonioli@gmail.com, rodrigo@ufsm.br

^c Zoobotânica Foundation of Rio Grande do Sul (*Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul*), 90690-000, Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. E-mails address: rott@fzb.rs.gov.br, patiesilva@yahoo.com.br

¹Published in the *Geoderma Journal* (Elsevier) - Access link:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706116309144>

* Corresponding author. Tel: +55 27 3373 3231, +55 27 99903 7277

E-mail address: victormauriciodasilva@yahoo.com.br (V.M. da Silva)

ABSTRACT

Soil macrofauna contribute to soil aggregation, as well as to enzymatic and nutrient dynamics in soils. Few studies have investigated the influence of millipede species from tropical regions on these soil variables. The objective of this study was to investigate the influence of the millipede *Glyphiulus granulatus* (Gervais, 1847), on aggregation, enzymatic activity, and phosphorus (P) fractions in a subtropical soil under controlled conditions. The present study was performed using 0, 2, 6, and 12 individuals per microcosm with five replicates of each density. After an incubation period of 28 days, the increase in *G. granulatus* population density reduced the proportion of aggregates between 1.00-2.00 mm ($y = 236.16 - 1.4921x$, $P < 0.05$). The aggregates between 1.00-2.00 and 2.00-4.76 mm were negatively correlated ($r = -0.95$, $P < 0.05$). The increase population densities resulted in increased nitrogen (N) levels in the soil. The greatest population density (12 millipedes per microcosm) increased soil N content by 7%. The activity of β -glycosidase increased with densities of 6 and 12 millipedes per microcosm as compared to the control. However, the acid phosphatase activity was reduced in the presence of the millipedes, particularly at high densities, reaching $341 \mu\text{g } p\text{-nitrophenol g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ while $489 \mu\text{g } p\text{-nitrophenol g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ was found in the control treatment. The millipedes had no influence on available inorganic P fractions ($\text{H}_2\text{O-Pi}$ and $\text{NaHCO}_3\text{-Pi}$). However, the amount of readily labile P ($\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Po}$) was greater at the highest millipede density (12 individuals) and was mainly related to the increase of $\text{NaHCO}_3\text{-Po}$. This indicated that the available P in soils may be conserved by cycling of organic P with high densities of such macroinvertebrates.

Keywords: detritivorous millipedes, macrofauna, chemical fractionation of phosphorus, P cycling, soil structure.

1. INTRODUCTION

Organisms from soil macrofauna including earthworms, ants, and termites, have a significant role in modifying chemical and physical attributes of soils, consequently being able to increase resource availability for other species (LAVELLE; SPAIN, 2001) and influence plant development (BARROS *et al.*, 2004; FIUZA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Through aggregates formed with their excrement, nest mounds, and

subterranean galleries, such organisms substantially transform soil attributes and processes (FAGERIA; BALIGAR, 2004; RÜCKAMP *et al.*, 2010; YVAN *et al.*, 2012). These biogenic structures reside for long periods and may influence other soil organisms. Due to these functions in the soil, they are collectively referred as “soil ecosystem engineers” (LAVELLE, 1997).

The class Diplopoda (millipedes) is a diverse group of land animals that constitute the third largest group within Arthropoda, following Insecta and Arachnida (GOLOVATCH *et al.*, 1995). They have diverse feeding behaviors; however, most of the species are considered soil detritivores (MINELLI; GOLOVATCH, 2001). They are common organisms of cosmopolitan distribution in the soil and litter but are especially profuse in tropical regions. The ability of this group to influence C and nutrients dynamics is attributed to initial fragmentation of organic residues due to their feeding activity. This process increases the specific surface area of organic residues and enhances the activity of microorganisms and mineralization processes (SCHEU; WOLTERS, 1991). Furthermore, their excrements differ from the litter on which they feed, showing typically higher pH (slightly acidic approaching neutral), greater water retention capacity, as well as higher microorganism content (ASHWINI; SRIDHAR, 2005). Some studies have demonstrated that millipedes can affect nutrients and C dynamics in soils (e.g., HASHIMOTO *et al.*, 2004; MAKOTO *et al.*, 2014).

Few studies have demonstrated the influence of millipedes on soil structure and most research has been performed with *Parafontaria* sp., a species from temperate regions (MAKOTO *et al.*, 2014). Their larvae feed on mineral particles associated to the organic matter in soils, and the adults feed on a mixture of mineral particles and fresh leaves from litter (HASHIMOTO *et al.*, 2004). Fujimaki *et al.* (2010) demonstrated that larvae of *Parafontaria laminata* promoted soil aggregation, increasing the proportion of aggregates > 2 mm with a positive correlation of these aggregates to the number of millipedes. Despite the importance of such studies, the availability of literature evaluating the effect of soil aggregation by millipede species originating from tropical and subtropical regions is limited.

In agricultural and natural systems, soil organic residue decomposition and mineralization processes are controlled by three main factors: (1) environmental physico-chemical conditions, which are controlled by climate and regional edaphic conditions; (2) vegetation type, which influences the material quality and its degradability; and (3) by

the nature of the decomposer community, microorganisms and edaphic fauna (CORREIA; ANDRADE, 2008).

Soil macrofauna is the main agent responsible for the initial fragmentation of organic residues (LAVELLE, 1997; CORREIA; ANDRADE, 2008). While microorganisms degrade organic compounds and provide inorganic nutrients to the soil solution through their capacity to produce enzymes, they are also able to immobilize such nutrients in their biomass (DICK *et al.*, 1996; WU *et al.*, 2015). Extracellular enzymes are responsible for both mineralization of soil nutrients and degradation of complex organic compounds into simpler molecules (DON *et al.*, 2008; ERNST *et al.*, 2009). For example, β -glycosidase contributes to cellulose breakdown by hydrolyzing cellobiose to form glucose, and phosphatase is involved in the hydrolysis of compounds containing organic P (DICK *et al.*, 1996).

Due to the importance of nutrient cycling in agricultural and natural systems, the influence of edaphic macroinvertebrates on enzymatic activity has been studied previously (e.g., MORA *et al.*, 2005; CROWTHER *et al.*, 2011). The functional diversity of biogenic structure enzymes produced by earthworms, ants, and termites is related to differences among species and not to differences among taxonomic groups (MORA *et al.*, 2005). When compared to other edaphic invertebrates, the information available concerning the influence of millipedes on soil enzymatic activity is scarce.

Phosphorus (P) is one of the most limiting elements for agricultural production in tropical and subtropical regions. In such areas, mineralogy influenced by high weathering, facilitates strong adsorption of this element in the soil clay fraction, thus, the highest portion of P remains in the non-labile fraction (NOVAIS *et al.*, 2007).

In order to comprehend soil P dynamics, it is essential to understand the modifications occurring within different soil fractions. The residence time of this element in the soil solution is determined by its interactions with mineral particles, stabilization by organic matter, and association in organic-mineral complexes (KRISTIANSEN *et al.*, 2001). In a laboratory study aiming to evaluate the impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758) on soil P dynamics, the available P (Olsen-P) was higher in the excrements in comparison to gallery coatings and the control soil (without earthworms), which was independent of the treatment (with or without organic matter) or incubation period (LE BAYON; BINET, 2006). Considering only the treatment without supply of exogenous organic matter, the content of Olsen-P in the soil was $64 \mu\text{g g}^{-1}$, but

doubled to a value of $130 \mu\text{g g}^{-1}$ in the excrements after migrating through the gut of the earthworms. Although some studies emphasize the influence of invertebrates on the soil P dynamics (KAISER; LUSSENHOP, 1991; LOPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 1993), studies with detritivorous millipedes and P fractions in tropical and subtropical soils are lacking.

Glyphiulus granulatus (Glyphiulidae) is a pantropical species of likely Asiatic origin. It is relatively small sized (13 segments) with adults reaching 10-18 mm in length and 0.6-0.9 mm in width (GOLOVATCH *et al.*, 2007). Like most millipedes, *G. granulatus* is a detritivorous species, feeding on organic residue at different decomposition stages. Compared to other species, the millipede *G. granulatus* has a relatively small size associated with fast development and a high reproduction rate (GOLOVATCH *et al.*, 2007). Such characteristics may help this species to dominate edaphic invertebrate communities in tropical regions. Thus, the objective of the presented study was to investigate the effect of the millipede *G. granulatus* (Gervais, 1847) on aggregation, enzymatic activity, and P fractions in subtropical soil. Our hypothesis was that activity of this species in the soil increases aggregate proportions > 2 mm, enzymatic activity, and available P fractions.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. INCUBATION EXPERIMENT WITH *Glyphiulus granulatus*

The incubation experiment was conducted under laboratory conditions with adult *G. granulatus* specimens. In April 2014, a large number of specimens were collected at the Federal University of Santa Maria's Campus, in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil ($29^{\circ} 42' \text{ S}$, $53^{\circ} 42' \text{ W}$). At the sampling location, the population density of millipedes ranged from 0 to 594 individuals per m^2 with a maximum dry weight of $2,500 \text{ mg m}^{-2}$. The soil was classified as Udalf (SOIL SURVEY STAFF, 2010). The climate was classified as Cfa, i.e. humid subtropical with regular rainfall throughout the whole year (1500 to 1750 mm).

The soil used in the experiment was classified as Typic Argiudoll (SOIL SURVEY STAFF, 2010) and was collected from a natural pasture at 0-20 cm of depth. This soil was selected for the study since it had a set of desirable characteristics. For

example, it was regionally representative and was less anthropized under native vegetation. Furthermore, this soil had low organic matter levels (Table 1), which was desirable because it would prevent a naturally excessive aggregation that would obscure aggregation caused by millipedes.

Table 1. Physical and chemical characterization of the soil used in the incubation experiment of *Glyphiulus granulatus* under controlled conditions.

Sand	Silt	Clay	pH	OM	P	K	Ca	Mg	Al ³⁺	H + Al	SB	ECEC	CEC at pH 7.0
— g kg ⁻¹ —			H ₂ O	%	— mg kg ⁻¹ —			— cmol _c kg ⁻¹ —					
382	349	269	5.22	2.20	2.20	268.00	2.65	0.83	0.60	5.50	4.16	4.76	9.66

The soil was air dried and sieved (2 mm mesh) to remove gravel, plant residues, and large aggregates. Mineralogical analysis of the clay fraction was performed by X-ray diffraction (XRD) with CoK α radiation, obtaining peaks for quartz, kaolinite, and hematite. Physical and chemical characterization of soil was performed in the laboratory in accordance with Donagemma *et al.* (2011) (Table 1). The values for the sum of bases, effective cation exchange capacity, cation exchange capacity at pH 7.0, and base saturation were obtained from mathematical equations as follows:

$$SB = K + Ca + Mg + Na \quad (1)$$

Where: SB = sum of bases (cmol_c kg⁻¹); K = potassium content (cmol_c kg⁻¹); Ca = calcium content (cmol_c kg⁻¹); Mg = magnesium content (cmol_c kg⁻¹); and Na = sodium content (cmol_c kg⁻¹).

$$ECEC = SB + Al \quad (2)$$

Where: ECEC = effective cation exchange capacity (cmol_c kg⁻¹); SB = sum of bases (cmol_c kg⁻¹); and Al = aluminum content (cmol_c kg⁻¹).

$$CEC \text{ at pH } 7.0 = SB + (H+Al) \quad (3)$$

Where CEC at pH 7.0 = cation exchange capacity at pH 7.0 (cmol_c kg⁻¹); SB = sum of bases (cmol_c kg⁻¹); and (H+Al) = H+Al content (cmol_c kg⁻¹).

$$BS = (SB \times 100) / CEC \text{ at pH } 7.0 \quad (4)$$

Where: BS = base saturation (%); SB = sum of bases (cmol_c kg⁻¹); and CEC at pH 7.0 = cation exchange capacity at pH 7.0 (cmol_c kg⁻¹).

Soil field capacity and residual moisture were determined (DONAGEMMA *et al.*, 2011) to adjust moisture to 80% of the field water holding capacity during the experiment. 140 cm³ of soil was used in each microcosm made with squared Styrofoam of 100x100x86 mm dimensions.

Treatments T1, T2, T3 and T4, respectively, consisted of 0, 2, 6, and 12 individuals per microcosm, with 0, 8.4, 25.2, and 50.4 mg of animal dry matter per microcosm with five replicates. These values were equivalent to densities of 0, 200, 600, and 1200 individuals per m² under field conditions. In each microcosm, 1.2 g of cattle manure (dry weight) were added to the soil surface (without incorporation), corresponding to 1.2 Mg ha⁻¹. Considering total contents in dry weight, the cattle manure had the following characteristics: 328 g kg⁻¹ organic C, 22.3 g kg⁻¹ N, 10 g kg⁻¹ P, 16.0 g kg⁻¹ K, C:N ratio of 14:1, and pH_{water (1:10)} = 8.0.

The experiment was conducted for 28 days without light at 23 °C. The microcosms were opened every day to adjust moisture. During the experiment, mortality of individuals was observed in treatments T2, T3, and T4. Within these treatments, the percentage of survivor individuals at the end of the experiment was 80, 90, and 93% of individuals per microcosm, respectively.

2.2. EVALUATION AFTER 28 DAYS OF INCUBATION

Undisturbed soil samples were obtained using a spatula. Then, samples were sieved in water to determine proportions of stable aggregates by class (modified from KEMPER; CHEPIL, 1965; and MAKOTO *et al.*, 2014). This was accomplished using a vertical sieve shaker apparatus and 45 liters of distilled water. The procedure was performed using 50 g of the undisturbed wet samples separated by 4.76, 2.00, 1.00 and 0.21 mm mesh sieves. Samples were previously moistened for 5 minutes and the apparatus was activated for 10 minutes with 30 vertical oscillations per minute and an amplitude of 3.8 cm. Samples retained in the sieves were transferred to aluminum containers and oven-dried at 60 °C. After drying, samples were weighed to determine the proportion of aggregates according to size class.

The enzymatic activities of β -glycosidase and acid phosphatase were evaluated from wet samples ($\emptyset < 2$ mm) in accordance to Dick *et al.* (1996). These methods are based on the quantification of the *p*-nitrophenol released by enzymatic activity when the

soil is incubated with a specific substrate. In the case of β -glycosidase, 0.05 mol L^{-1} *p*-nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside (PNG 0.05 mol L^{-1}) of substrate was used. For phosphatase, 0.05 mol L^{-1} *p*-nitrophenyl phosphate (PNF 0.05 mol L^{-1}) of substrate was used. For both enzymes, the spectrophotometer was set to 410 nm, and the results were expressed as soil dry weight.

To evaluate the influence of *G. granulatus* on the soil P dynamics, a sequential chemical fractionation was performed (modified from HEDLEY *et al.*, 1982). In order to determine P in water ($\text{H}_2\text{O-Pi}$, readily available), 1.5 g of soil (air-dried fraction, $\emptyset < 2$ mm, collected from the disturbed soil sample) was added to a falcon tube with 15 mL of distilled water. The tubes were shaken end-over-end for 16 hours and then centrifuged at 8,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was separated and inorganic P (Pi) was measured in the sample with a spectrophotometer at 725 nm in the presence of solution 725 (1 g bismuth subcarbonate, 138 mL concentrated H_2SO_4 and 20 g ammonium molybdate) and ascorbic acid. Fractioning was performed following the same logic as described in the previous steps with the following sequence of reagents: NaHCO_3 0.5 mol L^{-1} ($\text{NaHCO}_3\text{-Pi}$); NaOH 0.1 mol L^{-1} (NaOH-Pi 0.1 mol L^{-1}); HCl 1 mol L^{-1} (HCl-Pi); NaOH 0.5 mol L^{-1} (NaOH-Pi 0.5 mol L^{-1}). To determine residual P (residual-P), the soil remaining in the tube was air dried and digested for 3 hours at 200°C with 2 mL H_2SO_4 (1:1) and 2 mL H_2O_2 . An aliquot of each extract was analyzed separately for total P (TP) by acid digestion. For each extract obtained, the organic phosphorus (Po) was independently calculated by the difference between TP and Pi. The general P from fractioning is the sum of P from all fractions.

After crushing and passing 2 g of dry soil in a 0.21 mm sieve, the total C and N analyses were performed in an Organic Elemental Analyzer, Flash 2000 (Thermo Scientific). The apparatus determines contents of these elements in solid samples by weight from 40 to 60 mg within a standard deviation of 3%. To assist in the interpretation of the enzymatic activity and P results, an analysis of pH in water was conducted according to Donagemma *et al.* (2011). Mean values for pH of 5.29, 5.42, 5.47, and 5.50 were obtained for densities of 0, 2, 6, and 12 individuals per microcosm, respectively.

2.3. STATISTICAL ANALYSES

After checking the data for normality and homoscedasticity by the Shapiro–Wilk and Bartlett tests, respectively, the data was submitted to analysis of variance (ANOVA). A regression analysis was performed to evaluate the relationships between millipede density and soil aggregation and between millipede density and P fractions. For enzymatic activity and P fractions, a Fisher's LSD test was used as a post-hoc test. Aggregate classes were tested against both C and N levels as well as P fractions with a Pearson's correlation test. The same test was used to the soil pH against both enzymatic activity and P fractions. The analyses were performed with the aid of the Sisvar 5.6 software.

3. RESULTS

After 28 days, the increase of *G. granulatus* population density in the soil reduced the proportions of aggregates between 1.00-2.00 mm, showing a linear correlation ($y = 236.16 - 1.4921x$, $P < 0.05$) (Fig. 1B). The aggregate classes between 1.00-2.00 and 2.00-4.76 mm were negatively correlated ($r = -0.95$, $P < 0.05$), indicating that reduction of 1.00-2.00 mm aggregate proportions resulted in an increase of 2.00-4.76 mm proportions. Population densities of the millipede did not influence aggregate classes between 0.21-1.00 mm and < 0.21 mm. The proposed experimental period (28 days) was not long enough to observe the formation of aggregates > 4.76 mm.

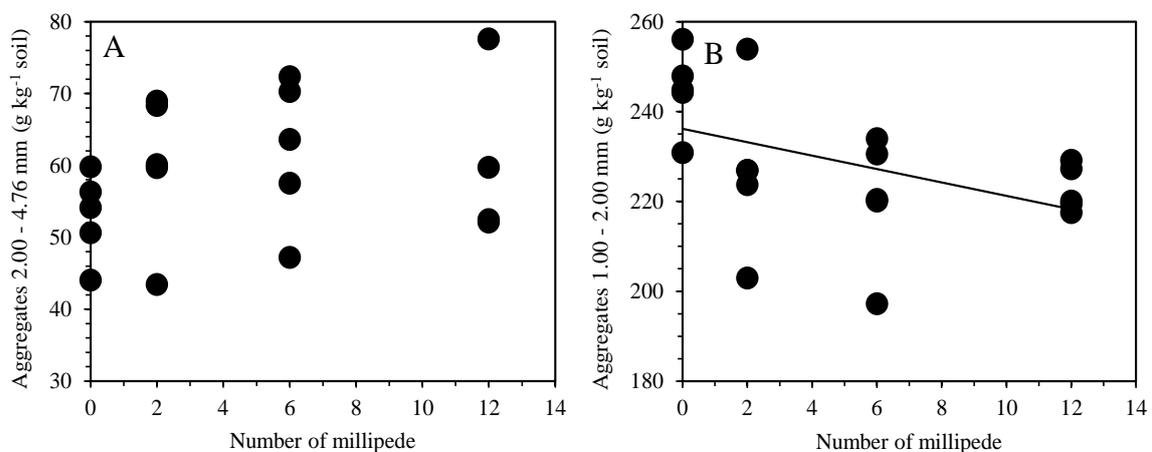


Fig. 1. Relationship between the number of millipede *G. granulatus* individuals introduced in the soil and the proportion of aggregates formed between 2.00-4.76 mm (A)

and 1.00-2.00 mm (B), after 28 days of incubation. The line in (B) shows the adjustment to the linear regression model ($y = 236.16 - 1.4921x$, $r^2 = 0.5108$, $P < 0.05$).

The presence of millipedes did not influence the soil organic carbon content (Fig. 2B). However, their density increase resulted in a linear increase of N content ($y = 1.5413 + 0.0072x$, $P < 0.05$) (Fig. 2A). When compared with the control, there was a 7% N content increase in the highest *G. granulatus* density treatment (12 individuals). This increase occurred along with a slight C:N ratio reduction ($y = 9.5106 - 0.0341x$, $P < 0.001$).

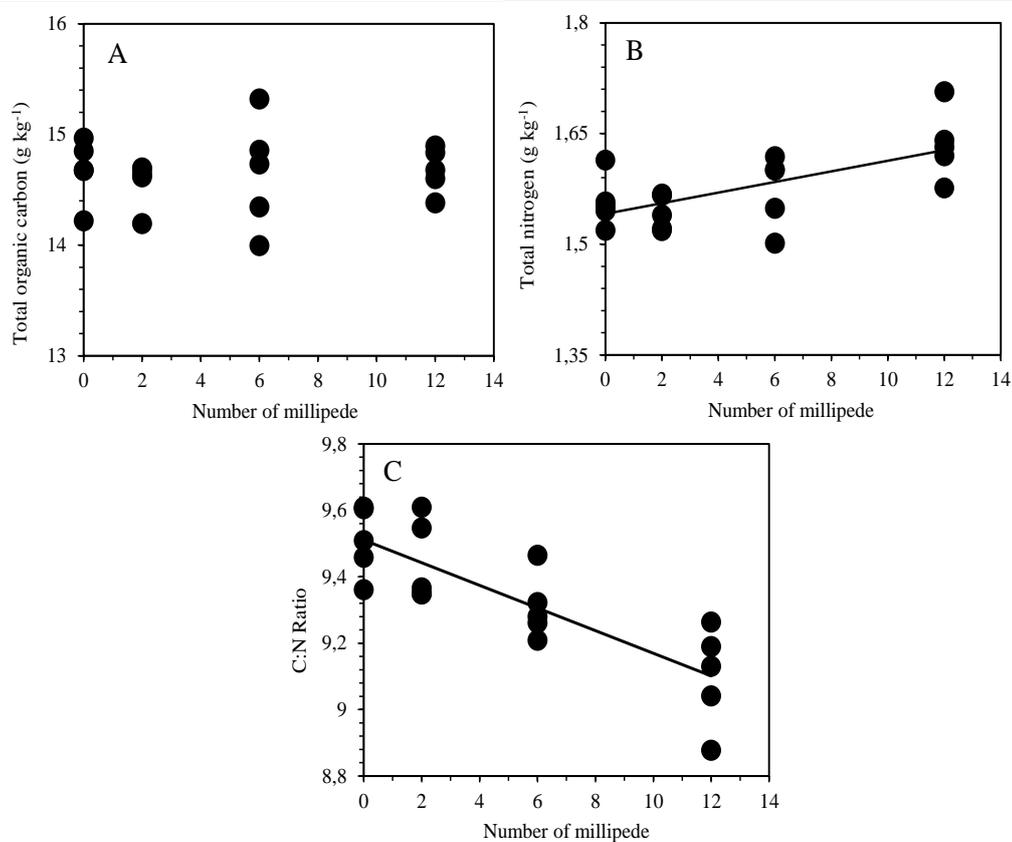


Fig. 2. Relationship between the number of millipedes and the total organic C content (A), total N (B), and the C:N ratio (C) after 28 days of incubation. Lines show adjustments to linear regression models: in (B), $y = 1.5413 + 0.0072x$, $r^2 = 0.8797$, $P < 0.05$; in (C), $y = 9.5106 - 0.0341x$, $r^2 = 0.9999$, $P < 0.001$.

The available inorganic P fractions (H₂O-Pi and NaHCO₃-Pi) were not influenced by the millipedes (Table 2). The highest millipede density (12 individuals) showed the highest NaHCO₃-Po value with 49.8 mg kg⁻¹ (Fisher's LSD test, $P < 0.05$). Compared to

the control soil, the highest density (12 individuals) showed an increase of 27% in the available P stock ($\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Po}$).

The most abundant fraction was NaOH-Pi (0.1 mol L^{-1}) with an average of 27% of the general P (Table 2). In the control soil, this fraction showed the lowest mean value (65.3 mg kg^{-1}) when compared with treatments containing millipedes (Fisher's LSD test, $P < 0.01$). The increase of millipede population density resulted in a linear increase of HCl-Pi (1.0 mol L^{-1}) content ($y = 15.458 + 0.2195x$, $P = 0.01$).

Table 2. Fractions of P (mg kg^{-1}) as a function of the number of *G. granulatus* individuals after 28 days of incubation. All values shown are the mean \pm standard error.

P fractions	Number of millipedes				Regression
	0	2	6	12	
$\text{H}_2\text{O-Pi}$	1.80 ± 0.08	1.77 ± 0.13	1.54 ± 0.09	1.59 ± 0.06	ns
$\text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ (0.5 mol L^{-1})	4.18 ± 0.14	3.98 ± 0.17	3.73 ± 0.17	3.86 ± 0.27	ns
$\text{NaHCO}_3\text{-Po}$ (0.5 mol L^{-1})	$37.57\text{b} \pm 4.25$	$41.64\text{b} \pm 4.06$	$30.63\text{b} \pm 3.56$	$49.78\text{a}^* \pm 2.90$	ns
NaOH-Pi (0.1 mol L^{-1})	$65.34\text{b} \pm 1.33$	$70.41\text{a} \pm 0.58$	$72.20\text{a} \pm 1.30$	$69.50\text{a}^{**} \pm 0.71$	ns
NaOH-Po (0.1 mol L^{-1})	46.93 ± 2.27	49.34 ± 0.51	49.77 ± 1.47	47.04 ± 1.48	ns
HCl-Pi (1.0 mol L^{-1})	15.40 ± 0.56	15.98 ± 0.54	16.75 ± 0.50	18.09 ± 0.48	$y = 15.458 + 0.2195x$, $R^2 = 0.99$, $P < 0.01$
NaOH-Pi (0.5 mol L^{-1})	25.19 ± 0.51	27.14 ± 0.22	27.83 ± 0.50	26.79 ± 0.27	ns
NaOH-Po (0.5 mol L^{-1})	3.47 ± 0.08	3.62 ± 0.03	3.70 ± 0.07	3.51 ± 0.08	ns
Residual-P	47.11 ± 6.54	46.60 ± 4.74	49.68 ± 4.15	36.53 ± 3.75	ns
General-P	247.00 ± 8.39	260.46 ± 6.10	255.84 ± 6.08	256.69 ± 4.49	ns

** : significant at .01 and .05, respectively, by the Fisher's LSD test. Mean values followed by the same letter within the line are not statistically different by the Fisher's LSD test. ns: non-significant for the regression adjustment.

The presence of millipedes influenced enzymatic activity of β -glycosidase ($F = 16.6$, $P < 0.001$) and acid phosphatase ($F = 9.8$, $P < 0.001$) (Fig. 3). When compared to the control, soils containing the highest densities (6 and 12 individuals) showed increases in β -glycosidase activity (Fisher's LSD test, $P < 0.05$) (Fig. 3A). The presence of millipedes reduced acid phosphatase activity in the soil (Fisher's LSD test, $P < 0.05$)

(Fig. 3B). Compared to the other treatments, the highest density of individuals (12 individuals) showed the lowest activity for this enzyme with $341 \mu\text{g } p\text{-nitrophenol g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$, while there was $489 \mu\text{g } p\text{-nitrophenol g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ in the control soil.

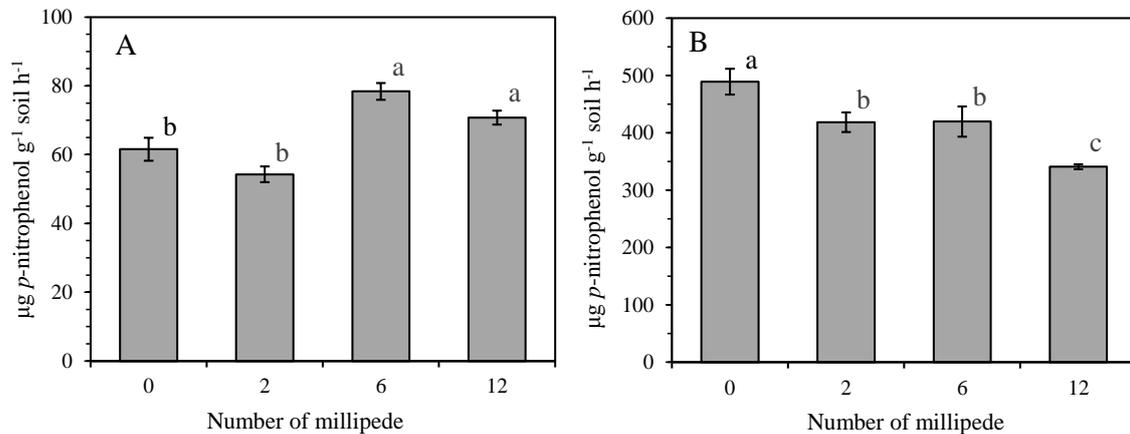


Fig. 3. Activity of β -glycosidase (A) and acid phosphatase (B) in the soil, as a function of the number of *G. granulatus* individuals after a 28-day incubation period. Vertical bars designate standard error ($n = 5$). Means followed by the same letter on the bar are not statistically different by the Fisher's LSD test.

4. DISCUSSION

4.1 FORMATION OF AGGREGATES

Results observed for *G. granulatus* activity (Fig.1) and the negative correlation ($r = -0.95$, $P < 0.05$; Pearson's correlation test) between the aggregate classes 1.00-2.00 mm and 2.00-4.76 mm suggest that primary particles associated with the aggregate classes between 1.00-2.00 mm contributed to the development of aggregates between 2.00-4.76 mm. Geophagous larvae of the millipede *Parafontaria laminata*, studied under laboratory conditions, favored formation of aggregates > 2 mm (FUJIMAKI *et al.*, 2010). Makoto *et al.* (2014) demonstrated that *Parafontaria* sp. adult millipedes have a positive effect on formation of aggregates > 4.76 mm. Unlike *Parafontaria* sp., *G. granulatus* is a detritivorous species and feed on organic materials in different decomposition stages. Due to their small size compared to other species, their individual fecal pellets have a mean diameter of 0.5 mm, thus not directly contributing to formation of aggregates > 2 mm.

The main hypothesis is that the pellets may bond inorganic particles or other adjacent pellets, which is probably caused by polysaccharides or other organic compounds present in the excrements (FUJIMAKI *et al.*, 2010).

Aggregates between 2.00-4.76 mm from the control treatment (0 millipedes) had a mean value of 53 g kg⁻¹ and were developed by dry-wet cycles (SIX *et al.*, 2004; BASTOS *et al.*, 2005). However, higher values for this aggregates class were observed in the presence of millipedes when compared to the control treatment, emphasizing the potential of these organisms for the production of aggregates > 2 mm (FUJIMAKI *et al.*, 2010).

4.2. TOTAL SOIL CARBON AND NITROGEN

In this study, the millipede species *G. granulatus* was fed cattle manure with high N content. Higher millipede densities resulted in better manure processing, mixing, and incorporation to the soil. This resulted in total N content increases in the soil for microcosms with higher millipede densities. Fujimaki *et al.* (2010) did not observe such phenomena; however, they used a geophagous species that does not feed directly on cattle manure or other N rich residues. Consequently, no variation in the soil N content can be expected. The results from this study and Fujimaki *et al.* (2010) suggest that feeding habit and kind of nutrition are very important factors when considering the effects of macrofauna on the C and N dynamics in the soil.

Chemical modification of the residues may occur during migration through the digestive tract of millipedes (CÁRCAMO *et al.*, 2000), promoting potential changes of soil N dynamics. Rawlins *et al.* (2006) studied the millipede *Glomeris marginata* and demonstrated that the total N concentration was higher in the feces when compared to the ingested litter (2.5 g and 1.2 g 100 g⁻¹, respectively).

4.3. PHOSPHORUS FRACTIONS

The observed results do not confirm that the presence of *G. granulatus* increases the availability of inorganic P forms (Table 2). Fractions of available P in macroinvertebrate excrements decrease over time (LOPEZ-HERNADEZ *et al.*, 1993; LE BAYON; BINET, 2006), which could suggest that part of the inorganic P is quickly

immobilized by microbial biomass. On the other hand, the small size of *G. granulatus* excrement ($\emptyset = 0.5$ mm) may have maximized liberation of P and its subsequent adsorption in the soil. The P adsorption process in subtropical soils is generally accentuated, and the P available is rapidly retained in clay minerals (FINK *et al.*, 2016a, 2016b), thus becoming insoluble to analytical extractors like water and NaHCO_3 . Ferric oxide (hematite) was detected in the soil of the our study, making phosphate dynamics strongly associated with the adsorption process in this clay mineral (FINK *et al.*, 2016c).

$\text{NaHCO}_3\text{-Po}$, considered a P form that easily mineralizes (OBERSON; JONER, 2005), was higher in the soil with the highest millipede population density (Table 2). The association between surface application of cattle manure and the activity of these animals (feeding, excretion, and redistribution of organic matter) probably contributed to the $\text{NaHCO}_3\text{-Po}$ increase and, therefore, to the amount of readily labile P ($\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Po}$).

In natural systems soils (e.g., forest and native fields) from tropical and subtropical regions, the inorganic P (Pi) available for plants appears to be dependent on the organic P (Po) cycling within the soil organic matter (STEWART; TIESSSEN, 1987; CONTE *et al.*, 2002). In this process, microorganisms produce enzymes (e.g., phosphatases), which mineralize Po that transforms it into soil available Pi. In this study, higher levels of easily mineralized organic P ($\text{NaHCO}_3\text{-Po}$) were observed in soils with the highest millipede density (12 individuals). This demonstrates that the available Pi may be conserved by mineralization of organic P in such soils.

HCl-Pi (1.0 mol L^{-1}) is defined as a moderately available P fraction, usually being associated with Ca (TIESSSEN; MOIR, 1993). The slight increase in soil pH observed with the increase of millipede densities, occurred due to their excrements generally having neutral pH (ASHWINI; SRIDHAR, 2005). This increase in pH expressively reduces the solubility of P forms associated with Ca, which enhances the extraction of such fractions with HCl (1.0 mol L^{-1}). This solubility of P bound to Ca is reduced by both increasing pH values and elevated values of exchangeable Ca within the soil solution (NOVAIS *et al.*, 2007).

The NaOH-Pi (0.1 mol L^{-1}) fraction is preserved by the adsorption of P in complexes with Fe and Al and is regarded as a component of the moderately available P content (HEDLEY *et al.*, 1982). Compared to the control, significant increases were

registered for this fraction when millipedes were present. The feeding activity of such millipedes and the reduced size of their excrements were factors that favored mineralization of P from the added organic material, which consequently contributed to the transfer of this element to the surface of the soil mineral particles (Fe-P).

4.4. EXTRACELLULAR ENZYMATIC ACTIVITY

The results partially confirm that *G. granulatus* enhances soil extracellular enzymatic activity (Fig. 3). Detritivorous invertebrates are well known for their capacity to modify decomposition ratios by fragmentation of organic residues (LAVELLE, 1997). This process increases the availability of specific surface area and moistens the material for primary decomposer activity, which indirectly enhances microbial activity. Crowther *et al.* (2011) demonstrated that the feeding activity of the millipede *Blaniulus guttulatus* stimulated the β -glycosidase and cellobiohydrolase activity in soil inoculated with fungi (Basidiomycota), which enhances glucose required for compensatory growth of the fungus.

Edaphic invertebrates may modify specific soil microbial populations responsible for enzymatic activity (CROWTHER *et al.*, 2011). In our study, the most probable hypothesis for the reduction of acid phosphatase in the presence of millipedes may be attributed to the increase of soil pH due to the deposition of millipede feces in the soil. This hypothesis is supported by the negative correlation between acid phosphatase and the soil pH ($r = -0.91$, $P < 0.09$; Pearson's correlation test). Due to the soil pH increase, microorganisms producing acid phosphatase may have been inhibited. Nahas (2002) demonstrated that soil liming promoted increase of soil pH that ultimately resulted in the decrease of acid phosphatase producing fungi populations.

Synthesis and activity of microbial phosphatases are disadvantaged under conditions of high P availability and stimulated under limited conditions of this nutrient. The absence of millipede influence on available P forms may have occurred due to the "senescence effect" of the excrements (LE BAYON; BINET, 2006) or for other reasons previously discussed. It is presumed that soil P contents, in available forms, were higher within the excrements of the millipedes while they were still fresh, which negatively influences the phosphatase activity, as observed in our study.

The reduction of acid phosphatase activity under the presence of millipedes may also be explained by the direct feeding activity and excrement production, especially within the highest population density. While studying the tropical earthworm *Martiodrilus carimaguensis* under field and laboratory conditions, Jiménez *et al.* (2003) observed that the phosphatase activity was reduced to a maximum of 44% in the excrements when compared to control soil. This is probably due to enzymatic degradation during migration of food through the earthworm gut. This effect is in addition to the high availability of initial P within the fresh excrement, which also restricts phosphatase production.

5. CONCLUSIONS

Activity of the millipede *G. granulatus* enhances the formation of aggregates between 2.00-4.76 mm and reduces the aggregates between 1.00-2.00 mm. The increased density of this organism resulted in a significant N content increase, with an approximate 7% increase at the highest density (12 individuals per microcosm). This suggests that the detritivorous feeding behavior stands as an important factor in soil N dynamics.

The β -glycosidase activity increased at densities of 6 and 12 millipedes. This is probably due to fragmentation activity in the supplied cattle manure as well as the release of intracellular microbial enzymes. The reduced acid phosphatase activity in the presence of millipedes may be attributed to the soil pH increase, which resulted from deposition of millipede feces in the soil.

Available inorganic P fractions (H_2O -Pi and $NaHCO_3$ -Pi) were not influenced by these macroinvertebrates. However, the amount of readily labile P (H_2O -Pi + $NaHCO_3$ -Pi + $NaHCO_3$ -Po) was greater at the highest millipede density (12 individuals per microcosm) and was predominantly related to the increase of $NaHCO_3$ -Po. This suggests that the available P in the soil may be conserved by organic P cycling in soils with prominent densities of these macroinvertebrates.

CAPÍTULO 2

EFICIÊNCIA DE MILÍPEDE TROPICAL E MINHOCAS EPIGEICAS NA MATURIDADE DE RESÍDUOS DE CAFEIEIRO COM ESTERCO BOVINO

RESUMO

Estima-se que sejam produzidos um total de 7 milhões de toneladas de esteco bovino por dia nas propriedades agrícolas brasileiras. Além disso, por ser o segundo maior produtor mundial de café Robusta (*Coffea canephora*), o Brasil produz grande quantidade de resíduos provenientes da colheita e beneficiamento dos seus frutos. Ressalta-se que a macrofauna edáfica (e.g., milípedes, minhocas) pode ser utilizada para otimizar processos de bioconversão de resíduos em adubos orgânicos. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi investigar a eficácia do milípede tropical *Rhinocricus botocodus* e da minhoca epigeica *Eisenia andrei*, assim como a associação desses invertebrados, sobre a maturidade de uma mistura de esterco bovino (EB) e resíduos de cafeeiro (RC) (1:1, base volume). Foram testados quatro níveis de macroinvertebrados e cinco intervalos de amostragem (0, 30, 60, 90 e 120 dias), com três repetições ($n = 3$). Os níveis de macroinvertebrados foram: controle sem invertebrado (CONT); milípede (MILI); minhoca (MINH); e milípede mais minhoca (MILI + MINH). As variáveis analisadas foram C e N total, C e N solúvel, C das substâncias húmicas e análise de infravermelho em ácido húmico e fúlvico. Independentemente da presença de milípedes, minhocas *E. andrei* otimizaram os decréscimos de C solúvel e $C/N_{\text{solúvel}}$ ao longo da incubação, sugerindo que essa espécie acelerou a decomposição do RC + EB. No estágio final da incubação (120 dias), as maiores relações ácido húmico/ ácido fúlvico ($p \leq 0,05$) foram observadas nos tratamentos MILI + MINH (3,5) e MINH (2,6). Ao longo da incubação, a análise de infravermelho de ácido húmico demonstrou reduções de grupos alifáticos concomitante com aumentos dos aromáticos, sendo essas alterações mais pronunciadas nos tratamentos com a presença de minhocas. Dentro do tempo estudado, os resultados demonstraram que *E. andrei* otimiza a maturidade do RC + EB, enquanto somente *R. botocodus* não é eficiente para a maturidade desses resíduos.

Palavras-chave: vermicompostagem, FTIR, substâncias húmicas, *Eisenia andrei*, *Rhinocricus botocodus*.

ABSTRACT

It is estimated that a total of 7 million tons of cattle manure is produced per day in Brazilian farms. In addition, the Brazil is the second largest world's producer of coffee (*Coffea canephora*), producing a large amount of waste from the harvest and processing of its fruits. It should be highlighted that edaphic macrofauna (e.g., millipedes, earthworms) can be used to optimize waste bioconversion processes in organic fertilizers. In this sense, the objective of the study was to investigate the efficacy of the tropical millipede *Rhinocricus botocudus* and of the epigeic earthworm *Eisenia andrei*, as well as the association of these invertebrates, on the maturity of a mixture of cattle manure (CM) and coffee plant residues (CR). Four levels of macroinvertebrates and five sampling times (0, 30, 60, 90, and 120 days) were tested with three replicates ($n = 3$). The levels of macroinvertebrates were: control without invertebrates (CONT), millipede (MILLI), earthworm (WORM), and millipede + earthworm (MILLI + WORM). The analyzed variables were total C and N, soluble C and N, C of the humic substances and infrared analysis in humic and fulvic acid. Independently of the presence of millipedes, *E. andrei* optimized the decreases in soluble C and C/N_{soluble} throughout the incubation, suggesting that this species accelerated the decomposition of CR + CM. At the incubation end (120 days), the highest humic acid/ fulvic acid ratios were observed in the MILLI + WORM (3.5) and WORM (2.6) treatments. Throughout the incubation, infrared analysis of humic acid demonstrated reductions of aliphatic groups concomitant with increases of the aromatics, being these changes more pronounced in the treatments with the presence of earthworms. Within of the all studied time, the results demonstrated that *E. andrei* optimizes the maturity of CR + CM, whereas only *R. botocudus* is not efficient for improve the maturity of these residues.

Keywords: vermicomposto, FTIR, humic substances, *Eisenia andrei*, *Rhinocricus botocudus*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na produção de esterco bovino (EB), uma vez que possui o maior rebanho comercial de corte do mundo (ABIEC, 2016) e ocupa a quarta posição no ranking mundial de produção de leite (ZOCCAL, 2016). Estima-se que sejam produzidos um total de 7 milhões de toneladas de EB por dia nas propriedades agrícolas brasileiras (aprox. 3 milhões em massa seca, 60 % umid.) (KONZEN; ALVARENGA, 2016). Além disso, por ser o segundo maior produtor mundial de café Robusta (*Coffea canephora*), produz grande quantidade de resíduos provenientes da colheita e beneficiamento dos seus frutos. Nas últimas safras as colheitas semi-mecanizadas acumularam, nas margens das lavouras de Robusta, aproximadamente 3 toneladas de massa seca por hectare de resíduos de cafeeiros (RC), formado por folhas e galhos < 5 mm de diâmetro (base de cálculos em BRAGANÇA *et al.*, 2010). Uma vez que EB e RC são gerados em quantidades elevadas, a disposição desses resíduos é um problema importante a nível econômico, social e ambiental no Brasil e no mundo.

A compostagem de resíduos orgânicos é um método muito difundido para obter a estabilização e sanitização da matéria orgânica, antes da aplicação em solos agrícolas (DE BERTOLDI *et al.*, 1996; PLAZA *et al.*, 2008). A vermicompostagem é um tipo especial de compostagem muito utilizado que envolve a adição de determinadas espécies de minhocas epigéicas, e.g., *Eisenia andrei* (Bouché, 1972), para melhorar a biotransformação de resíduos orgânicos (LAZCANO *et al.*, 2008; PLAZA *et al.*, 2008; AIRA *et al.*, 2011; DOMÍNGUEZ; GÓMEZ-BRANDÓN, 2013). Apesar dessas minhocas preferirem esterco animal como fonte energética e nutricional (EDWARDS; BOHLEN, 1996; SIDDIQUE *et al.*, 2005; MAHBOUB KHOMAMI *et al.* 2016), são capazes de consumir vários tipos de resíduos orgânicos e estimulam as comunidades microbianas, levando a otimização de processos de mineralização e humificação (EDWARDS, 2004; BENÍTEZ *et al.*, 2005; PLAZA *et al.*, 2008).

Os milípedes (Classe Diplopoda) também são adequados para melhorar a bioconversão de resíduos em adubos orgânicos (KARTHIGEYAN; ALAGESAN, 2011; SRIDHAR; AMBARISH, 2013; ANTUNES *et al.*, 2016), num processo denominado de milicômpostagem (RAMANATHAN; ALAGESAN, 2012). Esses macroinvertebrados fragmentam mecanicamente os resíduos orgânicos, aumentando a área superficial desses resíduos e, em consequência, favorecem a atuação bioquímica microbiana (SCHEU;

WOLTERS, 1991; LAVELLE, 1997). Devido a fisiologia associada às características peculiares da cavidade bucal e intestino (ver KÖHLER; ALBERTI, 1990; CORREIA; AQUINO, 2005), a maioria das espécies são detritívoras e se alimentam, preferencialmente, de resíduos de plantas (*litterfall*) com contrastantes composições químicas e níveis de decomposição (ASHWINI; SRIDHAR, 2005; SEMENYUK *et al.*, 2011; AMBARISH; SRIDHAR, 2013; SVYRYDCHENKO; BRYGADYRENKO, 2014).

Rhinocricus botocudus (Rhinocricidae), espécie de milípede relativamente pequena comparada as demais espécies do gênero (comp. de 53-80 mm; e larg. de 8.0-10.3 mm) (SCHUBART, 1962), são largamente encontrados em lavouras de café Robusta do estado do Espírito Santo, Brasil, onde se alimentam do *litterfall* dos cafeeiros (observação pessoal). Em condições de laboratório, ocorreu o consumo de RC de 190 mg de MS indivíduo⁻¹ dia⁻¹ (dados não apresentados). Esse consumo é considerado relativamente elevado para a espécie de milípede tropical (ver CORREIA; AQUINO, 2005; BIANCHI; CORREIA, 2007), sugerindo alto potencial de *R. botocudus* para fragmentação desse tipo de resíduo. Apesar desse grande potencial, estudos de milicompostagem com espécies tropicais ainda são escassos.

Numa perspectiva de maturação de resíduos, as substâncias húmicas (SH) são componentes importantes da matéria orgânica (STEVENSON, 1994). Essas substâncias favorecem o crescimento de plantas de forma direta por meio de efeitos fisiológicos positivos, e, indiretamente, por meio de alterações nos atributos físicos, químicos e biológicos dos solos (STEVENSON, 1994; NARDI *et al.*, 2002; PLAZA *et al.*, 2008). Dentro das SH, os ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) são as frações mais estudadas (GUERRA *et al.*, 2008) e servem para demonstrar transformações das SH em processos de compostagem e vermicompostagem (e.g., DIAS *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2015). Em geral, após adequada decomposição, os teores de AH são aumentados enquanto os de AF são reduzidos, sendo um dos indicativos que a matéria orgânica está madura e ideal para aplicação nos solos (ZHOU *et al.*, 2014).

Além disso, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método utilizado para monitorar transformações em grupos funcionais de AH e AF em processos de compostagem e vermicompostagem (BADDI *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2014; ANTUNES *et al.*, 2015). No entanto, são

desconhecidos estudos de FTIR em frações de SH em processos de compostagem com milípedes tropicais.

Teores de C e N (solúveis e totais) e suas relações são utilizados como indicadores de maturidade de resíduos orgânicos (BERNAL *et al.*, 1998; CASTALDI *et al.*, 2008; ANTIL *et al.*, 2013), porém devem ser consideradas em conjunto com outras variáveis, e.g., teores de carbono da fração AH, relação AH/AF e análises FTIR. O objetivo do estudo foi investigar a eficácia do milípede tropical *R. botocudus* e da minhoca *E. andrei*, assim como a associação desses macroinvertebrados, sobre a maturidade de uma mistura de EB e RC. A hipótese do estudo é que a atuação conjunta de *R. botocudus* e *E. andrei* otimiza a maturidade de EB + RC comparada as suas atuações em separado, promovendo maiores reduções da relação C/N solúvel e total e incremento da relação AH/AF e de grupos aromáticos de AH e AF.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. EXPERIMENTO DE INCUBAÇÃO COM *Rhinocricus botocudus* E *Eisenia andrei*

O experimento foi conduzido sob condições de laboratório com adultos de *R. botocudus* e adultos e juvenis de *E. andrei*. Em julho de 2015 foram coletados manualmente milípedes para a instalação do experimento em lavoura de café Robusta (*C. canephora*) no município de Linhares, estado do Espírito Santo, Brasil (19° 23' 28" S, 40° 04' 20" W). A região possui clima tropical Aw, apresentando estação chuvosa no verão e seca no inverno, com precipitação média anual de 1160 mm e temperatura média de 25 °C. O solo da localidade foi classificado como um Latossolo Amarelo (EMBRAPA, 2013). Na localização de amostragem, a densidade populacional variou de 0 a 60 indivíduos por m², com um máximo de massa seca de 36 g m⁻².

As minhocas utilizadas eram da espécie *Eisenia andrei* (“Vermelha da Califórnia”), adquiridas de criadouro comercial. O resíduo de cafeeiros (RC) utilizado foi formado por folhas e galhos < 5 mm de diâmetro e comprimento. Esse resíduo foi coletado 30 dias após a sua poda para a colheita semi-mecanizada do café em Linhares-ES, Brasil (19° 15' 67" S, 40° 01' 93" W). O esterco bovino (EB) proveniente de gado de leite foi coletado ainda fresco em estábulo e, antes de ser utilizado, foi feita a redução de umidade por meio de secagem à temperatura ambiente e na sombra. O esterco era

proveniente de criação agroecológica sem a presença de resíduos de agrotóxicos e produtos veterinários. Os resíduos foram caracterizados de acordo com Van Soest e Wine (1968) e Embrapa (2009), sendo os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características físicas e químicas do esterco bovino (EB) e resíduos de cafeeiro (RC) usados no estudo

Atributos	Esterco bovino	Resíduos de cafeeiro
Umidade (%)	43,47	10,60
Densidade base seca (Mg m^{-3})	0,18	0,10
pH água (1:10)	9,13	7,61
Carbono orgânico total (g kg^{-1})	389,00	427,00
Nitrogênio total (g kg^{-1})	16,20	21,50
Relação C/N	24,01	19,86
Lignina (g kg^{-1})	122,41	371,66
N/lignina	0,13	0,06
Celulose (g kg^{-1})	300,64	300,20
Fósforo (g kg^{-1})	8,60	3,50
Potássio (g kg^{-1})	15,10	14,30
Cálcio (g kg^{-1})	14,80	30,60
Magnésio (g kg^{-1})	6,80	6,60

Os containers, formados por caixas de isopor de 48,7 x 25,7 x 18,9 cm, foram preenchidos inicialmente com uma camada de 4,5 cm de vermicomposto estabilizado (um substrato não-tóxico que serviu como “cama” para as minhocas) (AIRA *et al.*, 2011). Sobre essa camada, foi colocada uma tela plástica (malha de 2 x 3 mm) para evitar a amostragem desse vermicomposto. Sobre essa tela, foi adicionada uma camada com 6,3 L de EB. Posteriormente, uma camada de RC com o mesmo volume foi adicionado. Os volumes de materiais adicionados foram aferidos por meio do peso em balança, e, para isso, suas densidades foram previamente determinadas.

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), num esquema fatorial 4 x 5, sendo quatro níveis de macroinvertebrados e cinco intervalos de amostragem (0, 30, 60, 90 e 120 dias), com três repetições ($n = 3$). O nível ‘controle’ (CONT) consistiu de containers incubados sem macroinvertebrados edáficos. Para o nível ‘milípede’ (MILI), os containers foram inoculados com 12,5 g de peso fresco de adultos de *R. botocudus* (ca. 8 ± 1 indivíduos ou 5 g de massa seca). Essa quantidade foi determinada com base em um teste preliminar do consumo de RC por *R. botocudus* (dados

não mostrados) e de acordo com Karthigeyan e Alagesan (2011). Para o nível ‘minhoca’ (MINH), os containers foram inoculados com 60 g de peso fresco (adultos e juvenis) de *E. andrei* (ca. 255 ± 10 indivíduos ou 12 g de massa seca) (DOMÍNGUEZ; GÓMEZ-BRANDÓN, 2013). No nível ‘milípede + minhoca’ (MILI + MINH) foi utilizado 12,5 g de peso fresco de *R. botocudus* e 60 g de *E. andrei*.

Todos os containers ($n = 3$, total de 12) foram cobertos com tecido poroso de cor preta, e o experimento se desenvolveu no escuro a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. A umidade foi calculada para 73% durante todo o experimento (em base seca), porém oscilações foram verificadas. Para isso, de 15 em 15 dias foram realizadas coletas de aproximadamente 5 g de material, que foi colocado para secar em estufa para ajuste dos cálculos de umidade. O umedecimento dos containers foi realizado diariamente. As variáveis do estudo foram determinadas por meio de amostragens aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.

2.2. EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Em amostras de todo estágio da incubação, as substâncias húmicas (SH) foram extraídas de acordo com procedimentos adaptados de Huang *et al.* (2006) e Zhou *et al.* (2014). Amostras previamente secas ao ar foram extraídas com NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), com relação sólido: extrator de 1:10 (m/v, base massa seca) após agitação por 24 horas. O sobrenadante, que contém as substâncias húmicas, foi coletado após centrifugação à 8000g por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido por duas vezes, e, para cada amostra, os extratos foram reunidos no mesmo recipiente. O pH do extrato foi ajustado para 7,0 com HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), sendo a análise do C orgânico das SH realizada de acordo com Walkley e Black (1934). A separação do ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF) foi da seguinte forma: o pH do extrato foi ajustado para 1,0 com HCl (3 mol L^{-1}) e foi mantido em repouso durante 12 horas a uma temperatura de 4°C . Posteriormente, foi centrifugada à 8000g por 15 minutos. O precipitado continha o AH enquanto o sobrenadante continha o AF. O AF foi separado em outro recipiente, e o AH foi lavado com HCl ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) por duas vezes. O pH de ambas frações foi ajustado para 7,0 e o C orgânico foi determinado de acordo com Walkley e Black (1934). Amostras remanescentes de AH e AF foram liofilizadas para obter uma massa sólida e usadas para análise de FTIR.

2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para os tempos 0, 60 e 120 dias de incubação. Esta análise foi realizada por transmissão na amostra em formato de pastilha em amostra diluída em brometo de potássio (KBr). Para isso, as pastilhas foram preparadas adicionando 180 mg de KBr a 4 mg de AH ou AF liofilizados. Posteriormente, foram triturados em almofariz até a mistura se tornar homogênea. A mistura foi colocada em um pastilhador convencional (13 mm de diâmetro) e prensadas a 10 t cm^{-2} . As amostras foram escaneadas num intervalo entre 4000 e 500 cm^{-1} usando o equipamento Tensor 27 da marca Bruker equipado com o software Opus 6.5.

2.4. ANÁLISES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Amostras provenientes de todos os estágios da incubação foram previamente secas em estufa (65°C) e trituradas em moinho ($< 2 \text{ mm}$). Posteriormente, foi realizada extração com água destilada (relação 1:10, m/v) por meio de agitação durante 24 horas. Os extratos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos e em seguida foram filtrados. O teor de carbono solúvel em água (CSA) foi determinado por meio de oxidação com dicromato de potássio (0.33 mol L^{-1}) e titulação com sulfato ferroso heptahidratado (0.4 mol L^{-1}) e indicador difenilamina (CIAVATTA *et al.*, 1991). O teor de nitrogênio solúvel foi determinado pelo método Kjeldhal (adaptado de BREMNER; MULVANEY, 1982; e TEDESCO, 1995). Foram realizadas também análises de C orgânico total (COT) e N total por meio de analisador elementar Analyser Organic Elementar, Flash 2000 (Thermo Scientific).

2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas em três repetições ($n = 3$) e os valores médios e os erros padrões foram apresentados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e valores de LSD ($p \leq 0,05$) foram usados para determinar diferenças significativas entre tratamentos. A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* Sisvar.

3. RESULTADOS

3.1. COT, CSA E RELAÇÕES C/N_{sólida} E C/N_{solúvel} DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE RC + EB

Em todos os tratamentos os teores de COT decresceram ($p \leq 0,0001$) ao longo do período de incubação (Fig. 1a). Diferenças entre tratamentos foram observadas somente a partir dos 60 dias. A partir desse tempo de incubação, os menores teores de COT ($p \leq 0,05$) foram nos tratamentos com a presença de minhocas comparados ao CONT e MILI. Nos tempos 60 e 120 dias, os menores teores de COT ($p \leq 0,05$) foram no tratamento MINH. Aos 120 dias, a redução nos teores foi 10% para o CONT, e 13%, 29% e 36% para os tratamentos com MILI, MILI + MINH, e MINH, respectivamente. Em geral, não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos CONT e MILI.

A redução no teor de C total associado ao aumento no teor de N total, resultou em decréscimo significativo ($p \leq 0,0001$) da relação C/N_{sólida} ao longo da incubação, atingindo aos 120 dias valores menores que 16 em todos os tratamentos (Fig. 2a). Aos 120 dias, a relação C/N_{sólida} foi menor ($p \leq 0,05$) nos tratamentos com a presença de macroinvertebrados edáficos comparado ao CONT.

Mudanças nos teores de CSA durante o processo de decomposição foram semelhantes em todos os tratamentos (Fig. 1b). Nos primeiros 30 dias ocorreram as maiores reduções nos teores de CSA. No decorrer da decomposição, os tratamentos MINH e MILI + MINH apresentaram os menores valores de CSA e não se diferenciaram entre si. Os valores de CSA do tratamento MILI não se diferenciaram do CONT. Aos 120 dias, os teores de CSA variaram de 4.8 a 0.5 g kg⁻¹, sendo os menores valores atribuídos aos tratamentos com a presença de minhocas.

Como observado para o CSA, a relação C/N_{solúvel} diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo em todos os tratamentos, sendo que as maiores reduções ocorreram nos 30 dias iniciais (Fig. 2b). A partir do tempo 60 dias, os tratamentos com a presença de minhocas (MINH e MILI + MINH) apresentaram menores ($p \leq 0,05$) relações C/N_{solúvel} comparados aos tratamentos MILI e CONT. Aos 120 dias, essa relação variou de 9.8 a 1.6, sendo o maior valor atribuído ao CONT e o menor ao tratamento MILI + MINH.

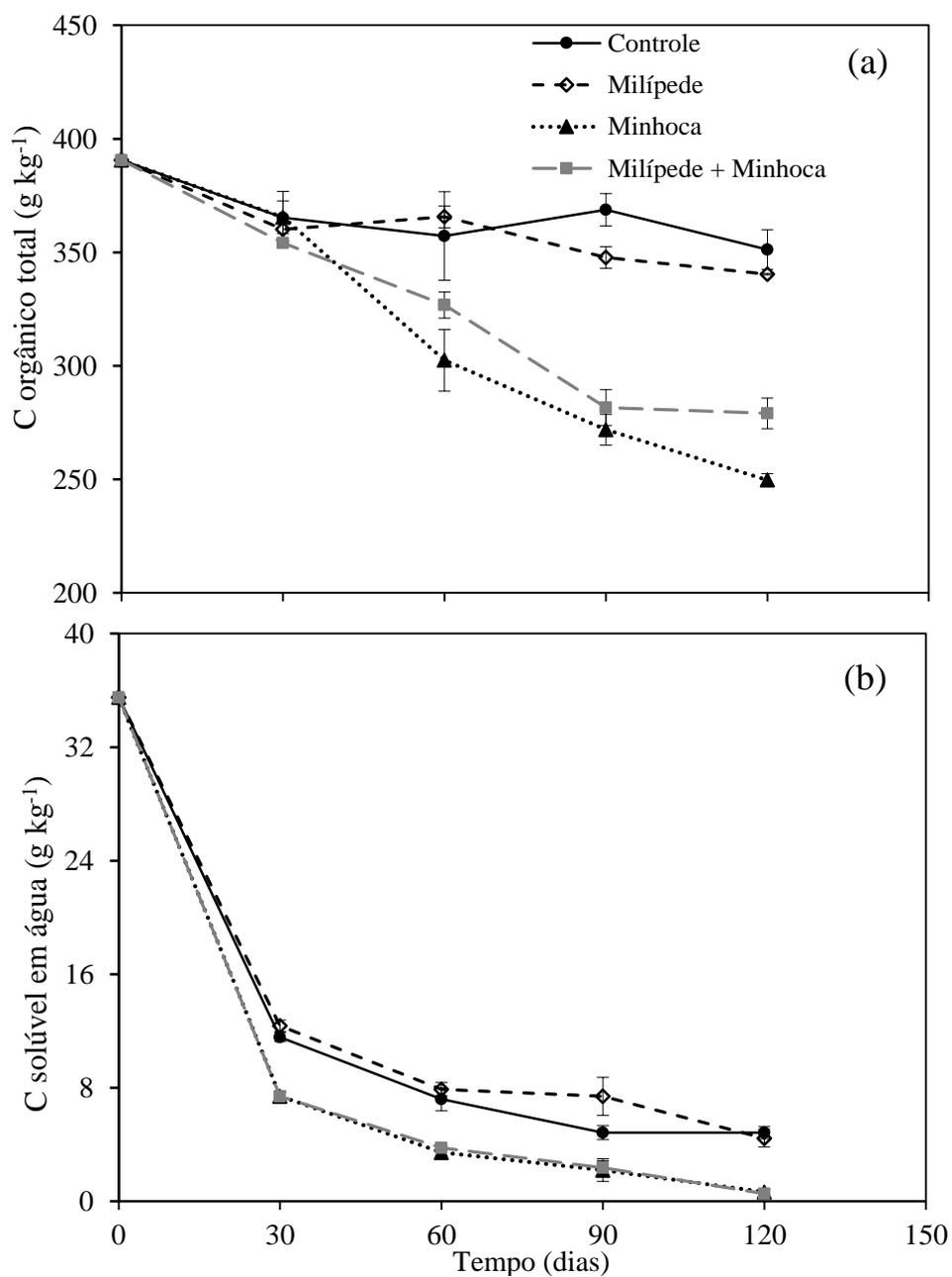


Fig. 1. Mudanças nos teores de COT (a) e CSA (b) durante a decomposição de RC + EB sob a influência de milípede, minhoca e milípede + minhoca.

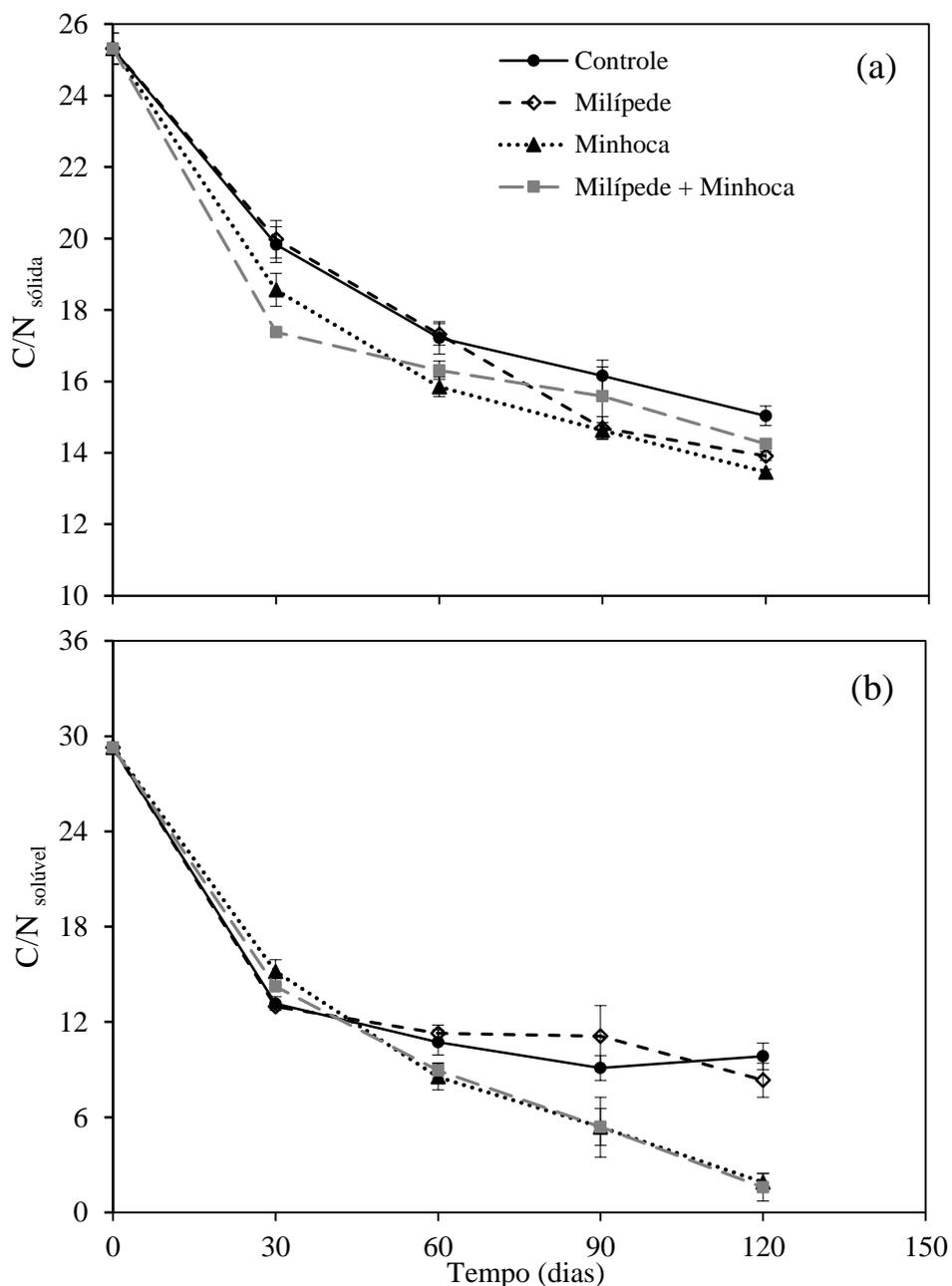


Fig. 2. Mudanças na relação C/N sólida (a) e relação C/N solúvel (b) durante a decomposição de RC + EB sob a influência de milípede, minhoca e milípede + minhoca.

3.2. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Em todos os tratamentos, os teores de C das substâncias húmicas (SH) sofreram decréscimos significativos ($p \leq 0,05$) ao longo do período de decomposição (Fig. 3a). Ressalta-se que as proporções de reduções foram de 34, 38, 46 e 48% para o MILI, e tratamentos CONT, MINH e MILI + MINH, respectivamente.

Houve redução significativa ($p \leq 0,05$) nos teores de C de ácido fúlvico (AF) ao longo da decomposição em todos os tratamentos (Fig. 3b). Os decréscimos foram de 80, 77, 84 e 88% para o CONT, e tratamentos MILI, MINH e MILI + MINH, respectivamente. Por outro lado, no decorrer da decomposição os teores de C de AH aumentaram ($p \leq 0,05$) em todos os tratamentos (Fig. 3c).

O aumento nos teores de C de AH em paralelo à redução de C do AF, resultou em aumento ($p \leq 0,05$) na relação AH/AF em todos os tratamentos (Fig. 3d). Ao final da decomposição (120 dias), ocorreram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na relação AH/AF entre tratamentos. Nesse período, a maior ($p \leq 0,05$) relação foi observada para o tratamento MILI + MINH (3,5), seguido de MINH (2,6), CONT (2,3) e MILI (2,0).

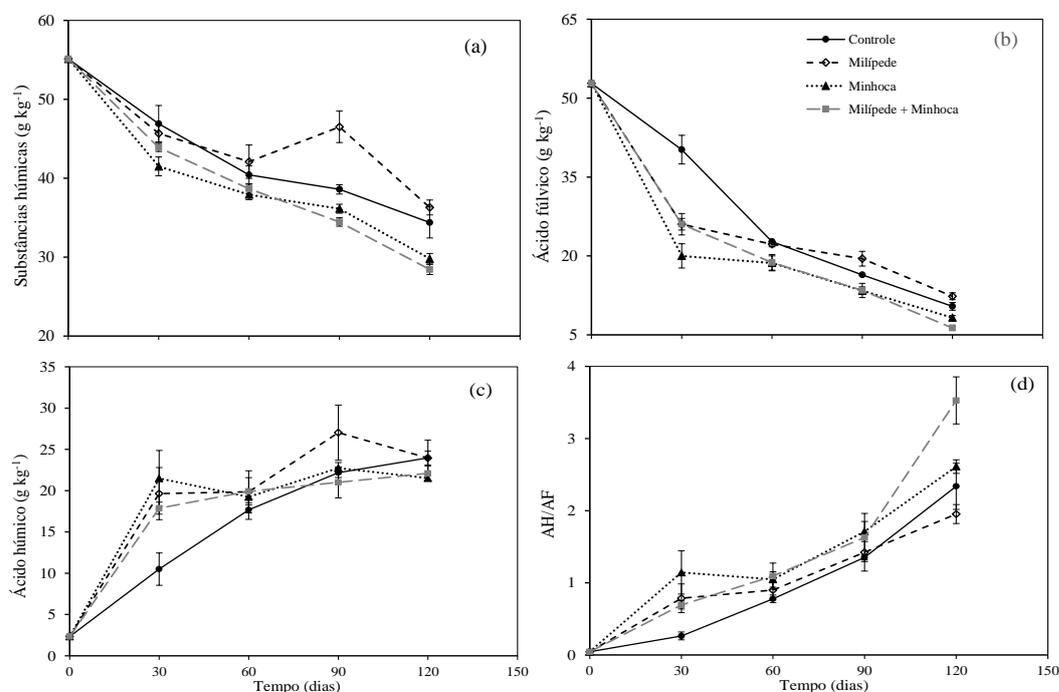


Fig. 3. Mudanças nas substâncias húmicas extraíveis (a), ácido fúlvico (b), ácido húmico (c), e relação AH/AF (d) durante a decomposição de RC + EB sob a influência de milípede, minhoca e milípede + minhoca.

3.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As principais bandas de absorvância do AH com suas respectivas atribuições estão apresentadas na Tabela S1 (Informações suplementares). As mudanças ao longo da

incubação estão apresentadas na Fig. 4. Em todos os tratamentos ocorreram decréscimos de intensidade ao longo do tempo para as seguintes bandas de absorvância: bandas largas que variaram de 3421-3402 cm^{-1} (estiramento O-H); picos pequenos de 2940-2850 cm^{-1} (grupos C-H alifáticos); pequenos picos de 1513-1506 cm^{-1} (C=C de estruturas aromáticas); picos de 1129-1121 (grupos CH_2 alifáticos); e picos pequenos de 1093-1082 (grupos C-O).

Por outro lado, houve incremento para picos agudos que variaram de 836-830 cm^{-1} (deformação CH de grupos aromáticos). Para esse intervalo, as mudanças foram mais evidentes nos tratamentos com a presença de minhocas (MINH e MILI + MINH), podendo isso ser notado já aos 60 dias. Para esse pico, não ocorreram diferenças acentuadas entre o CONT e o tratamento MILI.

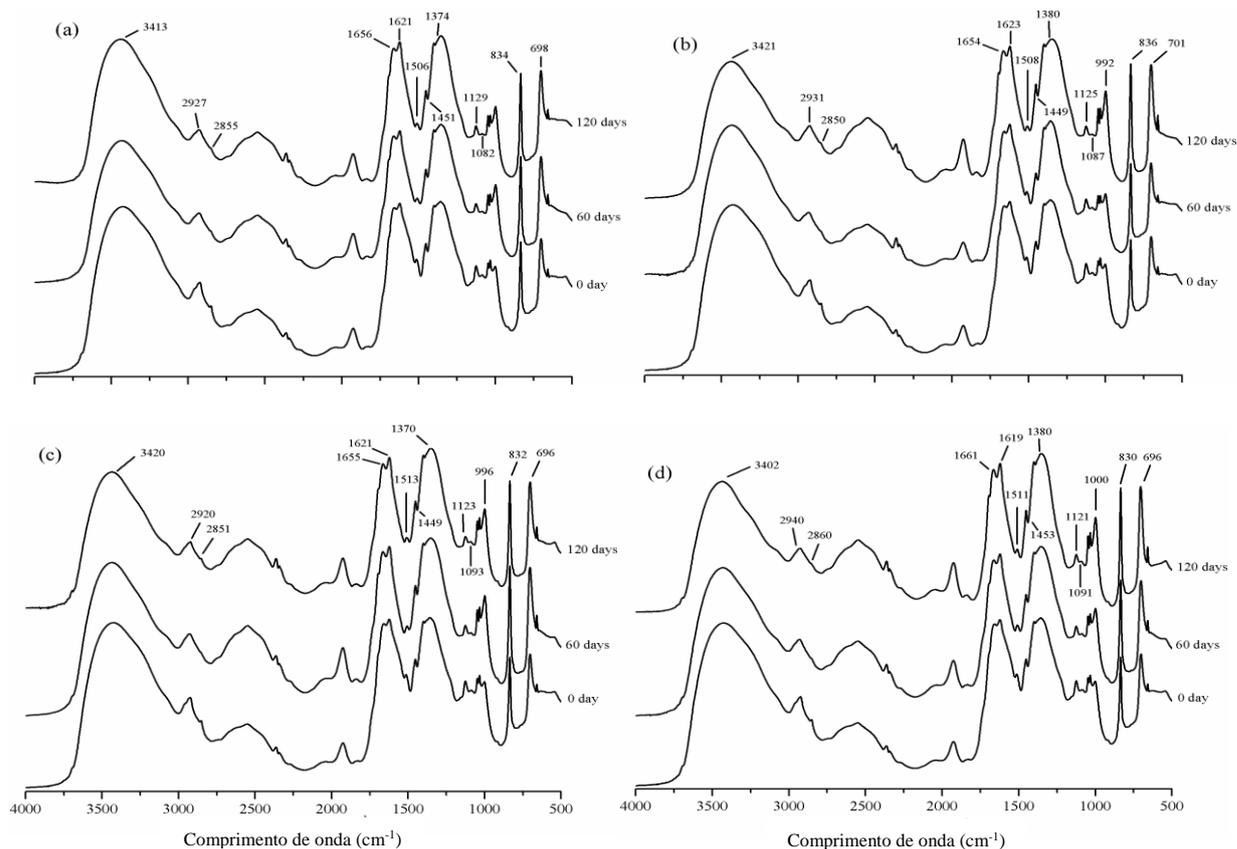


Fig. 4. Espectros de FTIR de ácido húmico extraídos em diferentes estágios da incubação de resíduo de cafeeiros com esterco bovino: (a) controle sem macroinvertebrados edáficos, (b) com milípedes, (c) com minhocas, e (d) com milípedes + minhocas.

Os espectros de AF foram similares aos do AH (Fig. 5), e as principais bandas de absorvância do AF com suas respectivas atribuições estão apresentadas na Tabela S2

(Informações suplementares). No estágio inicial da incubação (0 dia), os espectros de AF foram caracterizados por bandas largas a 3433-3408 cm^{-1} (estiramento O-H), picos de 2941-2938 cm^{-1} (C-H de grupos alifáticos) e forte absorção a 1609-1587 (estiramento C=N amida II). Com o progresso da decomposição, especialmente após 60 dias, a intensidade desses picos e bandas foram reduzindo. Comparado ao CONT, essas reduções foram mais evidentes na presença dos macroinvertebrados edáficos, principalmente nos tratamentos com a presença de minhocas.

A partir dos 60 dias, picos acentuados a 1384-1382 cm^{-1} (estiramento C=O de grupos fenólicos) e picos menores em torno de 830 cm^{-1} (deformação CH de grupos aromáticos) e a 621 cm^{-1} (C-C em anéis aromáticos) tornaram-se maiores e mais evidentes.

Para os picos em torno de 1384 cm^{-1} não houveram diferenças acentuadas entre os tratamentos CONT e MILI. Porém, no tratamento MINH e principalmente em MILI + MINH, os incrementos de intensidade foram mais evidentes comparados ao CONT. Para os picos a 830 cm^{-1} os incrementos foram mais evidentes nos tratamentos com a presença de minhocas (MINH e MILI + MINH). Essa constatação já pode ser verificada a partir dos 60 dias da decomposição. Ao contrário, não ocorreram diferenças claras entre os tratamentos CONT e MILI.

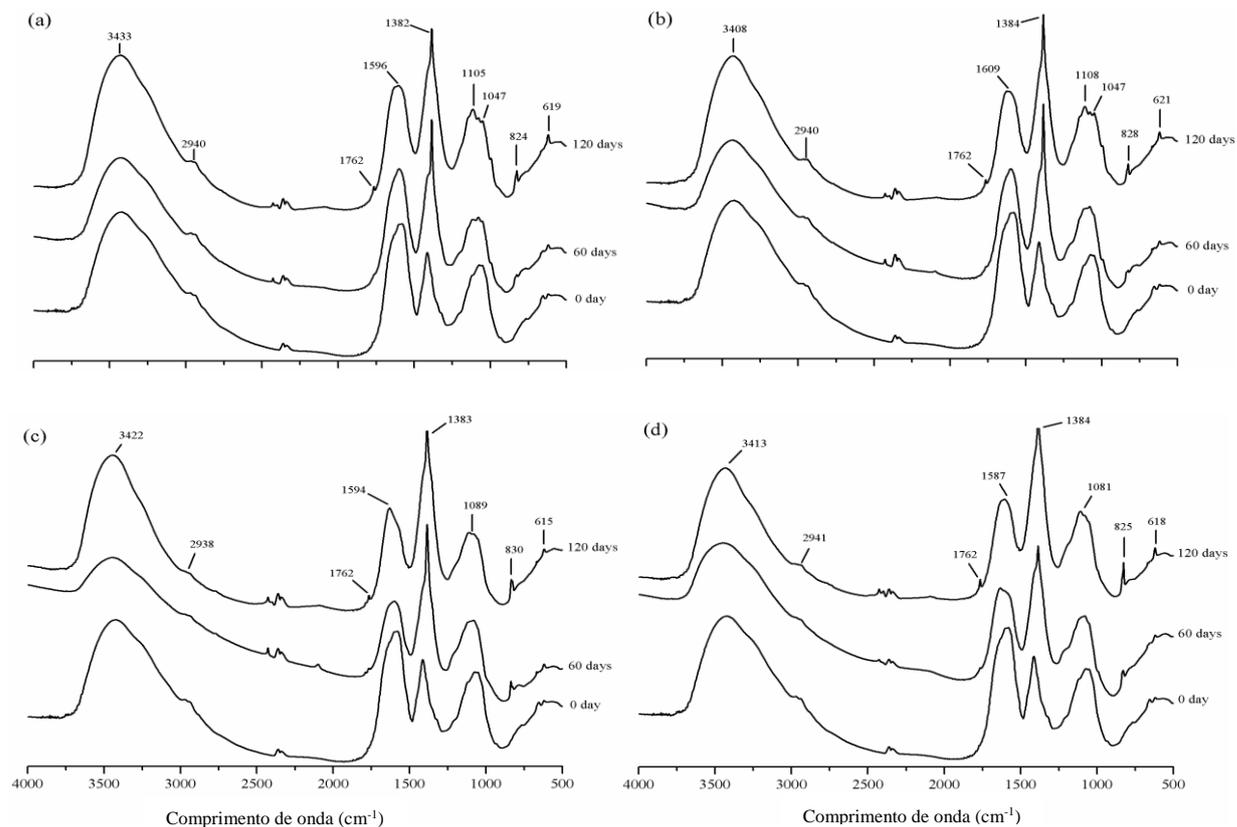


Fig. 5. Espectros de FTIR de ácido fúlvico extraídos em diferentes estágios da incubação de resíduo de cafeeiros com esterco bovino: (a) controle sem macroinvertebrados edáficos, (b) com milípedes, (c) com minhocas, e (d) com milípedes + minhocas.

4. DISCUSSÃO

4.1. COT, CSA E RELAÇÕES $C/N_{\text{sólida}}$ E $C/N_{\text{solúvel}}$ DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE RC + EB

Os decréscimos nos teores de COT ao longo do período de decomposição dos resíduos estão de acordo com outros estudos que utilizaram resíduos orgânicos diversos com ou sem macroinvertebrados edáficos (AMIR *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2010; DOMÍNGUEZ; GÓMEZ-BRANDÓN, 2013).

A ausência de diferença ($p > 0,05$) nos teores de COT entre os tratamentos CONT e MILI pode ser explicada pela baixa atratividade nutricional que o EB apresenta para *R. botocudus*. Ao longo da incubação, o RC foi consumido em MILI, ao passo que o EB permaneceu, de modo geral, sem ser utilizado por esses invertebrados (observação pessoal). Milípedes são conhecidos pelo seu hábito alimentar detritívoro, se alimentando

preferencialmente de resíduos de plantas (*litterfall*) em diferentes estágios de decomposição (e.g., ASHWINI; SRIDHAR, 2005; AMBARISH; SRIDHAR, 2013; SVYRYDCHENKO; BRYGADYRENKO, 2014).

A partir dos 60 dias, os menores teores de COT ($p \leq 0,05$) nos tratamentos com a presença de minhocas demonstra o forte potencial desses macroinvertebrados para o consumo dos dois tipos de resíduos utilizados (RC e EB). Minhocas do gênero *Eisenia* possuem maior preferência por esterco animal como fonte energética e nutricional comparado a outros resíduos (EDWARDS; BOHLEN, 1996; SIDDIQUE *et al.*, 2005; MAHBOUB KHOMAMI *et al.* 2016). Isso foi demonstrado no nosso estudo, sendo o EB consumido inicialmente por *E. andrei*. Posteriormente, após sofrer “ataque” microbiano, esses oligoquetas consumiram o RC. O consumo mais tardio desse resíduo é justificado devido a sua maior recalcitrância comparado ao EB (ver teores de lignina na Tabela 1).

A relação C/N é um dos principais indicadores usados para avaliar a maturidade de processos controlados de decomposição de resíduos (e.g., FERNÁNDEZ-GÓMEZ *et al.*, 2010; SRIDHAR; AMBARISH, 2013; ZHOU *et al.*, 2014). A relação C/N_{sólida} igual ou menor do que 20 é considerada um nível satisfatório para a maturidade de resíduos orgânicos (HIRAI *et al.*, 1983). No presente estudo, aos 120 dias, a relação C/N_{sólida} menor que 16 em todos os tratamentos é um indicativo que os substratos estavam estáveis e maduros.

Macroinvertebrados edáficos favorecem à redução da relação C/N_{sólida} de diversos resíduos orgânicos comparados a tratamentos sem suas presenças (ASHWINI; SRIDHAR, 2006; DOMÍNGUEZ; GÓMEZ-BRANDÓN, 2013). Em geral, macroinvertebrados detritívoros atuam na quebra mecânica dos resíduos orgânicos, aumentando a superfície disponível para a decomposição bioquímica microbiana (SCHEU; WOLTERS, 1991; KARTHIGEYAN; ALAGESAN, 2011). Além disso, comunidades microbianas diversas são ativadas, por exemplo, quando resíduos passam pelo intestino desses invertebrados (LAVELLE, 1997). No nosso estudo, a atuação conjunta desses fatores possivelmente promoveu a otimização das perdas de C, e, conseqüentemente, a redução acentuada da relação C/N. No tratamento MILI, a redução da relação C/N ao longo da incubação esteve também relacionada ao maior incremento ($p \leq 0,05$) no teor de N total (28.5 g kg⁻¹) comparado aos demais tratamentos (aumento de 54% versus 19% em MINH).

Os resultados para o decréscimo dos teores de CSA e da relação $C/N_{\text{solúvel}}$ é representativo de processos controlados de decomposição (e.g., BERNAL *et al.*, 1998; CHAREST *et al.*, 2004; CASTALDI *et al.*, 2008). Durante os estágios iniciais, moléculas bioquímicas prontamente biodisponíveis (i.e., pequenas moléculas solúveis, tais como, carboidratos, peptídeos e outras) estão em maiores concentrações nos resíduos imaturos (ZMORA-NAHUM *et al.*, 2005; ALIDADI *et al.*, 2016). Na medida que estas moléculas são utilizadas pelos microrganismos, o CSA e, conseqüentemente, a relação $C/N_{\text{solúvel}}$, são reduzidos rapidamente (ZMORA-NAHUM *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2014). Suportam essa hipótese os resultados das emissões de C-CO₂ do presente estudo, sendo que os maiores picos de emissão foram observados no primeiro mês da incubação, com destaque para os tratamentos com a presença da minhoca *E. andrei* que liberaram mais C-CO₂ (Figura S1).

Independentemente da presença de milípedes, a adição de minhocas otimiza os decréscimos de CSA e a relação $C/N_{\text{solúvel}}$ ao longo da decomposição. Isso sugere que minhocas aceleram esse processo (MANNA *et al.*, 1997; MANNA *et al.*, 2003), resultando na redução da duração da decomposição de RC + EB. O valor final do CSA atingido na maturidade por todos os tratamentos (120 dias), abaixo de 5 g kg⁻¹, foi muito inferior ao limite de 10 g kg⁻¹ sugerido por Hue e Liu (1995) e adotado por Zmora-Nahum *et al.* (2005).

Valores de relação $C/N_{\text{solúvel}}$ variando de 5 a 6 são considerados como níveis satisfatórios de maturidade de resíduos orgânicos (CHANYASAK; KUBOTA, 1981; HUANG *et al.*, 2006). No presente estudo, os valores observados para a relação $C/N_{\text{solúvel}}$ indicam que os tratamentos com a presença de minhocas atingiram a completa maturidade antes dos 90 dias de decomposição.

4.2. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Os decréscimos nas SH ao longo da decomposição possivelmente estão relacionados ao forte decréscimo da fração AF que ocorreu em todos os tratamentos. A redução da fração AF e o conseqüente aumento da fração AH sugere que os microrganismos utilizaram a fração AF (i.e., composto orgânicos de menor peso molecular) para o seu metabolismo, conseqüentemente transformando a matéria orgânica em AH. Estudos sugerem que os AF são precursores para a formação dos AH (e.g.,

DOANE *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2014). Nesse sentido, os AF e outras moléculas orgânicas prontamente disponíveis (C solúvel) são degradadas e fornecem energia para os microrganismos na produção de AH (WANG *et al.*, 2014). A formação crescente de AH de peso molecular superior e características aromáticas é indicativa da maturidade dos adubos orgânicos (SENESI *et al.*, 1989). Deve-se ressaltar que durante a extração do AF pode ter ocorrido extração em conjunto de C solúvel.

As SH são formadas a partir do processo denominado de humificação, e diferentes rotas têm sido propostas para explicar esse processo (ver SILVA; MENDONÇA, 2007). Devido ao teor de lignina relativamente elevado nos resíduos utilizados no nosso estudo (principalmente no RC), pode-se inferir que ocorreram rotas de humificação em que a lignina foi a macromolécula precursora. Em uma dessas rotas considera-se que a lignina é degradada pelos microrganismos, liberando ácidos e aldeídos fenólicos, os quais são transformados em quinonas por meio da atividade enzimática. Essas quinonas possivelmente sofrem polimerização dando origem a macromoléculas húmicas.

Ao final da decomposição, a maior relação AH/AF ($p \leq 0,05$) do tratamento MILI + MINH se deve a um possível sinergismo de funções entre esses macroinvertebrados (TIAN *et al.*, 1995). Devido a sua preferência alimentar por esterco animal (EDWARDS; BOHLEN, 1996), *E. andrei* consumiram inicialmente o EB. Paralelamente, os espécimes de *R. botocodus* consumiram seletivamente o RC. A quebra desse resíduo favoreceu o seu posterior consumo pelas minhocas na forma *in natura* ou na forma de excrementos de milípedes (observação pessoal). Esse sinergismo entre macroinvertebrados otimizou a atividade microbiana com consequente maior consumo de AF e incremento da relação AH/AF. Isso é um indicativo que a adição conjunta de *R. botocodus* e *E. andrei* acelera a humificação e maturidade do RC + EB.

4.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

4.3.1. Bandas de ácido húmico (AH)

Os decréscimos de intensidade dos grupos O-H ($3421-3402\text{ cm}^{-1}$), grupos C-H alifáticos ($2940-2850\text{ cm}^{-1}$), grupos CH_2 alifáticos e OH ($1129-1121\text{ cm}^{-1}$) e grupos C-O

(1093-1082 cm^{-1}), implicam na degradação gradual de proteínas, lipídios e polissacarídeos durante a decomposição dos resíduos utilizados (INBAR *et al.*, 1990; STEVENSON, 1994; HUANG *et al.*, 2006). A redução gradual na intensidade de pequenas bandas que variaram de 1513-1506 cm^{-1} sugere degradação de moléculas aromáticas (lignina, lignocelulose) ao longo da decomposição (OUATMANE *et al.*, 2000; SMIDT; MEISSL, 2007).

Picos agudos em torno de 836-830 cm^{-1} podem ser atribuídos à deformação CH de grupos aromáticos (BADDI *et al.*, 2004). O incremento na intensidade desses picos ao longo do tempo em todos os tratamentos possivelmente ocorreu devido a aumentos de estruturas aromáticas de maior estabilidade na matéria orgânica.

Todas essas alterações sugerem que moléculas orgânicas facilmente degradáveis tais como polissacarídeos, álcoois e cadeias alifáticas curtas, são oxidadas, refletindo no enriquecimento de grupos aromáticos de maior estabilidade (GERASIMOVWICZ; BAYLER, 1985; HUANG *et al.*, 2006). Além disso, as mudanças mais evidentes com a presença de minhocas demonstram que a adição da *E. andrei* otimizou a maturidade do RC + EB. Essas alterações observadas já aos 60 dias indicam que esses oligoquetas aumentaram a velocidade da humificação com reflexos positivos na maturidade. Por outro lado, alterações entre os tratamentos MILI e CONT não foram evidentes, mostrando que a presença de milípedes somente não é suficiente para otimizar a maturidade de RC + EB.

4.3.2. Bandas de ácido fúlvico (AF)

Semelhantemente ao verificado para espectros de AH, na medida em que a incubação progrediu, os AF foram tornando-se gradativamente mais ricos em estruturas aromáticas (e.g., picos pequenos em torno de 830 e a 621 cm^{-1}), enquanto estruturas alifáticas (e.g., picos em torno de 2940 cm^{-1}) foram reduzidas (STEVENSON, 1994; BADDI *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006).

No presente estudo, os espectros de AF demonstraram maior sensibilidade na diferenciação dos tratamentos em relação aos AH. Com o progresso da incubação, as bandas e/ou picos que correspondem a estruturas alifáticas sofreram decréscimos mais evidentes nos tratamentos com a presença da *E. andrei*. Da mesma forma, picos que correspondem a estruturas mais aromáticas e de maior estabilidade sofreram incrementos mais acentuados na presença dessa espécie de minhoca. Como previamente constatado

nos espectros de AH, a análise dos espectros de AF suportam a hipótese de que esses oligoquetas otimizaram a humificação e a maturidade de RC + EB. Ao contrário, essa hipótese não pode ser ratificada para o tratamento MILI.

Esses resultados corroboram com os encontrados para as SH. Ao longo da incubação, maiores decréscimos do C das SH foram obtidos na presença de minhocas, e essa redução nas SH ocorreu devido ao acentuado decréscimo do C do AF. A forte degradação do C dos AF associado a modificações acentuadas dos seus grupamentos funcionais demonstra o forte potencial desses oligoquetas na humificação do RC + EB.

4. CONCLUSÕES

A partir dos 60 dias, os tratamentos com minhocas apresentaram menores teores de COT ($p \leq 0,05$) comparados aos demais tratamentos, demonstrando o grande potencial da espécie *E. andrei* para o consumo do RC + EB. Ao final da decomposição (120 dias), a relação $C/N_{\text{sólida}}$ menor que 16 em todos os tratamentos é indicador que todos os substratos atingiram a maturidade. Porém, essa relação nos tratamentos MINH e MILI + MINH, atingiram valores entre 30 e 60 dias correspondentes a 120 dias para o tratamento CONT. Isso indica que a maturidade do RC + EB nos tratamentos com *E. andrei* é atingida em aproximadamente um quarto do tempo em CONT.

Independentemente da presença de milípedes, a presença de *E. andrei* otimizou os decréscimos de CSA e $C/N_{\text{solúvel}}$ ao longo da incubação, sugerindo que essa espécie de minhoca acelerou a decomposição do RC + EB.

Os teores de C das SH sofreram decréscimos ($p \leq 0,05$) ao longo da incubação de 34, 38, 46 e 48% para MILI, CONT, MINH e MILI + MINH, respectivamente.

No estágio final da incubação (120 dias), ocorreu maior ($p \leq 0,05$) relação AH/AF no tratamento MILI + MINH, sugerindo sinergismo de funções entre *R. botocudus* e *E. andrei*. Isso é indicativo que a adição conjunta desses macroinvertebrados acelera a humificação de RC + EB.

Para a FTIR, a redução de grupos alifáticos em AH demonstrou a degradação de moléculas orgânicas prontamente disponíveis, enquanto um aumento nos grupos aromáticos indicou a maturidade do RC + EB. As alterações nos espectros foram mais pronunciadas nos tratamentos com a presença de minhocas (alterações observadas já a

partir dos 60 dias). Por outro lado, diferenças entre tratamentos CONT e MILI não foram evidentes ao longo da incubação. Esses resultados demonstram que a espécie *E. andrei* otimizou a maturidade do RC + EB, enquanto *R. botocudus* somente não é suficiente para otimizar a maturidade desses resíduos.

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Tabela S1. Principais bandas de ácido húmico nos espectros de FTIR

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3421-3402	estiramentos O-H de ligação de hidrogênio em grupos carboxílicos, álcoois e fenóis
2940-2850	estiramentos C-H alifático; grupos metil e metileno; lipídios e gorduras
1661-1654	estiramentos C=O de amida (amida I), C=O de quinona e, ou C=O ligados ao H de cetonas conjugadas
1623-1619	estiramento C=C aromático
1513-1506	C=C de estruturas aromáticas; lignina, lignocelulose
1453-1449	estiramento C-H alifático e de grupos metila
1380-1370	deformação OH e estiramento C-O de OH fenólico, deformação C-H de CH ₂ e CH ₃
1129-1121	ligações simétricas de CH ₂ alifáticas e OH
1093-1082	estiramento C-O de estruturas tipo polissacarídeos
1000-992	estiramento C-O de carboidratos e polissacarídeos
836-830	deformação CH de compostos aromáticos

Tabela S2. Principais bandas de ácido fúlvico nos espectros de FTIR

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3433-3408	estiramentos O-H de ligação de hidrogênio em grupos carboxílicos, álcoois e fenóis
2941-2938	estiramentos C-H alifático; lipídios
1609-1587	estiramento das ligações C=C aromáticas e, ou deformação N-H + estiramento C=N (amida II)
1384-1382	deformação OH e estiramento C=O de grupos fenólicos, deformação C-H de CH ₂ e CH ₃ , estiramento COO ⁻
1108-1081	estiramento C-O de estruturas tipo polissacarídeos
830-824	deformação CH de grupos aromáticos
621-615	C-C mono substituto em anéis aromáticos

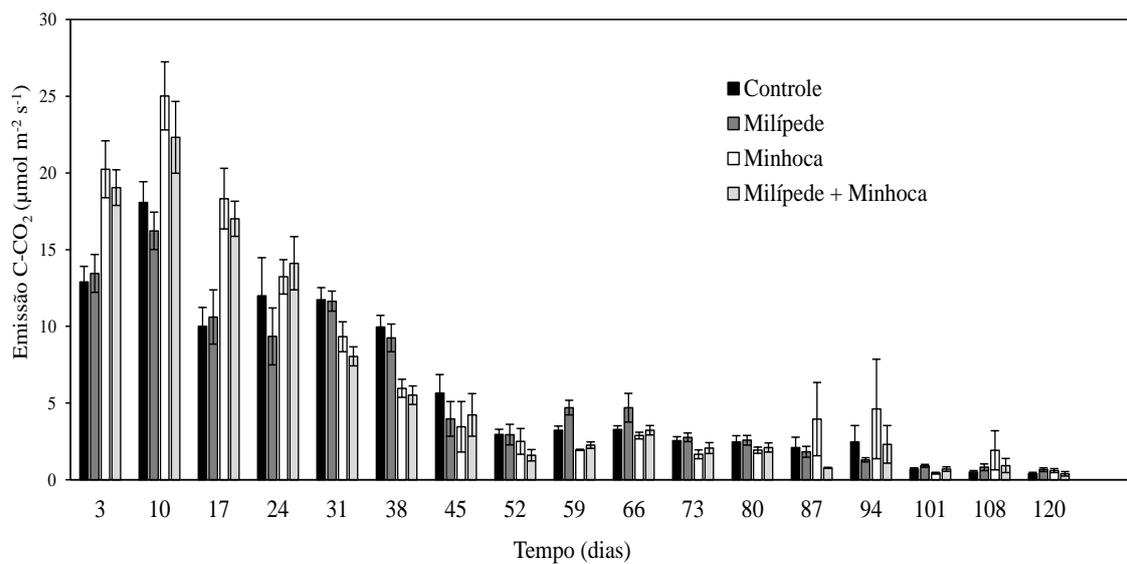


Figura S1. Emissão de C-CO₂ ao longo de 120 dias de incubação de RC + EB sob a influência de milípede, minhoca e milípede + minhoca.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO MILÍPEDE TROPICAL, *Rhinocricus botocudus*, NA DEGRADAÇÃO E MATURIDADE DE RESÍDUOS DE CAFEIEIRO

RESUMO

No Brasil, aproximadamente 3 toneladas de massa seca por hectare de resíduos de cafeeiros (RC), formado por folhas e galhos < 5 mm de diâmetro, foram acumulados nas margens das lavouras nas últimas safras das colheitas semi-mecanizadas. Desse modo, a produção de substratos e adubos orgânicos a partir da bioconversão de resíduos da atividade cafeeira é tema importante no Brasil e no mundo. O objetivo do estudo foi investigar a eficácia do milípede tropical *Rhinocricus botocudus* sobre a degradação e maturidade de resíduos de cafeeiro (RC). Foram testadas a presença e a ausência de *R. botocudus* em cinco tempos de amostragem (0, 30, 60, 90 e 120 dias), com três repetições (n = 3). As variáveis analisadas foram: teores de C e N total, lignina, celulose, C e N solúvel, polifenóis solúveis, C das substâncias húmicas e análise de infravermelho em ácido húmico (AH) e fúlvico (AF). No estágio final da incubação (120 dias), os menores valores de celulose, celulose/lignina e polifenóis ocorreram com *R. botocudus*. A análise de infravermelho de AH demonstrou que estruturas facilmente biodegradáveis, tais como álcoois e moléculas alifáticas de cadeia curta, foram decompostas ao longo do tempo, refletindo conseqüentemente no incremento de estruturas aromáticas de maior estabilidade. Comparadas ao controle, essas alterações nos AH foram mais evidentes na presença de *R. botocudus*. Os resultados do presente estudo sugerem que essa espécie de milípede altera a dinâmica de degradação e humificação do RC acelerando a maturidade desse resíduo.

Palavras-chave: *Rhinocricus botocudus*, celulose, lignina, substâncias húmicas, FTIR.

ABSTRACT

In Brazil, approximately 3 tons of dry mass per hectare of coffee plant residues (CR), formed by leaves and branches < 5 mm of diameter, were accumulated in the margins of the coffee plantations in the last semi-mechanized harvests. Thus, the production of substrates and organic fertilizers from the bioconversion of residues of coffee activity is an important theme in Brazil and in the world. The objective of the study was investigate the effectiveness of the tropical millipede *Rhinocricus botocudus* on the degradation and maturity of coffee plant residues (CR). The presence and the absence of *R. botocudus* were tested in five sampling times (0, 30, 60, 90, and 120 days), with three replicates (n = 3). The analyzed variables were: total C and N, lignin, cellulose, soluble C and N, soluble polyphenols, C of the humic substances and analysis of infrared in humic acid (HA) and fulvic acid (FA). At the incubation end (120 days), the lowest values of cellulose, cellulose/ lignin and polyphenols occurred with *R. botocudus*. Infrared analysis of HA demonstrated that readily biodegradable structures, such as alcohols and short chain aliphatic molecules, were decomposed over time, reflecting in the increase of aromatic structures of higher stability. Compared to control, these alterations in HA were more evident in the presence of *R. botocudus*. The results of the present study suggest that this species of millipede alters the dynamics of degradation and humification of the CR.

Keywords: *Rhinocricus botocudus*, cellulose, Lignin, Humic substances, FTIR.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, segundo maior produtor mundial de café Robusta (*Coffea canephora*), produz grande quantidade de resíduos provenientes da colheita e beneficiamento dos seus frutos. Aproximadamente 3 toneladas de MS por hectare de resíduos de cafeeiros (RC), formado por folhas e galhos < 5 mm de diâmetro (base de cálculos em BRAGANÇA *et al.*, 2010), foram acumulados nas margens das lavouras nas últimas safras das colheitas semi-mecanizadas. Diante dessa quantidade elevada de RC, a sua disposição tornou-se um problema importante a nível econômico, social e ambiental no Brasil e no mundo.

O RC é um material recalcitrante e de baixa degradabilidade comparado a outros resíduos orgânicos (ver BERNAL *et al.*, 2009; TORTOSA *et al.*, 2012; SUBHEDAR; GOGATE, 2014; YAN *et al.*, 2015), e apresenta algumas desvantagens para a utilização direta em manejos de solos ou outros fins agronômicos: (1) altos níveis de polifenóis fitotóxicos; (2) altos teores de componentes estruturais recalcitrantes (e.g., lignina e celulose); (3) baixa densidade (base seca) que onera a sua utilização. Em função dos altos níveis de matéria orgânica e de alguns nutrientes (e.g., K, Ca), bem como da grande quantidade em que são produzidos, o RC tem como alternativa promissora ser reaproveitado para a produção de substratos e adubos orgânicos.

Os milípedes (Classe Diplopoda) são artrópodes terrestres que podem ser utilizados para otimizar a bioconversão de resíduos em adubos orgânicos (KARTHIGEYAN; ALAGESAN, 2011; RAMANATHAN; ALAGESAN, 2012; SRIDHAR; AMBARISH, 2013; ANTUNES *et al.*, 2016). A maioria das espécies é detritívora e se alimenta, preferencialmente, de resíduos de plantas (*litterfall*) com contrastantes composições químicas (ASHWINI; SRIDHAR, 2005; SEMENYUK *et al.*, 2011; AMBARISH; SRIDHAR, 2013; SVYRYDCHENKO; BRYGADYRENKO, 2014). Esses animais, por meio da alimentação, fragmentam mecanicamente os resíduos orgânicos aumentando a sua área superficial e, em consequência, favorecem o crescimento e a atuação bioquímica microbiana (SCHEU; WOLTERS, 1991; LAVELLE, 1997; RAWLINS *et al.*, 2006). Os excrementos são constituídos por tecidos vegetais não digeridos, partículas minerais, microrganismos, além de possuir valores de pH mais elevados, tal como maior capacidade de retenção de água comparada ao *litterfall* estruturado (TAJOVSKÝ *et al.*, 1992).

A espécie de milípede *Rhinocricus botocudus* (Rhinocricidae) é relativamente pequena comparada aos seus congêneres (comp. de 53-80 mm; e larg. de 8.0-10.3 mm) (SCHUBART, 1962) e são largamente encontradas em lavouras de café Robusta do estado do Espírito Santo, Brasil, onde se alimentam do *litterfall* dos cafeeiros (observação pessoal). A densidade populacional nessas lavouras variou de 0 a 60 indivíduos por m², com um máximo de massa da matéria seca de 36 g m⁻² (dados não apresentados). Em condições de laboratório, foi observado um consumo de RC de 190 mg de MS indivíduo⁻¹ dia⁻¹ (dados não apresentados). O consumo verificado em laboratório é considerado elevado para a espécie de milípede tropical (ver CORREIA; AQUINO, 2005; BIANCHI; CORREIA, 2007), e pode ser explicado pelo alto teor de cálcio no RC associado à alta demanda que possuem por esse elemento químico para a produção do exoesqueleto calcificado (HOPKIN; READ, 1992; KALISZ; POWELL, 2003). No entanto, apesar do grande potencial e da importância, ainda existe pouca literatura sobre a decomposição com espécies de milípedes tropicais.

O RC é um resíduo com altos teores de lignina e celulose. A lignina é uma molécula tridimensional muito complexa e é o componente estrutural mais recalcitrante da parede celular da planta (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A celulose é um polímero de glicose formado por unidades de celobiose (DELMER; AMOR, 1995). Em geral, quanto maior o teor do complexo lignina-celulose em resíduos orgânicos, mais tempo para ser degradado por enzimas extracelulares microbianas (BUSWELL; ODIER 1995; PARTHASARATHI *et al.*, 2016). Devido à forte interação entre microrganismos e milípedes, esses invertebrados influenciam a dinâmica de degradação de componentes estruturais em resíduos orgânicos; no entanto, não existem estudos sobre a influência de milípedes tropicais na decomposição desses componentes em RC.

Em se tratando de processos de humificação de resíduos, as substâncias húmicas (SH) são componentes importantes da matéria orgânica que favorecem direta e indiretamente o crescimento de plantas (STEVENSON, 1994; NARDI *et al.*, 2002; PLAZA *et al.*, 2008). As SH são formadas principalmente pelos ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF), e essas frações são utilizadas para estudar a dinâmica de transformação das SH em processos controlados de decomposição de resíduos (e.g., DIAS *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2015). A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método analítico muito adotado para monitorar transformações em grupos funcionais de AH e AF em processos de compostagem e vermicompostagem (BADDI *et*

al., 2004; HUANG *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2014; ANTUNES *et al.*, 2015); no entanto, são desconhecidos estudos de FTIR em frações de SH em processos de decomposição de resíduos com milípedes tropicais.

A maturidade dos resíduos orgânicos pode ser verificada a partir do estudo de algumas variáveis consideradas indicadoras em processos de decomposição, e.g., teores de C (solúveis e totais) e polifenóis solúveis (BERNAL *et al.*, 1998; CASTALDI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2010; ANTIL *et al.*, 2013); porém, devem ser consideradas em conjunto com outras variáveis, como a relação AH/AF e análises espectroscópicas. O objetivo do estudo foi investigar a eficácia do milípede tropical *R. botocudus* sobre a degradação e maturidade de RC. A hipótese do nosso estudo é que em 120 dias de incubação o milípede *R. botocudus* otimiza a decomposição e maturidade do RC, promovendo maior degradação de componentes recalcitrantes da MO (e.g., lignina, celulose, polifenóis), além de incrementar a relação AH/AF e compostos aromáticos de maior estabilidade de AH e AF.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. EXPERIMENTO DE INCUBAÇÃO COM *Rhinocricus botocudus*

O experimento foi conduzido sob condições de laboratório com adultos de *R. botocudus*. Em julho de 2015 foram coletados milípedes para a instalação do experimento em lavoura de café Robusta no município de Linhares, estado do Espírito Santo, Brasil (19° 23' 28" S, 40° 04' 20" W). A região possui clima tropical Aw, apresentando estação chuvosa no verão e seca no inverno, com precipitação média anual de 1160 mm e temperatura média de 25°C. O solo da localidade foi classificado como um Latossolo Amarelo (EMBRAPA, 2013).

Os resíduos de cafeeiro (RC) utilizados foram formados por folhas e galhos < 5 mm de diâmetro. Esse resíduo foi coletado 30 dias após sua poda para a colheita semi-mecanizada do café Robusta em Linhares-ES, Brasil (19°15'67'' S, 40°01'93'' W). As características físico-químicas do RC utilizado estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas do resíduo de cafeeiros (RC) usado no estudo

Atributos	RC
Umidade (%)	10,6
Densidade base seca (Mg m ⁻³)	0,10
pH água (1:10)	7,6
CE ¹ (dS m ⁻¹)	1,4
Fósforo (g kg ⁻¹)	3,5
Potássio (g kg ⁻¹)	14,3
Cálcio (g kg ⁻¹)	30,6
Magnésio (g kg ⁻¹)	6,6

¹CE: condutividade elétrica

Os containers, formados por caixas de isopor de 48,7 x 25,7 x 18,9 cm, foram preenchidos com uma camada de 12,6 L de RC. O volume de material adicionado foi aferido por meio do peso em balança, e, para isso, sua densidade foi previamente determinada.

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), num esquema fatorial 2 x 5, sendo dois níveis de invertebrados (com e sem milípedes) e cinco intervalos de amostragem (0, 30, 60, 90 e 120 dias), com três repetições (n = 3). Para o nível milípede (MILI), os containers foram inoculados com 25 g de peso fresco de adultos de *R. botocudus* (aprox. 16 ± 1 indivíduos ou 10 g de massa seca). Essa quantidade foi determinada com base em um teste preliminar do consumo de RC por *R. botocudus* (dados não apresentados) e de acordo com Karthigeyan e Alagesan (2011). O nível controle (CONT) consistiu de containers incubados sem *R. botocudus*.

Os containers foram cobertos com tecido poroso de cor preta e o experimento se desenvolveu no escuro, em ambiente com temperatura controlada a 25 ± 2 °C. A umidade foi calculada para 50 % durante todo o experimento (em base seca), porém oscilações foram verificadas. Essa umidade foi corrigida por meio de cálculos matemáticos a partir de amostragens realizadas de 15 em 15 dias (aprox. 2 g de material fresco) e secagem em estufa. O umedecimento dos containers foi realizado diariamente. As variáveis do estudo foram determinadas por meio de amostragem inicial e aos 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.

2.2. EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As substâncias húmicas (SH) foram extraídas de acordo com procedimentos adaptados de Huang *et al.* (2006) e Zhou *et al.* (2014). Amostras previamente secas ao ar foram extraídas com NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), com relação sólido: extrator de 1:10 (m/v, base massa seca) após agitação por 24 horas. O sobrenadante, que contém as substâncias húmicas, foi coletado após centrifugação a $8000g$ por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido por duas vezes, e, para cada amostra, os extratos foram reunidos no mesmo recipiente. O pH do extrato foi ajustado para 7,0 com HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), sendo a análise do C orgânico das SH realizada de acordo com Walkley e Black (1934). A separação do ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF) foi realizada da seguinte forma: o pH do extrato foi ajustado para 1,0 com HCl (3 mol L^{-1}) e foi mantido em repouso durante 12 horas a uma temperatura de 4° C . Posteriormente, foi centrifugada à $8000g$ por 15 minutos. O precipitado continha o AH, enquanto o sobrenadante continha o AF. O AF foi separado em outro recipiente, e o AH foi lavado com HCl ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) por duas vezes. O pH de ambas frações foi ajustado para 7,0 e o C orgânico foi determinado de acordo com Walkley e Black (1934). Amostras remanescentes de AH e AF foram liofilizadas para obter uma massa sólida e usadas para análise de FTIR.

2.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para os tempos 0, 60 e 120 dias de incubação. Esta análise foi realizada por transmissão na amostra em formato de pastilha em amostra diluída em brometo de potássio (KBr). As pastilhas foram preparadas adicionando 180 mg de KBr a 4 mg de AH ou AF liofilizados. Posteriormente, foram triturados em almofariz até a mistura se tornar homogênea. A mistura foi colocada em um pastilhador convencional (13 mm de diâmetro) e prensadas a 10 t cm^{-2} . As amostras foram escaneadas num intervalo entre 4000 e 500 cm^{-1} usando o equipamento Tensor 27 da marca Bruker equipado com o software Opus 6.5.

2.4. MATÉRIA ORGÂNICA (MO), LIGNINA, CELULOSE, C ORGÂNICO TOTAL (COT) E N TOTAL (NT)

Em amostras previamente secas de todos os estágios da incubação, o teor de MO foi determinado em mufla pela perda por ignição a 550 ° C. Foram realizadas também análises de COT e NT por meio de analisador elementar Analyser Organic Elementar, Flash 2000 (Thermo Scientific).

Os teores de lignina e celulose foram determinados pelo método de fibra em detergente ácido (FDA) de Van Soest e Wine (1968), que se baseia na separação das diferentes frações constituintes do material, utilizando reagentes específicos denominados detergentes. Foram usados o H₂SO₄ e o cetiltrimetil amônio bromídico (CTAB), eliminando amido e os compostos nitrogenados, restando, assim, a lignina, celulose e cinzas. A celulose foi eliminada pelo H₂SO₄ (72 %) e a lignina determinada por diferença de peso, subtraindo-se as cinzas pela queima a 550 °C, em mufla (ANDERSON; INGRAM, 1996).

2.5. C SOLÚVEL EM ÁGUA (CSA), N SOLÚVEL EM ÁGUA (NS) E POLIFENÓIS SOLÚVEIS (PS)

Para a determinação do CSA, NS e PS, amostras de todos estágios da incubação foram previamente secas em estufa (65° C) e trituradas em moinho (< 2 mm). Para a determinação do CSA e NS foi realizada extração com água destilada (relação 1:10, m/v) por meio de agitação durante 24 horas. Os extratos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos e em seguida foram filtrados. O teor de CSA foi determinado por meio de oxidação com dicromato de potássio (0.33 mol L⁻¹) e titulação com sulfato ferroso heptahidratado (0.4 mol L⁻¹) e indicador difenilamina (CIAVATTA *et al.*, 1991). O teor de NS foi determinado pelo método Kjeldhal (adaptado de BREMNER; MULVANEY, 1982; e TEDESCO, 1995).

Para determinação dos PS, a extração foi realizada a partir de 100 mg de amostra misturada a 40 mL de metanol (50 %), e mantidos à temperatura de 77-80 °C, durante uma hora. A concentração final foi determinada colorimetricamente (760 nm) usando o reagente Folin-Denis e ácido tânico como padrão (ANDERSON; INGRAM, 1996).

2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas em três repetições ($n = 3$) e os valores médios e erros padrões foram apresentados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de LSD ($p \leq 0,10$) foi usado para determinar diferenças significativas entre tratamentos. A estatística foi com auxílio do *software* Sisvar.

3. RESULTADOS

3.1. EVOLUÇÃO DA MO, COT, NT, LIGNINA E CELULOSE DURANTE A INCUBAÇÃO DO RC

Durante a incubação do RC os teores de MO decresceram ($p \leq 0,01$) e não houve diferença entre tratamentos (Tabela 2). Destaca-se que, em ambos tratamentos, os decréscimos foram baixos, em torno de 4 % do valor inicial.

Os teores de COT decresceram ($p \leq 0,001$) ao longo do período de incubação, enquanto os de N aumentaram ($p \leq 0,05$) (Tabela 2). Não houve diferença entre tratamentos para os teores de COT e NT ($p > 0,05$). Durante o estágio inicial da decomposição (0-30 dias), os teores de COT sofreram reduções nas proporções de 3,5 a 4,3 %, sendo que, em geral, essas proporções foram diminuindo ao longo do período de incubação.

A redução nos teores de COT associada ao aumento nos teores de NT resultou em decréscimo ($p \leq 0,01$) da relação C/N em ambos tratamentos. Ao final da incubação (120 dias) não ocorreu diferença para a relação C/N entre tratamentos. Nesse período, valores da relação C/N de 19 e 18 ocorreram para o controle e o tratamento com *R. botocudus*, respectivamente.

Tabela 2. Valores médios de MO, COT e NT em diferentes tempos de incubação do RC com e sem *R. botocudus*

Tempo (dias)	MO (%)		COT (g kg ⁻¹)		N (g kg ⁻¹)		C/N	
	CONT	MILI	CONT	MILI	CONT	MILI	CONT	MILI
Inicial	91 ±0,2	91 ±0,2	428 ±1,3	428 ±1,3	22 ±0,4	22 ±0,4	23 ±0,5	23 ±0,5
30	90 ±0,1	90 ±0,1	410 ±3,7	413 ±0,3	23 ±0,9	23 ±0,3	21 ±0,9	21 ±0,2
60	89 ±0,6	89 ±0,4	419 ±1,2	421 ±5,4	25 ±0,4	21 ±0,9	20 ±0,3	24 ±1,3
90	87 ±1,5	88 ±0,4	405 ±5,2	408 ±4,0	25 ±0,8	24 ±0,7	19 ±0,7	20 ±0,7
120	87 ±0,5	88 ±0,5	404 ±3,4	406 ±2,5	26 ±0,7	27 ±1,6	19 ±0,7	18 ±1,0

A evolução nos teores de lignina do RC está apresentada na Tabela 3. Ocorreram efeitos do tempo em ambos tratamentos ($p \leq 0,0001$), sendo as proporções de acréscimos ao final da incubação (120 dias) de 4 e 21 % para o tratamento controle e com *R. botocudus*, respectivamente. A partir dos 90 dias, ocorreram diferenças ($p \leq 0,001$) com maiores teores de lignina no tratamento com *R. botocudus* comparado ao controle.

Para os teores de celulose ocorreram efeitos de tempo em ambos tratamentos ($p \leq 0,0001$) (Tabela 3). Para o controle, ocorreu incremento desses teores ao longo da incubação. Para o tratamento com *R. botocudus* ocorreu redução a partir do terceiro mês de incubação, sendo que aos 120 dias ocorreu redução de 5% em relação ao valor inicial. A partir dos 90 dias, o tratamento com *R. botocudus* apresentou menores teores de celulose comparado ao controle.

O RC apresentou relação celulose/lignina inicial de 0,80, sendo que ao final da incubação (120 dias) valores de 0,92 e 0,63 ocorreram para os tratamentos controle e com *R. botocudus*, respectivamente (Tabela 3). A partir dos 90 dias da incubação, valores menores para essa relação ($p \leq 0,0001$) foram verificados com *R. botocudus* em comparação ao controle.

Tabela 3. Celulose, lignina e relação celulose/lignina em diferentes tempos de incubação do RC com e sem *R. botocudus*

Tempo (dias)	Celulose (g kg^{-1})		Lignina (g kg^{-1})		Celulose/Lignina	
	CONT	MILI	CONT	MILI	CONT	MILI
Inicial	304 \pm 2,6	304 \pm 2,6	382 \pm 5,4	382 \pm 5,4	0,80 \pm 0,007	0,80 \pm 0,007
30	293 \pm 0,2	299 \pm 5,1	431 \pm 3,0	434 \pm 4,4	0,68 \pm 0,005	0,69 \pm 0,025
60	306 \pm 7,1	348 \pm 7,7	429 \pm 0,4	414 \pm 1,5	0,71 \pm 0,016	0,84 \pm 0,010
90	359 \pm 5,5	326 \pm 5,1	423 \pm 4,5	458 \pm 4,0	0,85 \pm 0,009	0,71 \pm 0,015
120	366 \pm 1,4	290 \pm 5,0	398 \pm 4,3	462 \pm 2,4	0,92 \pm 0,021	0,63 \pm 0,010

3.2. EVOLUÇÃO DO C SOLÚVEL EM ÁGUA (CSA), $\text{C/N}_{\text{solúvel}}$ E POLIFENÓIS SOLÚVEIS

Em ambos tratamentos, os teores de CSA decresceram ($p \leq 0,0001$) ao longo do período de incubação, sendo que nos primeiros 30 dias ocorreram as maiores reduções (Fig. 1a). Após 60 dias, o tratamento com *R. botocudus* apresentou menor ($p \leq 0,10$) teor de CSA comparado ao controle. Ao final da incubação (120 dias), os teores médios foram de 5,5 e 4,2 g kg^{-1} para os tratamentos controle e com milípedes, respectivamente.

Houve redução significativa ($p \leq 0,0001$) da relação C/N_{solúvel} ao longo do tempo para ambos tratamentos (Fig. 1b). Ao final da incubação (120 dias), o tratamento com *R. botocudus* apresentou a menor ($p \leq 0,06$) relação C/N_{solúvel}, com valor de 10,5.

A evolução dos teores de polifenóis solúveis do RC mostrou padrão similar ao do CSA, caracterizada por forte decréscimo durante os primeiros 30 dias da incubação (Fig. 1a). Após 60 dias, o tratamento com *R. botocudus* apresentou menor ($p \leq 0,001$) teor de polifenóis comparado ao controle.

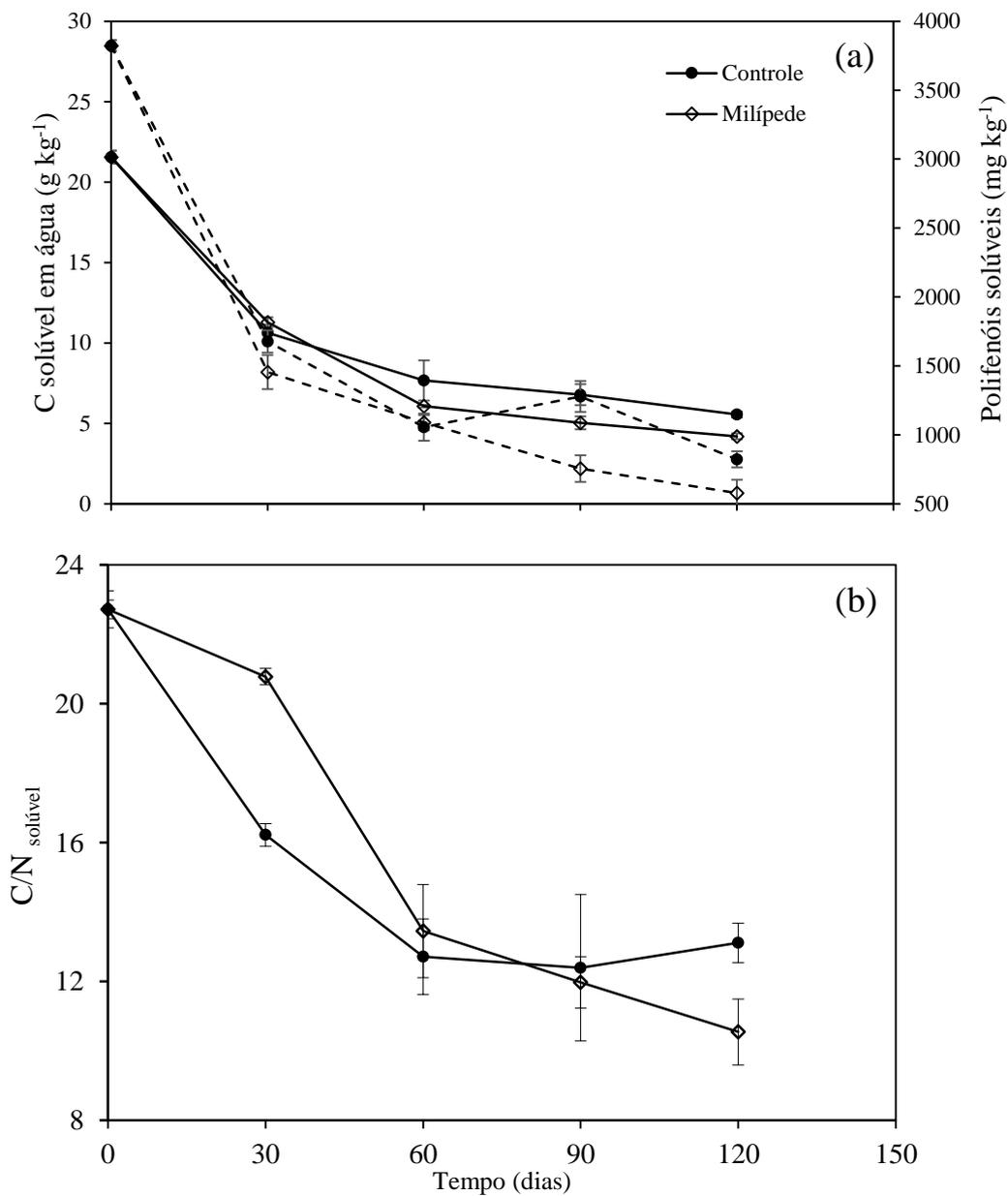


Fig. 1. Mudanças no C solúvel em água (—) e polifenóis solúveis (--) (a); e na relação C/N solúvel (b) durante a decomposição de RC sob a influência do milípede *R. botocodus*.

3.3. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH)

Em ambos tratamentos, os teores de C das SH decresceram ($p \leq 0,0001$) ao longo do período de incubação (Fig. 2a). Após os 30 dias, o teor de C das SH foi menor ($p \leq 0,001$) no tratamento com *R. botocodus* comparado ao controle. As proporções de reduções foram de 30 e 52% para o tratamento controle e com milípedes, respectivamente.

O incremento nos teores de C do AH associado à forte redução de C do AF (dados não apresentados), resultou em aumento ($p \leq 0,0001$) na relação AH/AF em ambos tratamentos ao longo da incubação (Fig. 2b). Após os 60 dias, o tratamento com *R. botocudus* demonstrou maior ($p \leq 0,05$) relação AH/AF comparado ao controle. Aos 120 dias, o tratamento com milípedes apresentou relação AH/AF de 2,9, enquanto o controle apresentou 2,2.

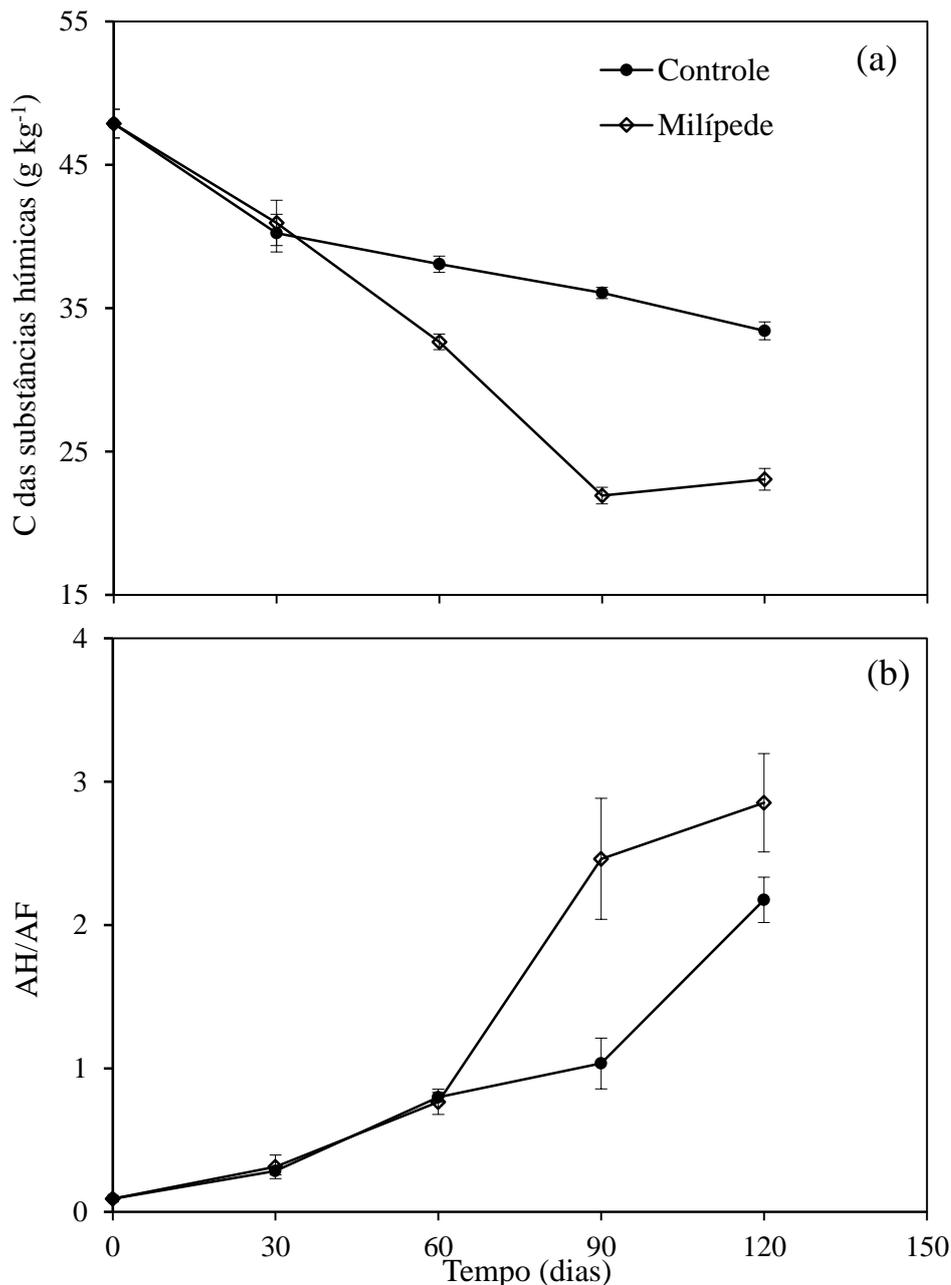


Fig. 2. Mudanças nos teores de C das substâncias húmicas extraíveis (a) e na relação AH/AF (b) durante a decomposição de RC sob a influência do milípede *R. botocudus*.

3.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

3.4.1. Bandas de ácido húmico (AH)

As mudanças ao longo da incubação para o AH estão apresentadas na Fig. 3. As principais bandas de absorvância com suas respectivas atribuições estão apresentadas na Tabela S1 (Informações suplementares). Em ambos tratamentos ocorreram decréscimos de intensidade ao longo do tempo para as seguintes bandas de absorvância: bandas largas que variaram de 3408-3404 cm^{-1} (estiramento O-H); picos pequenos a 2926 cm^{-1} (grupos C-H alifáticos); e picos pequenos de 1122-1119 cm^{-1} (grupos CH_2 alifáticos). Por outro lado, incrementos de intensidade ocorreram para picos agudos de 837-834 cm^{-1} (CH de compostos aromáticos). Todas essas alterações, de modo geral, foram mais evidentes com a presença de *R. botocudus* comparadas ao tratamento controle e a maioria dessas alterações puderam ser notadas já aos 60 dias.

Além disso, ocorreu forte absorção em torno de 1000-999 cm^{-1} (C-O de polissacarídeos). Para esse intervalo, ocorreram incrementos ao longo de toda a incubação para o tratamento controle. No tratamento com *R. botocudus* esses picos sofreram forte incremento aos 60 dias, seguido de redução aos 120 dias.

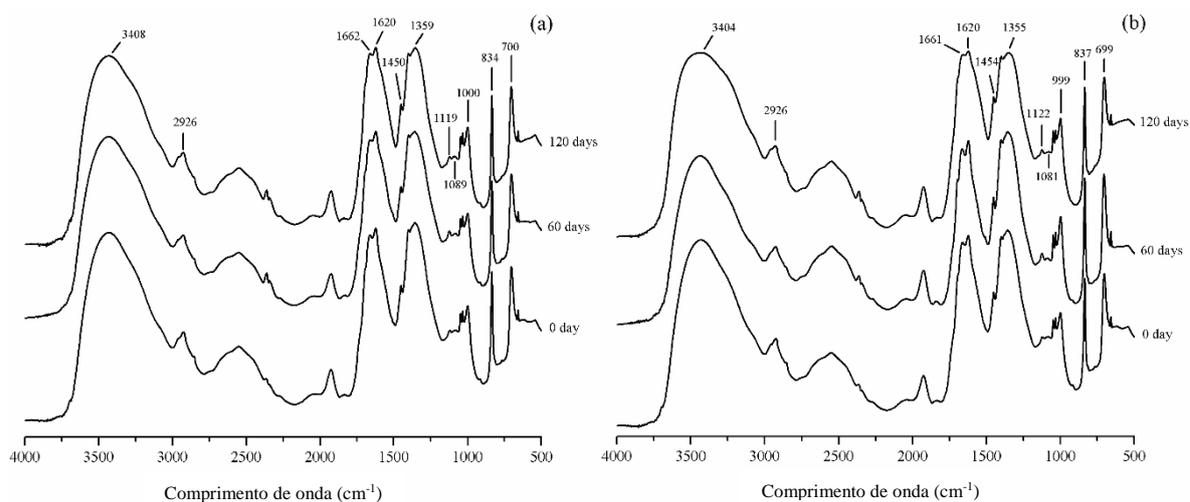


Fig. 3. Imagens FTIR de ácido húmico durante diferentes estágios da incubação de resíduo de cafeeiros (RC): controle (a); e com milípedes *R. botocudus* (b).

3.3.2. Bandas de ácido fúlvico (AF)

Os espectros de AF estão apresentados na Figura 4. As bandas de absorvância com suas atribuições estão apresentadas na Tabela S2 (Informações suplementares). Em ambos tratamentos ocorreram decréscimos de intensidade ao longo do tempo para as seguintes bandas de absorvância: picos a 2940 cm^{-1} (grupos C-H alifáticos); bandas de $1609\text{-}1602\text{ cm}^{-1}$ (deformação N-H + estiramento C=N, amida II); e picos pequenos de $1123\text{-}1121\text{ cm}^{-1}$ (grupos CH_2 alifáticos). Apenas para picos a 2940 cm^{-1} e a 1609 cm^{-1} as reduções de intensidade foram mais evidentes na presença de *R. botocudus*, sendo que, ao longo da incubação, as demais bandas apresentaram tendências similares entre tratamentos.

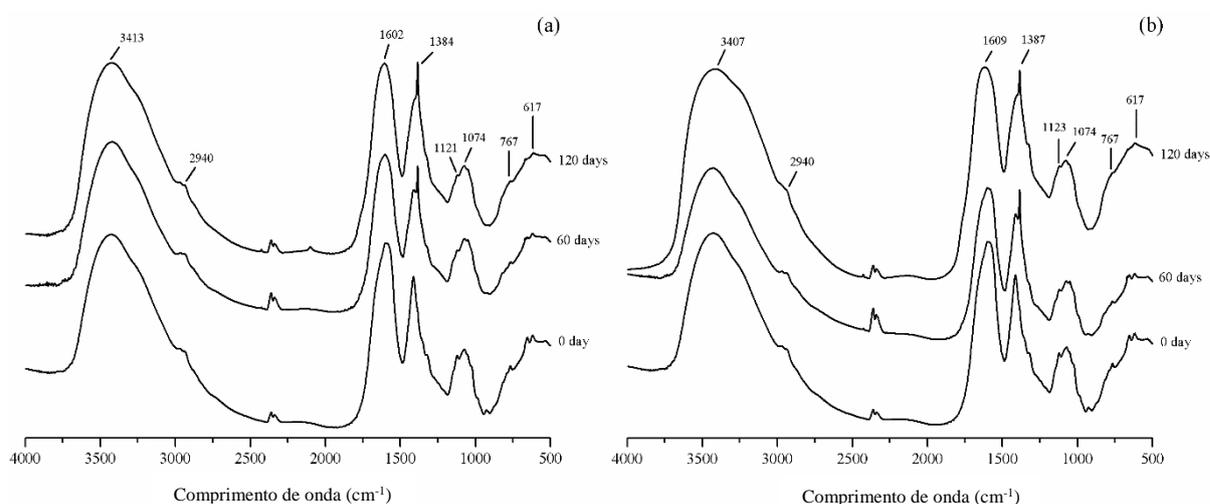


Fig. 4. Imagens FTIR de ácido fúlvico durante diferentes estágios da incubação de resíduo de cafeeiros: controle (a); e com milípedes *R. botocudus* (b).

4. DISCUSSÃO

4.1. EVOLUÇÃO DA MO, COT, NT, LIGNINA E CELULOSE DURANTE A INCUBAÇÃO DO RC

Os decréscimos nos teores de MO e COT são considerados baixos para processos controlados de decomposição, comparados a trabalhos que usaram outros tipos de resíduos (e.g., BERNAL *et al.*, 1998; GRIGATTI *et al.*, 2004). Na decomposição de resíduos lignocelulósicos, tais como RC, os decréscimos de MO e C são menores comparados a outros resíduos lábeis e biodegradáveis (ver DIAS *et al.*, 2010; HUANG *et*

al., 2006; BERNAL *et al.*, 2009). Em estudo de compostagem com resíduo lignocelulósico de bagaço de uva não foram verificadas significativas alterações nos teores de MO e C ao longo de 150 dias de incubação (PARADELO *et al.*, 2013). No nosso estudo, esse baixo grau de evolução da matéria orgânica pode ter sido causado pela alta proporção de lignina do RC (Tabela 3), que confere alta resistência à degradação enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

As maiores perdas de COT no estágio inicial da incubação (0-30 dias) devem estar relacionadas a utilização da matéria orgânica facilmente biodegradável pelos microrganismos (HUANG *et al.*, 2006; BERNAL *et al.*, 2009). Na medida em que materiais facilmente biodegradáveis foram utilizados, as taxas de degradação tornaram-se mais lentas uma vez que compostos orgânicos mais complexos (e.g., lignina, celulose) possivelmente tornam-se a fonte energética e nutricional para atividade microbiana (YAMADA; KAWASE, 2006; ZHOU *et al.*, 2014). As perdas de C orgânico, com consequentes reduções da massa de RC, promoveram incrementos nos teores de N total devido a um possível efeito de concentração desse elemento químico (DIAS *et al.*, 2010).

A relação C/N é um dos principais indicadores usados para avaliar a maturidade de resíduos orgânicos em processos de decomposição (e.g., BERNAL *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-GÓMEZ *et al.*, 2010; DOMÍNGUEZ; GÓMEZ-BRANDÓN, 2013; SRIDHAR; AMBARISH, 2013). No presente estudo, aos 120 dias, a relação C/N menor que 20 em ambos tratamentos é um indicativo que os substratos estavam estáveis e maduros (HIRAI *et al.*, 1983).

Os acréscimos que ocorreram para teores de lignina aos 120 dias sugerem um efeito de concentração dessa macromolécula para o período de incubação utilizado no presente estudo (quatro meses). Em estudo de decomposição de resíduo lignocelulósico (bagaço de uva) ocorreram incrementos nos teores de lignina até o quarto mês, sendo sua degradação e decréscimos iniciada a partir do quinto mês de incubação (PARADELO *et al.*, 2013).

Os maiores incrementos nos teores de lignina com a presença de *R. botocudus* a partir dos 90 dias demonstram que essa espécie otimizou o efeito de concentração dessa macromolécula. Aos 120 dias, a densidade do RC foi de 0.14 e 0.26 Mg m⁻³ para o controle e tratamento com *R. botocudus*, respectivamente (dados não apresentados). Isso demonstra que, ao longo da incubação, o consumo principalmente de folhas compactou a biomassa de RC na forma de excrementos, aumentando consideravelmente a sua

densidade (2.7 vezes em relação ao valor inicial) (Figura S1, informações suplementares). Esse processo também resultou na produção de ramos lignificados de cafeeiros (parcialmente consumidos) que ficaram mais expostos às amostragens (observação pessoal).

A redução nos teores de celulose e os menores valores com *R. botocudus* a partir dos 90 dias demonstra o potencial dessa espécie de milípede para a degradação de compostos estruturais do RC. A degradação de componentes estruturais (e.g., celulose, hemicelulose) de resíduos orgânicos por milípedes pode ser mediada por microrganismos simbióticos e, ou diretamente pelo metabolismo desses macroinvertebrados (COÛTEAUX *et al.*, 2002). Taylor e Crawford (1982) observaram que a degradação de celulose no intestino médio de milípedes foi intermediada por populações de microrganismos aeróbios. Por outro lado, após tratamento bacteriostático, foi verificada atividade enzimática (e.g., xylanase, celulase) no intestino do milípede *Glomeris hexasticha*, indicando que essas enzimas podem ser produzidas diretamente por esses invertebrados (URBASEK; TAJOVSKÝ, 1991).

A relação celulose/lignina demonstra ser um indicador preciso de maturidade em processos controlados de decomposição de resíduos orgânicos (KOMILIS; HAM, 2003; PARADELO *et al.*, 2013). O valor de 0.80 é utilizado como valor limite para distinguir entre resíduos maduros e imaturos, sendo que, em resíduos imaturos esse valor pode estar acima de 4.0 (PARADELO *et al.*, 2013). Em relação ao controle, os menores valores com *R. botocudus* nos estágios finais da incubação, pode ser explicado pela maior degradação de celulose a partir dos 90 dias associado a incrementos nos teores de lignina. Esses resultados indicam que esses miriápodes otimizaram a maturidade do RC por meio da degradação de compostos estruturais desse resíduo.

4.2. EVOLUÇÃO DO C SOLÚVEL EM ÁGUA (CSA), $C/N_{\text{solúvel}}$ E POLIFENÓIS SOLÚVEIS

Os decréscimos nos teores de CSA e da relação $C/N_{\text{solúvel}}$ estão de acordo com outros estudos que utilizaram resíduos orgânicos com características físico-químicas contrastantes com e, ou sem macroinvertebrados edáficos (e.g., CHAREST *et al.*, 2004; CASTALDI *et al.*, 2008; MUPONDI *et al.*, 2011; ALIDADI *et al.*, 2016). Durante os estágios iniciais da decomposição, moléculas biodisponíveis (e.g., carboidratos,

peptídeos e outras) estão em maiores concentrações nos resíduos imaturos (ZMORA-NAHUM *et al.*, 2005; ALIDADI *et al.*, 2016). Na medida em que estas moléculas são degradadas bioquimicamente pelos microrganismos, o CSA é reduzido rapidamente (ZHOU *et al.*, 2014).

Os menores teores de CSA no tratamento com milípedes após os 60 dias (Fig. 1a) podem ser explicados por possíveis mudanças na composição bioquímica que ocorreram quando *R. botocudus* consumiu o RC. Comparações da composição química de resíduo de carvalho (*Quercus robur*) e excrementos do milípede *Glomeris marginata* demonstraram que esse milípede, ao se alimentar desse resíduo, utilizou metabolicamente apenas compostos solúveis facilmente degradáveis, tais como carboidratos e peptídeos de cadeia curta (RAWLINS *et al.*, 2006). Grande parte da degradação desses compostos ocorre com auxílio dos microrganismos que habitam o intestino dos milípedes (RAWLINS *et al.*, 2007). Os resultados dessas investigações suportam os resultados do nosso estudo, sugerindo que *R. botocudus* favorecem a decomposição e maturidade de RC.

Os teores de CSA atingidos aos 120 dias no controle e tratamento com milípedes ($< 6 \text{ g kg}^{-1}$) ficou abaixo de 10 g kg^{-1} , sugerindo que, em ambos tratamentos, o RC atingiu a maturidade no tempo utilizado no nosso estudo (HUE; LIU, 1995). Porém, o valor de $C/N_{\text{solúvel}}$ de 10,5 apresentado para o tratamento com *R. botocudus*, ficou acima do valor considerado ideal (entre 5-6) para a maturidade de acordo com Chanyasak e Kubota (1981), sugerindo, para essa variável, um tempo maior de experimento. O resíduo de cafeeiros apresenta nível de recalcitrância superior (ver teores de lignina na Tabela 3) comparado a outros, tais como esterco de animais (aves e bovino), resíduo de extração de azeite, palha de arroz e outros (ver TORTOSA *et al.*, 2012; SUBHEDAR; GOGATE, 2014; YAN *et al.*, 2015). Ressalta-se que essa recalcitrância superior é conferida principalmente pelos ramos lignificados que compõem 38 % da massa seca desse resíduo e não são consumidos totalmente pelos milípedes (observação pessoal).

As maiores reduções nos teores de polifenóis solúveis nos primeiros 30 dias significam que a fração mais solúvel foi usada como fonte de C durante as primeiras semanas de decomposição do RC, que corresponde ao período de maior atividade microbiana (DIAS *et al.*, 2010). A menor concentração após 60 dias no tratamento com *R. botocudus* comparado ao controle sugere que essa espécie de milípede, por meio de

microrganismos endossimbióticos produtores de enzimas, otimizou a degradação de polifenóis do RC.

Folhas de cafeeiros, que compõe cerca de 62% da massa seca do RC, possuem altos teores de polifenóis (FARAH; DONANGELO, 2006; Salgado *et al.*, 2008). Grande parte das moléculas de polifenóis são consideradas fitotóxicas (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014). Em processos de decomposição de resíduos (e.g., compostagem, vermicompostagem), a degradação de compostos fitotóxicos é considerada indicadora de maturidade (WU *et al.*, 2000; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014). Logo, a maior degradação de polifenóis por *R. botocudus*, especialmente após os 60 dias da incubação, demonstra que essa espécie de milípede possui potencial para otimizar a maturidade de RC.

4.3. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH)

A relação AH/AF é muito utilizada para descrever a dinâmica de transformação de AH e AF, assim como a maturidade em processos controlados de decomposição de resíduos orgânicos (e.g., DEV; ANTIL, 2011; ZHOU *et al.*, 2014). O RC possui quantidades relativamente elevadas de componentes estruturais fibrosos, tais como a lignina. Essa macromolécula fornece compostos fenólicos estáveis que atuam como núcleo base em processos de humificação (STEVENSON, 1994; LOPEZ *et al.*, 2002). Isso explica, em grande parte, a formação crescente de AH (dados não apresentados) e o consequente incremento da relação AH/AF ao longo da incubação do RC.

Adicionalmente, esse aumento da relação AH/AF pode estar relacionado ao forte decréscimo de C da fração AF (dados não apresentados). Esse decréscimo sugere que microrganismos utilizaram esses ácidos (compostos orgânicos de menor peso molecular) para seu metabolismo e conversão da matéria orgânica em AH (ZHOU *et al.*, 2014). O decréscimo de AF em paralelo à formação crescente de AH (compostos de peso molecular superior) são indicativos da maturidade do RC. Ressalta-se que esse fenômeno foi potencializado na presença de *R. botocudus*, o que explica a maior redução de C das SH após os 30 dias e o maior incremento da relação AH/AF após 60 dias com esse macroinvertebrado.

4.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para os AH, os decréscimos de intensidade ao longo da incubação para grupos O-H em carboxílicos ($3408-3404\text{ cm}^{-1}$), grupos C-H alifáticos (2926 cm^{-1}) e grupos CH_2 alifáticos ($1122-1119\text{ cm}^{-1}$) sugerem degradação gradual de peptídeos, lipídios e polissacarídeos do RC (INBAR *et al.*, 1990; STEVENSON, 1994; HUANG *et al.*, 2006). Por outro lado, o incremento proporcional na intensidade de grupos CH de compostos aromáticos ($837-834\text{ cm}^{-1}$), possivelmente ocorreu devido a aumentos de estruturas aromáticas de maior estabilidade na matéria orgânica (GERASIMOVWICZ; BAYLER, 1985; HUANG *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2014). Em geral, essas alterações mais evidentes no tratamento com *R. botocudus* demonstram que essa espécie otimizou a humificação do RC. Nesse sentido, alterações já aos 60 dias (e.g., picos em torno de 837 cm^{-1}) pressupõe que esses miriápodes possuem potencial para acelerar a humificação e maturidade do RC.

O RC contém altos teores de lignina, celulose e outros componentes estruturais, uma vez que esse resíduo é formado por folhas e ramos de cafeeiros com elevado teor de fibras. Isso justifica o aparecimento de picos com comprimento de onda de $1000-999\text{ cm}^{-1}$ (grupos C-O de carboidratos e polissacarídeos) (ZHOU *et al.*, 2014). Além disso, a redução de intensidade nesse pico aos 120 dias no tratamento com *R. botocudus* suporta os resultados de redução nos teores de celulose e reforça o potencial dessa espécie para a degradação de componentes estruturais do RC.

Os resultados de FTIR para AF confirmaram os encontrados para AH, mostrando que estruturas alifáticas instáveis (e.g., 2940 cm^{-1} , $1123-1121\text{ cm}^{-1}$) foram sendo biodegradadas ao longo da incubação. Porém, comparados aos AH, os espectros de AF foram menos sensíveis para a diferenciação de tratamentos.

5. CONCLUSÕES

Os decréscimos de MO e COT do RC foram baixos ao longo da incubação, sendo esse comportamento causado principalmente pela alta concentração de componentes estruturais (e.g., lignina, celulose). Porém, ao final da incubação, os menores valores de

celulose, celulose/lignina e polifenóis solúveis no tratamento com *R. botocudus* ressaltam o potencial dessa espécie para a degradação de compostos estruturais e fenólicos do RC.

A análise de FTIR de AH do resíduo de cafeeiro demonstrou que moléculas alifáticas de cadeia curta foram decompostas ao longo da incubação, refletindo, proporcionalmente, no incremento de estruturas aromáticas de maior estabilidade. Essas alterações foram mais evidentes na presença de *R. botocudus*. Em adição a isso, essa espécie promoveu maiores incrementos da relação AH/AF. Esses resultados sugerem que essa espécie altera a dinâmica de humificação do RC acelerando a sua maturidade.

O valor de $C/N_{\text{solúvel}}$ de 10,5 para o tratamento com *R. botocudus* ficou acima do valor considerado ideal para a maturidade de resíduos orgânicos (entre 5-6). Associado a isso, ocorreram maiores incrementos nos teores de lignina com *R. botocudus* nos estágios finais da incubação. Isso demonstra que, por meio do consumo seletivo de folhas, essa espécie otimizou a concentração dos ramos lignificados de cafeeiros. Portanto, se a utilização do insumo gerado for para fins agronômicos (e.g., substratos para mudas), recomenda-se a separação desses ramos remanescentes por meio de peneiramento.

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Tabela S1. Principais bandas de ácido húmico nos espectros de FTIR

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3408-3404	estiramentos O-H de ligação de hidrogênio em grupos carboxílicos, álcoois e fenóis
2926	estiramentos C-H alifático; grupos metil e metileno; lipídios e gorduras
1662-1661	estiramentos C=O de amida (amida I), C=O de quinona e, ou C=O ligados ao H de cetonas conjugadas
1620	estiramento C=C aromático
1454-1450	estiramento C-H alifático e de grupos metila
1359-1355	deformação OH e estiramento C-O de OH fenólico, deformação C-H de CH ₂ e CH ₃
1122-1119	ligações simétricas de CH ₂ alifáticas e OH
1089-1081	estiramento C-O de estruturas tipo polissacarídeos
1000-999	estiramento C-O de carboidratos e polissacarídeos
837-834	deformação CH de compostos aromáticos

Tabela S2. Principais bandas de ácido fúlvico nos espectros de FTIR

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3413-3407	estiramentos O-H de ligação de hidrogênio em grupos carboxílicos, álcoois e fenóis
2940	estiramentos C-H alifático; lipídios
1609-1602	estiramento das ligações C=C aromáticas e, ou deformação N-H + estiramento C=N (amida II)
1387-1384	deformação OH e estiramento C=O de grupos fenólicos, deformação C-H de CH ₂ e CH ₃ , estiramento COO ⁻
1123-1121	estiramento C-O de estruturas tipo polissacarídeos
767	deformação CH de grupos aromáticos
617	C-C mono substituto em anéis aromáticos

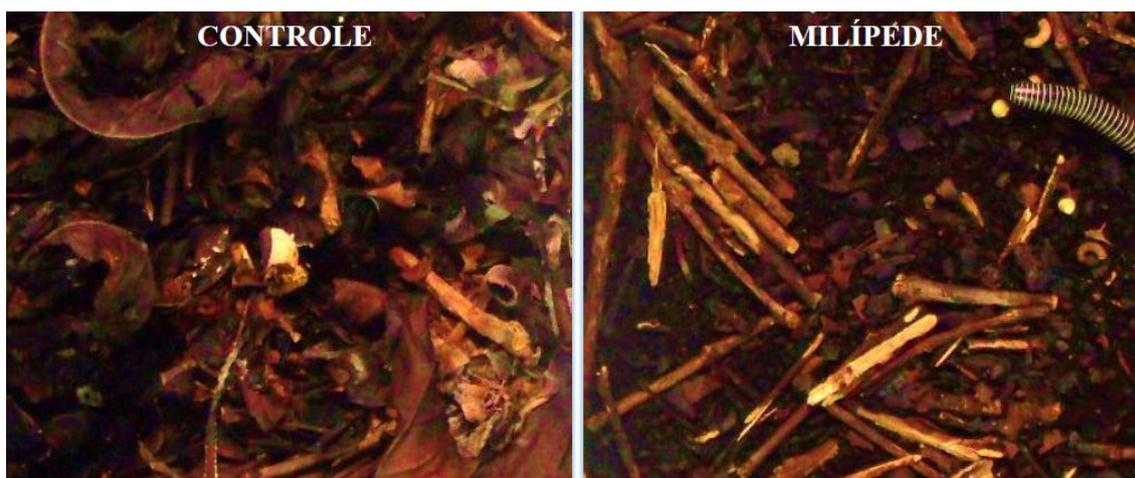


Figura S1. Aspecto da transformação dos resíduos de cafeeiro (RC) pelo milípede *R. botocudus* em comparação com o controle (sem milípede) aos 120 dias.

Tabela S3. Valores médios e erros padrões de variáveis em teste realizado para a determinação da umidade do presente estudo

Umid. (%) ¹	Milípede fresco inicial (g)	Milípede fresco final (g)	IBD ² (mg dia ⁻¹)	CD ³ (mg dia ⁻¹)	MS Excrem. ⁴ (g)
0	4,997 ± 0,049	4,760 ± 0,040	-47,307 ± 2,259	0,000 ± 0,000	0,009 ± 0,001
30	5,318 ± 0,112	5,536 ± 0,111	43,587 ± 4,433	67,367 ± 31,592	0,308 ± 0,126
40	5,269 ± 0,279	5,744 ± 0,325	95,047 ± 4,059	184,016 ± 35,564	0,767 ± 0,146
50	4,958 ± 0,153	5,990 ± 0,142	206,380 ± 6,308	374,989 ± 24,070	1,559 ± 0,108

¹Umid. (%): umidade em base seca dos resíduos de cafeeiro (RC); ²IBD: incremento de biomassa diário do milípede *R. botocudus*; ³CD: consumo diário em base seca; ⁴MS Excrem.: massa seca de excremento. Observações: 1) O teste teve duração de 5 dias; 2) Foram utilizados 2 indivíduos de *R. botocudus* por UE (1 casal); 3) Não foram utilizados valores de umidade > 50 % em virtude da sobra de água na UE.

CAPÍTULO 4

EFEITO DE COBERTURAS VEGETAIS SOBRE A MACROFAUNA EPIGÉICA E COMUNIDADES DE MILÍPEDES (DIPLOPODA) EM REGIÃO TROPICAL

RESUMO

A macrofauna edáfica constitui um importante indicador para avaliar efeitos provocados pelas coberturas vegetais e manejos sobre a qualidade do solo (QS). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de coberturas vegetais sobre a macrofauna epigeica e comunidades de milípedes por meio de relações com atributos de solo e de serapilheira. Amostragens foram realizadas em dois períodos (seco e chuvoso) nos seguintes sistemas: cafeeiros (*Coffea canephora*) em monocultivo (CAMO); cafeeiros consorciados com cedro australiano (*Toona ciliata*) (CACE); cacauzeiros (*Theobroma cacao*) consorciados com cedro (CAUCE); eucalipto (*Eucalyptus urophylla*) (EUCAL); e um fragmento de Mata Atlântica nativa (MATA) utilizado como referência. Em geral, as variáveis analisadas foram: pH, C, C-CO₂, macronutrientes e atributos físicos do solo; macronutrientes, lignina, celulose e polifenóis da serapilheira. No período seco, o EUCAL foi o sistema com menores valores de densidade (70,40 indivíduos m⁻²) e de riqueza de grupos taxonômicos da macrofauna (7 grupos), provavelmente devido à baixa qualidade química do *litterfall*. A presença do predador Pseudoscorpiones exclusivamente na MATA em ambos períodos (seco e chuvoso), ratificam esse grupo como bom indicador de solos conservados. No período seco, a inserção do cedro australiano com cafeeiros (CACE) melhorou a diversidade da comunidade de milípedes comparado ao sistema CAMO, sendo que apresentaram valores para diversidade de Shannon (H') de 0,46 e 0,25, respectivamente. Em todos os sistemas de cultivos ocorreram reduções da diversidade de milípedes entre períodos sazonais. Por outro lado, o fragmento de mata Atlântica nativa mostrou manutenção da diversidade entre períodos, o que reforça a estabilidade ecológica do solo desse sistema.

Palavras-chave: *Coffea canephora*, Polyxenidae, milípedes, monocultivo.

ABSTRACT

The edaphic macrofauna is an important indicator to evaluate effects caused by vegetation covers on soil quality (SQ). The objective of this study was to evaluate the effect of vegetation covers on the epigeic macrofauna and millipede communities by means of relationships with soil and litter attributes. Samplings were carried out in two periods (dry and rainy) in the following systems: coffee plants (*Coffea canephora*) in monoculture (COMO), coffee plants intercropped with Australian cedar (*Toona ciliata*) (COCE), cacao plants (*Theobroma cacao*) intercropped with cedar (CAOCE); plants of *Eucalyptus urophylla* (EUCAL); and a native Atlantic Forest fragment (FOREST) used as a reference. In general, the variables analyzed in the soil were: pH, total carbon, C-CO₂ emission, macronutrients, and soil physical attributes. In the litter were: macronutrients, lignin, cellulose and polyphenols. In the dry period, EUCAL was the system with the lowest values of macrofauna density and richness (70.40 individuals m⁻² and 7 taxonomic groups, respectively), probably due the low chemical quality of the litterfall. The presence of the predator Pseudoscorpiones exclusively in the FOREST in both periods (dry and rainy), ratify this taxonomic group as a good indicator of conserved soils. In the dry period, the insertion of the Australian cedar with coffee plants (COCE) improved the diversity of the millipede community compared to the COMO system, and presented values for the Shannon' diversity index (H') of 0.46 and 0.25, respectively. In all cropping systems there were reductions in millipedes diversity between seasonal periods. On the other hand, the FOREST tratament showed maintenance of diversity between periods, which reinforces the ecological stability of the soil of this system.

Keywords: *Coffea canephora*, Polyxenidae, millipedes, monoculture.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de café Robusta (*Coffea canephora*), e a produção está concentrada em monocultivos localizados principalmente nas regiões litorâneas em áreas originais de Floresta Atlântica de Tabuleiros (FERRÃO *et al.*, 2007). Nessas áreas, além do café também encontram-se em larga escala monocultivos de espécies de eucalipto, impulsionados principalmente pelas indústrias de celulose e energia (GARAY *et al.*, 2003). Ressalta-se que a conversão de ecossistemas tropicais naturais para monocultivos pode acelerar a degradação das propriedades do solo, resultando em prejuízos importantes a nível social, econômico e ambiental.

A consorciação de espécies florestais com culturas agrícolas pode melhorar atributos físicos, químicos e biológicos do solo, ao mesmo tempo que reduz custos com controle de invasoras, torna as condições microclimáticas mais apropriadas à produção e permite a obtenção de outros produtos, e.g., látex, fruta, madeira (DAMATA *et al.*, 2007; DARONCO *et al.*, 2012). Nesse sentido, cafeicultores que utilizam a espécie *C. canephora* iniciaram consórcios com algumas espécies florestais, a exemplo do cedro australiano (*Toona ciliata*), teca (*Tectona grandis*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), gliricídia (*Gliricidia sepium*) e outras (SALES *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Além dos atributos químicos e físicos do solo, a fauna edáfica constitui um importante indicador para avaliar os efeitos provocados pelas coberturas vegetais e manejos sobre a qualidade do solo (QS) (BARROS *et al.*, 2002; MUSSURY *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; LAOSSI *et al.*, 2008). Relações entre a fauna e atributos de solo e serapilheira são utilizadas com sucesso para verificar a distribuição ecológica de grupos taxonômicos e também para inferir sobre a funcionalidade desses organismos nos sistemas naturais e agroecossistemas (MERLIN *et al.*, 2005; AQUINO *et al.*, 2008). Em estudo comparativo de coberturas vegetais, a densidade (indivíduos m⁻²) e a riqueza (nº de grupos taxonômicos) da macrofauna foram favorecidas nos sistemas agroflorestais, sendo esses resultados atribuídos às melhorias nos atributos químicos do solo (e.g., maior teor de bases trocáveis e C orgânico) devido à diversidade de espécies vegetais e ao manejo de poda adotado nesses sistemas (LIMA *et al.*, 2010).

Entre a macrofauna epigeica, o estudo dos milípedes (Arthropoda: Diplopoda) é relevante devido à alta diversidade desses invertebrados em solos de regiões tropicais (GOLOVATCH; KIME, 2009), associada a grande sensibilidade que apresentam às

coberturas vegetais e aos tipos de manejos (DUNGER; VOIGTLÄNDER, 2009). Considerados um grupo muito diverso, possuem mais de 12.000 espécies descritas e uma diversidade estimada em aproximadamente 80.000 espécies (SIERWALD; BOND, 2007). Apesar das controvérsias envolvendo a taxonomia, são reconhecidas três subclasses, sendo Penicillata, Chilognatha e Arthropleuridea (extinta). Dentro da subclasse Penicillata, a família Polyxenidae é a mais conhecida, sendo os diplópodes mais primitivos, com diminuta dimensão corporal (< 4 mm), corpo macio (não calcificado), típicos tufos laterais e posteriores de cerdas (RUPPERT *et al.*, 2005). Todos os demais milípedes existentes pertencem à subclasse Chilognatha, tendo como característica principal o exoesqueleto calcificado e rígido.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de diferentes coberturas vegetais sobre a macrofauna epigeica e comunidades de milípedes por meio de relações com atributos de solo e de serapilheira. A hipótese é que os sistemas consorciados com espécies florestais (e.g., cedro e cacau) apresentam maior riqueza de macrofauna e diversidade de milípedes e se assemelham mais à floresta nativa comparados aos monocultivos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo localiza-se numa propriedade agrícola no município de Sooretama, no estado do Espírito Santo, Brasil (S 19°06.760' e W 40°11.325') (Figura 1). A região possui clima caracterizado como quente e úmido, com precipitação média anual de 1.100 mm e temperatura média de 25°C, apresentando estação chuvosa no verão e período de seca bem evidente no inverno. Nesses locais ocorrem extensos platôs entrecortados por lagoas e brejos, em altitudes que geralmente não ultrapassam os 100 m (LANI *et al.*, 2008). A vegetação nativa corresponde à Floresta Atlântica de Tabuleiros e apresenta características peculiares que a diferenciam da Floresta Atlântica típica que recobre a região serrana (RIZZINI *et al.*, 1997). O solo foi classificado como um Argissolo Amarelo (EMBRAPA, 2013). A distribuição da precipitação mensal na região durante os anos do estudo está na Figura 2.

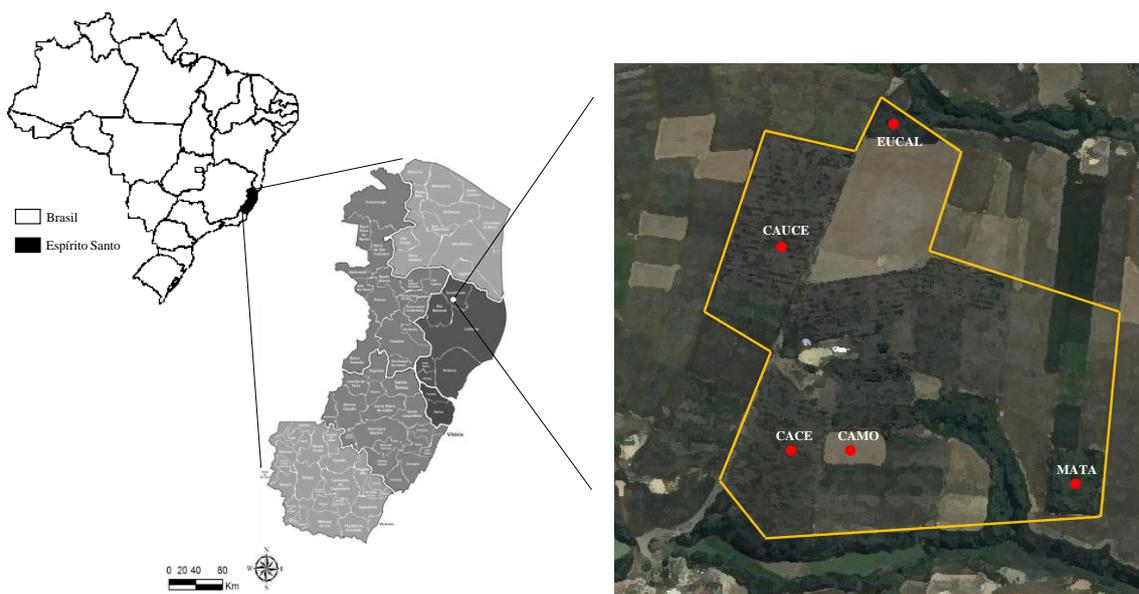


Figura 1. Área de estudo localizada no município de Sooretama, Espírito Santo, Brasil. Cafeeiro em monocultivo (CAMO); cafeeiro consorciado com cedro (CACE); cacauero consorciado com cedro (CAUCE); eucalipto (EUCAL); Mata Atlântica nativa (MATA).

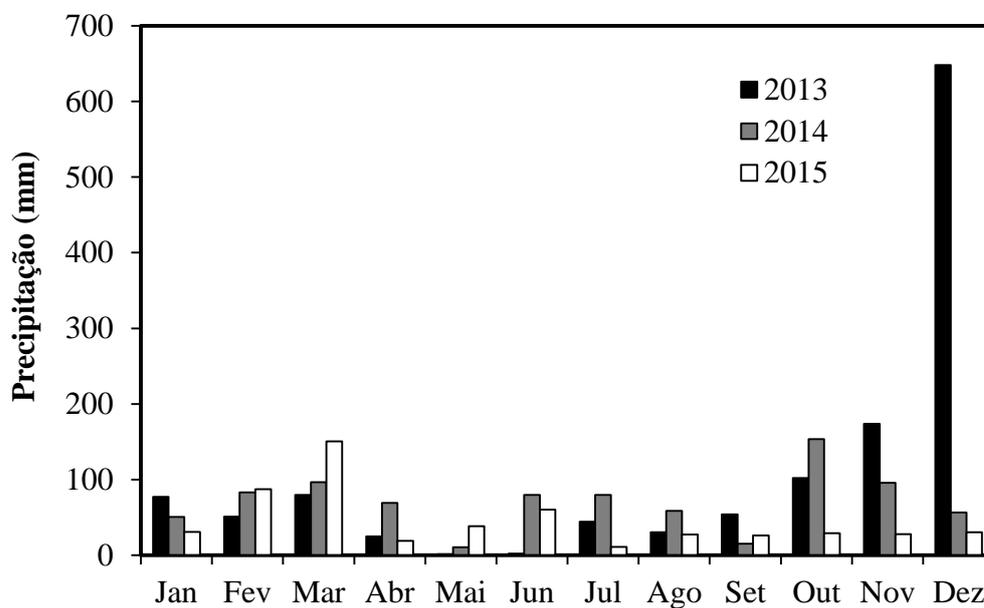


Figura 2. Distribuição da precipitação mensal durante os anos 2013-15. Fonte: Incaper.

Foram realizadas amostragens em cinco sistemas, sendo utilizados sistemas de café conilon (*Coffea canephora*) em monocultivo (CAMO) e consorciado com cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) (CACE); sistema de cacau (*Theobroma cacao*) consorciado com cedro australiano (CAUCE); além de uma plantação de eucalipto

(*Eucalyptus urophylla*) (EUCAL) e um fragmento de mata Atlântica de Tabuleiros (MATA) utilizado como referência. Os diversos manejos e espaçamentos adotados nos cultivos estão na Tabela S1 e Figura S1, respectivamente (Informações suplementares).

2.2. AMOSTRAGENS E ANÁLISES

Foram realizadas duas amostragens de macrofauna epigeica, uma no período seco (agosto de 2013) e outra em período chuvoso (fevereiro de 2015). Em cada sistema foram realizadas 10 coletas aleatórias da serapilheira com auxílio de gabarito de 25 x 25 cm, com no mínimo 10 m de distância entre um ponto e outro. Em laboratório, todos os invertebrados presentes na serapilheira foram triados manualmente e com auxílio de estereomicroscópio foram identificados em grandes grupos taxonômicos (ao nível de ordem) e acondicionados em recipientes plásticos com álcool a 70%. Para os milípedes (Classe Diplopoda), identificações mais refinadas (ao nível de família e, ou espécie) foram realizadas no Museu de Ciências Naturais de Porto Alegre-RS, Brasil.

Após a triagem da fauna, as amostras de serapilheira foram secas em estufa a 65°C, e, em seguida, foi obtida a massa da matéria seca (MS) de cada amostra, sendo extrapolado para Mg ha⁻¹. As amostras foram trituradas em moinho tipo Wiley e determinados os teores de C, N, K, P, Ca e Mg (EMBRAPA, 2009). Com a MS e teores dos nutrientes foram calculados os acúmulos dos nutrientes.

Teores de lignina e celulose da serapilheira foram determinados pelo método da fibra em detergente ácido (FDA) de Van Soest e Wine (1968), que se baseia na separação das diferentes frações constituintes do material, utilizando reagentes específicos denominados detergentes. Foram usados o H₂SO₄ e o cetiltrimetil amônio bromídico (CTAB), eliminando amido e os compostos nitrogenados, restando, assim, a lignina, celulose e cinzas. A celulose foi eliminada pelo H₂SO₄ (72 %) e a lignina determinada por diferença de peso, subtraindo-se as cinzas pela queima a 550 °C, em mufla (ANDERSON; INGRAM, 1996).

Para determinação dos polifenóis solúveis da serapilheira, a extração foi realizada a partir de 100 mg de amostra seca misturada a 40 mL de metanol (50 %) e mantidos a temperatura de 77-80 °C, durante uma hora. A concentração final foi determinada colorimetricamente (760 nm) usando o reagente Folin-Denis e ácido tânico como padrão

(ANDERSON; INGRAM, 1996). Para auxiliar na compreensão do estudo, as principais características das serapilheiras estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características das serapilheiras em diferentes coberturas vegetais no período seco e chuvoso

Variável	Período	CACE	CAMO	CAUCE	MATA	EUCAL
MS (Mg ha ⁻¹)	Seco	13,07	11,81	7,25	17,40	10,94
	Chuvoso	12,07	5,02	9,18	8,40	9,65
Umidade (%)	Seco	37,32	31,89	37,01	37,53	9,47
	Chuvoso	39,41	35,02	34,11	45,26	42,04
Polifenóis (g kg ⁻¹)	Seco	1,48	1,67	1,78	2,64	11,41
	Chuvoso	2,08	2,32	1,61	3,61	9,01
Celulose (g kg ⁻¹)	Seco	216,71	257,72	245,58	253,39	389,47
	Chuvoso	317,58	484,80	273,06	302,45	434,79
Lignina (g kg ⁻¹)	Seco	284,33	296,08	321,43	338,08	261,95
	Chuvoso	372,01	278,68	309,17	386,03	299,06
Fósforo (g kg ⁻¹)	Seco	0,76	0,64	0,83	0,28	0,25
	Chuvoso	0,95	0,50	0,66	0,36	0,27
Potássio (g kg ⁻¹)	Seco	3,55	3,54	3,34	2,09	1,88
	Chuvoso	2,50	2,09	2,29	2,09	2,71
N total (g kg ⁻¹)	Seco	13,03	14,36	12,39	14,24	6,17
	Chuvoso	15,22	11,01	16,59	18,86	7,33
C orgânico (g kg ⁻¹)	Seco	292,85	291,99	297,81	279,54	372,57
	Chuvoso	380,11	399,63	360,21	395,75	424,24
Relação C/N	Seco	26,66	24,73	28,24	23,38	71,61
	Chuvoso	30,54	45,30	25,77	24,77	67,82

CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto; MS: massa da matéria seca da serapilheira.

Nos mesmos pontos de coleta da serapilheira, foram retiradas amostras de solo deformada na camada de 0-5 cm de profundidade para a caracterização dos seguintes atributos químicos: pH em H₂O, P disponível, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ e H+Al (EMBRAPA, 2009). Foram determinados também o carbono orgânico total (COT) (YEOMANS; BREMNER, 1988) e nitrogênio total (NT) (BREMNER; MULVANEY, 1982); matéria orgânica leve em água (MOL) (ANDERSON; INGRAM, 1996), C orgânico solúvel (COS) (BARTLETT; ROSS, 1988) e C da biomassa microbiana (ISLAM; WEIL, 1998). Os seguintes atributos físicos do solo foram determinados: densidade do solo (Ds); densidade de partículas (Dp); macro e microporosidade; porosidade total; textura (areia, silte e argila); umidade do solo na capacidade de campo (CC) (tensão de 10 kPa) e no ponto de murcha permanente (PMP), obtida a uma tensão de 1500 kPa, para o cálculo da

água disponível (AD) (EMBRAPA, 2011). Em cada ponto de amostragem da fauna, a emissão de CO₂ do solo foi determinada (com anéis de PVC a uma profundidade de 5 cm) com analisador portátil modelo LI-8100 (Licor, EUA). As principais características físicas e químicas do solo (0-5 cm) estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais características do solo (0-5 cm) sob diferentes coberturas vegetais no período seco e chuvoso

Variável	Período	CACE	CAMO	CAUCE	MATA	EUCAL
pH	Seco	5,53	5,66	6,16	5,22	5,32
	Chuvoso	5,74	5,75	6,39	4,90	5,14
COT (g kg ⁻¹)	Seco	40,52	41,22	27,14	41,68	32,10
	Chuvoso	45,91	43,48	29,98	45,63	36,14
NT (g kg ⁻¹)	Seco	1,14	1,19	1,20	1,59	0,96
	Chuvoso	3,09	3,16	2,50	3,29	1,80
MOL (g kg ⁻¹)	Seco	3,29	3,15	1,74	7,55	3,59
	Chuvoso	4,67	9,91	2,23	7,52	6,76
Areia (g kg ⁻¹)	Seco	784,00	766,00	701,00	777,00	777,00
	Chuvoso	781,00	765,00	703,00	779,00	779,00
Silte (g kg ⁻¹)	Seco	6,00	37,00	139,00	78,00	64,00
	Chuvoso	6,00	37,00	137,00	79,00	64,00
Argila (g kg ⁻¹)	Seco	210,00	197,00	160,00	145,00	159,00
	Chuvoso	213,00	198,00	160,00	142,00	157,00
CC (m ³ m ⁻³)	Seco	0,165	0,177	0,120	0,128	0,127
	Chuvoso	0,165	0,177	0,120	0,128	0,127
PMP (m ³ m ⁻³)	Seco	0,069	0,077	0,075	0,089	0,076
	Chuvoso	0,070	0,077	0,075	0,087	0,076
AD (m ³ m ⁻³)	Seco	0,097	0,100	0,045	0,040	0,050
	Chuvoso	0,095	0,100	0,045	0,041	0,050

CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto; COT: C orgânico total; NT: nitrogênio total; MOL: matéria orgânica leve; CC: capacidade de campo; PMP: ponto de murcha permanente; AD: água disponível.

2.3. ANÁLISE DOS DADOS

Para a macrofauna epigeica foram calculadas a densidade (indivíduos m⁻²) e a riqueza (nº de grupos taxonômicos) nos diferentes tratamentos. A densidade foi analisada em conjunto com os dados obtidos nas análises de solo e serapilheira, por meio da análise multivariada de componentes principais (ACP). A ACP foi conduzida para explorar a tendência geral entre as variáveis e as coberturas vegetais. Os resultados foram

interpretados em termos de tendências gerais e todos os procedimentos foram realizados usando o *software* Statistica (STATSOFT INC. 2004).

Para a comunidade de milípedes, foi realizada a contagem do número coletado em cada família e/ou espécie. A nível de família, foi determinado o índice de diversidade de Shannon (H') (AQUINO, 2001) e o índice de equitabilidade (J') (PIELOU, 1975). O índice de Shannon (H') é amplamente utilizado em estudos de ecologia de comunidades, sendo dado pela fórmula $H' = \sum p_i \cdot \log p_i$, onde p_i é a proporção de indivíduos de cada espécie, dada por n_i/N , sendo n_i o número de indivíduos de cada espécie e N o número total de indivíduos na amostra. O índice de equitabilidade (J') fornece a distribuição dos indivíduos em cada espécie, sendo dado pela fórmula: $J' = H'/H'_{\max}$, onde $H'_{\max} = \ln S_e$, sendo S_e o número total de espécies (riqueza). Para verificar a relação entre famílias de milípedes e atributos de solo e serapilheira foi realizada correlação linear de amostras simples (análise de correlação de Pearson).

3. RESULTADOS

3.1. PERÍODO SECO (1ª COLETA)

3.1.1. Densidade e relação da macrofauna com atributos de solo e serapilheira

A densidade total de indivíduos foi de 1982 indivíduos m^{-2} (Tabela 3). Comparado aos demais grupos taxonômicos, Isopoda foi o que apresentou o maior valor de abundância em todos agroecossistemas, sendo que suas densidades decresceram na seguinte ordem: CACE > CAMO > CAUCE > MATA > EUCAL. Influenciada principalmente pela forte dominância de Isopoda, CACE foi o sistema que obteve a maior densidade total de macrofauna com 866 indivíduos m^{-2} . A menor densidade total ocorreu no sistema EUCAL com 70 indivíduos m^{-2} . Após Isopoda, o grupo Isoptera (térmitas) foi o mais proeminente em EUCAL com 28% do total coletado. No sistema MATA a maior densidade foi para Formicidae e Pseudoscorpiones foi amostrado apenas nesse sistema.

Os valores de riqueza de CACE e CAMO se assemelharam com a referência MATA, sendo que todos apresentam 12 grupos taxonômicos. Com 7 grupos, o sistema EUCAL foi o que mais se distanciou da MATA.

Tabela 3. Densidade e riqueza da macrofauna sob diferentes coberturas vegetais em amostras coletadas no período seco

GRUPOS	CACE	CAMO	CAUCE	MATA	EUCAL
	Densidade (Indivíduos m ⁻²)				
Diplopoda	65,60	62,40	9,60	9,60	0,00
Isopoda	593,60	211,20	123,20	44,80	22,40
Formicidae	46,40	9,60	81,60	144,00	9,60
Araneae	35,20	56,00	16,00	46,40	8,00
Isoptera	0,00	0,00	0,00	70,40	19,20
Symphyla	8,00	0,00	8,00	11,20	1,60
Coleoptera	6,40	1,60	1,60	6,40	0,00
Pseudoscorpiones	0,00	0,00	0,00	28,80	0,00
Hemiptera	0,00	0,00	0,00	4,80	0,00
Blattodea	3,20	22,40	16,00	12,80	6,40
Larva	11,20	25,60	4,80	3,20	3,20
Oligochaeta	1,60	4,80	0,00	0,00	0,00
Diptera	3,20	1,60	0,00	0,00	0,00
Gastropoda	91,20	8,00	0,00	0,00	0,00
Dermaptera	0,00	3,20	0,00	0,00	0,00
Chilopoda	0,00	0,00	1,60	6,40	0,00
Hymenoptera	4,80	6,40	6,40	0,00	0,00
Total	865,60	406,40	260,80	379,20	70,40
Riqueza	12,00	12,00	10,00	12,00	7,00

CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacaeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto.

A análise de componentes principais (ACP) explicou em 81,35% da variação total (fator 1: 44.88%; fator 2: 36.47%) e separou os atributos físicos, químicos e biológicos de acordo com relações estabelecidas nos agroecossistemas e sistema natural (Fig. 2). Os autovetores Pseudoscorpiones, Formicidae e MOL se relacionaram e contribuíram para explicar a variabilidade do estudo, além disso estiveram no quadrante correspondente ao sistema MATA. Autovetores polifenóis e relação C/N também contribuíram para explicar a variabilidade do estudo e estiveram no quadrante correspondente a EUCAL. De todos autovetores de macrofauna, Isoptera foi o que apresentou maior proximidade com o quadrante de EUCAL.

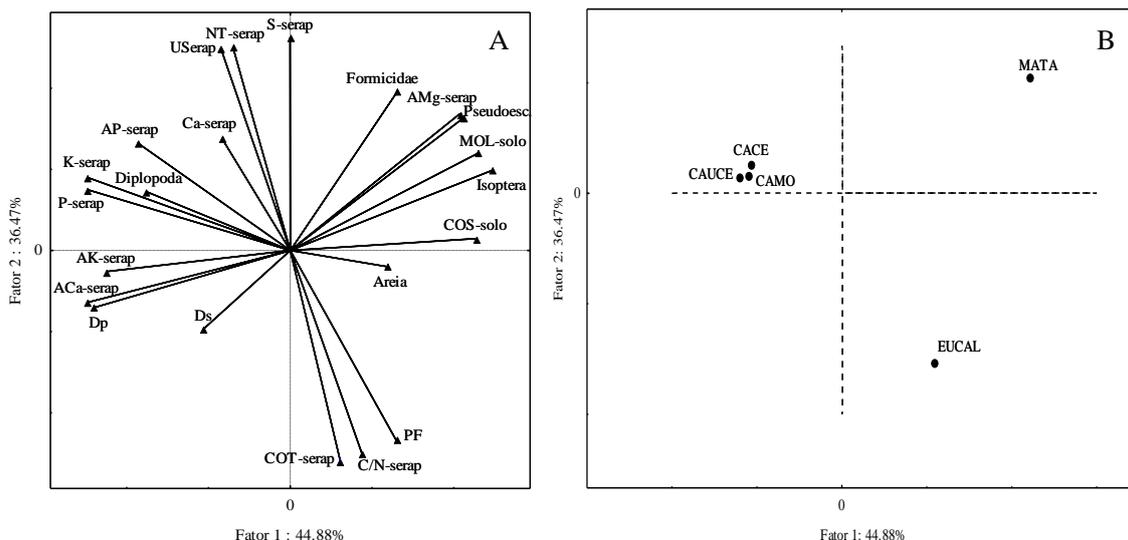


Figura 2. Análise de componentes principais (ACP): projeção dos grupos de macrofauna edáfica e atributos de solo e de serapilheira (A); e projeção dos agroecossistemas e sistema natural (B). S-serap: teor de enxofre na serapilheira; Ca-serap: teor de cálcio na serapilheira; K-serap: teor de potássio na serapilheira; P-serap: teor de fósforo na serapilheira; NT-serap: N total na serapilheira; COT-serap: C orgânico total na serapilheira; C/N-serap: relação C/N da serapilheira; Userap.: umidade da serapilheira; AP-serap: acúmulo de P na serapilheira; AK-serap: acúmulo de K na serapilheira; Aca-serap: acúmulo de Ca na serapilheira; AMg-serap: acúmulo de Mg na serapilheira; Dp: densidade de partículas; Ds: densidade do solo; PF: polifenóis; COS-solo: C orgânico solúvel no solo; MOL-solo: matéria orgânica leve no solo. CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto.

3.1.2. Diversidade de milípedes sob diferentes coberturas vegetais

Na Tabela 4 estão apresentados resultados do número coletado e diversidade de famílias de milípedes no período seco. Dos 92 espécimes coletados, 44,6 % foi no agroecossistema CACE, 42,4 % no CAMO e 6,5 % em ambos sistemas CAUCE e MATA. Não foram registrados milípedes no sistema EUCAL.

A maior quantidade de Polyxenidae foi amostrado nos sistemas CAMO e CACE, porém essa família foi dominante nesse primeiro sistema com 80% do total amostrado dentro da comunidade de milípedes. Ao lado do CAUCE, o sistema CAMO demonstrou menores valores de diversidade de Shannon (H') e de equitabilidade (J') comparado com CACE e com a referência MATA (Tabela 2).

O segundo grupo mais coletado foram espécimes que compõem a família Spirostreptidae, sendo a maioria nos sistemas CACE e CAMO. Pyrgodesmidae foi encontrada apenas nesses dois sistemas. Spirobolidae foi observada apenas em CACE. Comparado aos demais sistemas, CACE foi o que apresentou maior número de famílias

de milípedes, com um total de 4 famílias (Tabela 4). Além disso, esse sistema apresentou valor de diversidade pouco superior à referência MATA ($H' = 0,46$) e o segundo maior de equidade ($J' = 0,77$).

As espécies *Leptodesmus* sp. (Chelodesmidae) e *Pseudonannolene* sp. (Pseudonannolenidae) foram registradas apenas na MATA. Esse sistema apresentou maior valor de equidade ($J' = 0,92$) e um valor de diversidade de Shannon de 0,44 (Tabela 2).

A Tabela 5 mostra a análise de correlação entre famílias de milípedes e atributos de solo e serapilheira. Dentre outros atributos, Polyxenidae e Spirostreptidae correlacionaram positivamente com teores de argila e água disponível. Ambas as famílias Chelodesmidae e Pseudonannolenidae correlacionaram positivamente com MOL e MS da serapilheira.

Tabela 4. Número coletado de milípedes, diversidade de Shannon (H') e equitabilidade (J') de famílias sob diferentes coberturas vegetais

Sistema	Ordem	Família	Espécie	Nº Coletado	H'	J'
CACE	Polyxenida	Polyxenidae	<i>Polyxenus</i> sp.	20	0,46	0,77
	Spirostreptida	Spirostreptidae	-	15		
	Spirobolida	Spirobolidae	-	5		
	Polydesmida	Pyrgodesmidae	-	1		
CAMO	Polyxenida	Polyxenidae	<i>Polyxenus</i> sp.	31	0,25	0,53
	Spirostreptida	Spirostreptidae	-	7		
	Polydesmida	Pyrgodesmidae	-	1		
CAUCE	Polyxenida	Polyxenidae	<i>Polyxenus</i> sp.	5	0,2	0,65
	Spirostreptida	Spirostreptidae	-	1		
MATA	Spirostreptida	Spirostreptidae	-	1	0,44	0,92
	Spirostreptida	Spirostreptidae	<i>Spirostreptus</i> sp.	2		
	Polydesmida	Chelodesmidae	<i>Leptodesmus</i> sp.	1		
	Spirostreptida	Pseudonannolenidae	<i>Pseudonannolene</i> sp.	2		

CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto.

Tabela 5. Correlação entre famílias de milípedes e atributos de solo e serapilheira.

Variável	<i>Polyx.</i>	<i>Spirost.</i>	<i>Spirob.</i>	<i>Pyrgod.</i>	<i>Chelod.</i>	<i>Pseudon.</i>
MSSer	-0,07	0,26	0,15	0,09	0,81*	0,81*
AP	0,76	0,92**	0,77	0,84*	-0,28	-0,28
AK	0,86*	0,76	0,62	0,90**	-0,75	-0,75
MOL	-0,37	-0,09	-0,15	-0,27	0,95**	0,95**
Arg	0,88**	0,88*	0,72	0,96**	-0,59	-0,59
CC	0,96**	0,78	0,47	0,98**	-0,33	-0,33
AD	0,95**	0,82*	0,58	0,99**	-0,51	-0,51

** , * : significativo a 0.05 e 0.10, respectivamente pelo teste t de Student. MSSer: massa seca de serapilheira; AP: acúmulo de fósforo; AK: acúmulo de potássio; MOL: matéria orgânica leve; Arg: argila; CC: capacidade de campo; AD: água disponível. *Polyx.*: Polixenidae; *Spirost.*: Spirostreptidae; *Spirob.*: Spirobolidae; *Pyrgod.*: Pyrgodesmidae; *Chelod.*: Chelodesmidae; *Pseudon.*: Pseudonannolenidae.

3.2. PERÍODO CHUVOSO (2ª COLETA)

3.2.1. Densidade e relação da macrofauna com atributos de solo e serapilheira

A densidade e riqueza estão apresentadas na Tabela 6. Em comparação ao período seco, a densidade foi reduzida em todos os sistemas no período chuvoso, à exceção do EUCAL que sofreu incremento. Nos sistemas CACE, CAMO e CAUCE a riqueza foi reduzida em relação ao período seco. Reduções mais drásticas de densidade e riqueza do período seco para o chuvoso ocorreram principalmente no sistema CAMO. As riquezas em MATA e EUCAL sofreram ligeiros incrementos.

No período chuvoso, o sistema referência MATA foi o que apresentou a maior densidade e riqueza com 193,6 indivíduos m⁻² e 13 grupos taxonômicos, respectivamente. CAMO foi o sistema com a menor densidade e riqueza com 20,80 indivíduos m⁻² e 4 grupos taxonômicos, respectivamente. Gastropoda foi o grupo de maior densidade em CACE com frequência de 87% do total coletado. Dermaptera foi coletado apenas em CAUCE e Pseudoscorpiones apenas em MATA.

Tabela 6. Densidade e riqueza da macrofauna sob diferentes coberturas vegetais em amostras coletadas no período chuvoso

GRUPOS	CACE	CAMO	CAUCE	MATA	EUCAL
	Densidade (Indivíduos m ⁻²)				
Diplopoda	8,00	3,20	17,60	12,80	0,00
Isopoda	1,60	0,00	36,80	4,80	20,80
Formicidae	9,60	1,60	81,60	112,00	116,80
Araneae	1,60	8,00	6,40	12,80	9,60
Isoptera	0,00	0,00	0,00	19,20	4,80
Symphyla	0,00	0,00	1,60	3,20	0,00
Coleoptera	0,00	0,00	0,00	1,60	0,00
Pseudoscorpiones	0,00	0,00	0,00	22,40	0,00
Hemiptera	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60
Blattodea	0,00	0,00	20,80	6,40	11,20
Larva	1,60	0,00	1,60	4,80	1,60
Oligochaeta	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00
Gastropoda	137,60	9,60	0,00	1,60	0,00
Dermaptera	0,00	0,00	8,00	0,00	0,00
Chilopoda	1,60	1,60	1,60	1,60	0,00
Orthoptera	0,00	0,00	0,00	1,60	0,00
Psocoptera	0,00	0,00	0,00	0,00	25,60
Total	158,40	20,80	176,00	193,60	192,00
Riqueza	8,00	4,00	9,00	13,00	8,00

CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto.

A análise de componentes principais explicou em 80,02 % a variação total do estudo, sendo que o fator 1 explicou em 49,72 % e o fator 2 em 30,36 % (Fig. 3). O autovetor Gastropoda contribuiu pouco para explicar a variabilidade do estudo, porém esteve no quadrante correspondente a CACE. O autovetor celulose contribuiu para explicar a variabilidade e ocorreu no quadrante correspondente ao sistema CAMO e EUCAL. Autovetores Pseudoscorpiones e Larvas também contribuíram para explicar o estudo e ocorreram no quadrante correspondente à MATA.

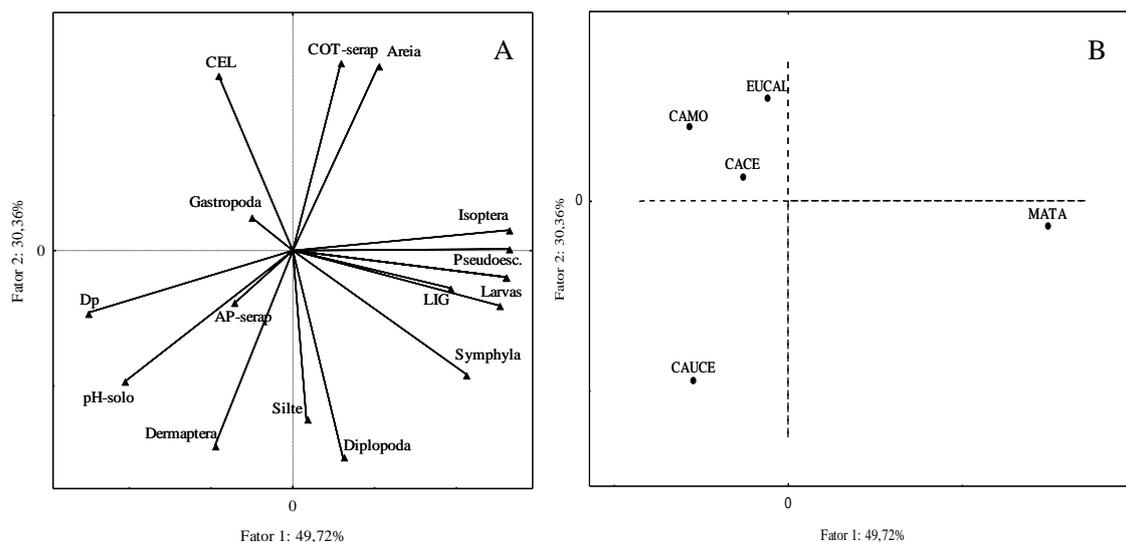


Figura 3. Análise de componentes principais (ACP): projeção dos grupos de macrofauna edáfica e atributos de solo e de serapilheira (A); e projeção dos agroecossistemas e sistema natural (B). COT-serap: C orgânico total da serapilheira; AP-serap: acúmulo de P da serapilheira; CEL: celulose; LIG: lignina; pH-solo: pH do solo; Dp: densidade de partícula; Pseudoesc.: Pseudoscorpiones. CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto.

3.2.2. Diversidade de milípedes sob diferentes coberturas vegetais

Na Tabela 7 é apresentado o número coletado de milípedes, assim como a diversidade de famílias no período chuvoso. Os espécimes da comunidade de milípedes acompanharam a redução geral da comunidade de macroinvertebrados edáficos. O total coletado foi de 14 espécimes distribuídos em 5 famílias, sendo que ocorreu redução de 85% do total coletado do período seco para o chuvoso. Comparado aos demais sistemas, MATA foi o que apresentou maior número coletado e riqueza de famílias com 8 indivíduos distribuídos em 4 famílias. Ressalta-se que esse sistema apresentou o maior índice de diversidade para o período chuvoso, com 0,41. Além disso, foi o único sistema que não sofreu redução de espécimes coletados e riqueza do período seco para o chuvoso. No sistema EUCAL nenhum indivíduo foi registrado.

Ao lado de Spirostreptidae, a família Polyxenidae foi a mais amostrada no período chuvoso principalmente nos sistemas de café (CACE e CAMO). A exemplo do período seco, Spirobolidae foi novamente coletada apenas em CACE no período chuvoso. Da mesma forma, Chelodesmidae e Pseudonannolenidae foram amostradas apenas na MATA.

Polyxenidae correlacionou-se positivamente com a temperatura do solo (Tabela 8). Spirobolidae apresentou correlação positiva com acúmulo de P da serapilheira. Ambas famílias Chelodesmidae e Pseudonannolenidae se correlacionaram negativamente com densidade de partículas do solo e positivamente com a umidade da serapilheira.

Tabela 7. Número coletado de milípedes, diversidade de Shannon (H') e equitabilidade (J') de famílias sob diferentes coberturas vegetais

Sistema	Ordem	Família	Espécie	Nº Coletado	H'	J'
CACE	Polyxenida	Polyxenidae	<i>Polyxenus</i> sp.	2	0,28	0,92
	Spirobolida	Spirobolidae	-	1		
CAMO	Polyxenida	Polyxenidae	<i>Polyxenus</i> sp.	2	0,00	0,00
CAUCE	Spirostreptida	Spirostreptidae	-	1	0,00	0,00
	Polyxenida	Polyxenidae	<i>Polyxenus</i> sp.	1		
	Spirostreptida	Spirostreptidae	-	2		
MATA	Spirostreptida	Spirostreptidae	<i>Spirostreptus</i> sp.	2	0,41	0,69
	Polydesmida	Chelodesmidae	-	2		
	Spirostreptida	Pseudonannolenidae	<i>Pseudonannolene</i> sp.	1		

CACE: cafeeiros consorciados com cedro; CAMO: cafeeiros em monocultivo; CAUCE: cacauzeiros consorciados com cedro; MATA: mata nativa; EUCAL: eucalipto.

Tabela 8. Correlação entre famílias de milípedes e atributos de solo e serapilheira

Variável	<i>Polyx.</i>	<i>Spirost.</i>	<i>Spirob.</i>	<i>Chelod.</i>	<i>Pseudon.</i>
Temp.	0,98**	-0,57	0,50	-0,34	-0,34
AP	0,18	-0,45	0,92*	-0,44	-0,44
USerap.	0,12	0,80	0,10	0,90*	0,90*
Dp	-0,14	-0,82	-0,03	-0,92*	-0,92*

** , * : significativo a 0.05 e 0.10, respectivamente. Temp.: temperatura do solo; AP: acúmulo de fósforo; USerap.: umidade da serapilheira; Dp: densidade de partícula. *Polyx.*: Polixenidae; *Spirost.*: Spirostreptidae; *Spirob.*: Spirobolidae; *Chelod.*: Chelodesmidae; *Pseudon.*: Pseudonannolenidae.

4. DISCUSSÃO

4.1. PERÍODO SECO (1ª COLETA)

4.1.1. Densidade e relação da macrofauna com atributos de solo e serapilheira

Em todos os agroecossistemas ocorreu forte presença de uma única morfoespécie de Isopoda, que apresentava morfologia corporal do tipo “corredora” (ver CORREIA *et*

al., 2008), o que sugere baixa riqueza e diversidade de espécies nesse grupo taxonômico. Isópodes terrestres (subordem Oniscidea), de modo geral, apresentam reprodução concentrada em determinados períodos do ano, e esse processo é influenciado principalmente pela temperatura e fotoperíodo (HORNUNG; WARBURG, 1993; ARAUJO; BOND-BUCKUP, 2005). Portanto, pressupõe-se que a morfoespécie predominante possuía reprodução sazonal e concentrada no período seco (próximo ao período de amostragem). Esse incremento populacional pontual resultou em domínio temporário desse grupo na comunidade de macroinvertebrados, sendo que suas populações sofreram fortes reduções na estação chuvosa (Tabela 6).

A exemplo dos milípedes, os isópodes são funcionalmente classificados como saprófagos (BARDGETT *et al.*, 2005), portanto respondem à qualidade e quantidade da MO aportada ao solo (LOUREIRO *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2008). Comparado aos demais agroecossistemas, o consórcio do cedro australiano com cafeeiros incrementou a MS da serapilheira, tal como melhorou a qualidade desse material, por exemplo, reduzindo teores de polifenóis e celulose e aumentando os teores e acúmulos de P e K (Tabela 1). Essas características possivelmente explicam a maior dominância de Isopoda no sistema CACE e, conseqüentemente, sua maior densidade total. Porém, apesar da dominância desse grupo na estação seca, não contribuiu para explicar a variabilidade do estudo, uma vez que não apareceu relacionado a nenhum atributo de solo e serapilheira na ACP, portanto, nas condições do nosso estudo, não pode ser considerado um bom indicador de QS.

A ACP auxiliou a explicar a baixa densidade e riqueza da macrofauna no EUCAL. A relação positiva desse sistema com compostos antinutricionais (polifenóis) e relação C/N da serapilheira em paralelo ao antagonismo com umidade e nutrientes desse material (e.g., K, P, Ca e N), demonstrou que o *litterfall* do eucalipto foi menos atrativo para a macrofauna comparado aos dos demais sistemas. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que compararam plantações de eucalipto com outros agroecossistemas e sistemas naturais (LARRAÑAGA *et al.*, 2009; MENTONE *et al.*, 2011; CAMARA *et al.*, 2012). Além disso, deve-se levar em consideração que o EUCAL é o sistema mais jovem na propriedade agrícola estudada (Tabela S1), o que auxilia a explicar a baixa riqueza e densidade da comunidade de invertebrados desse sistema.

Por outro lado, essas características recalcitrantes da serapilheira parecem atrair os térmitas (Isoptera), o que explica a presença no EUCAL. Térmitas possuem associação

com protozoários simbiotes que auxiliam na digestão de resíduos ricos em moléculas recalcitrantes, tais como a celulose (CONSTANTINO; ACIOLI, 2008). Além disso, todas as espécies de térmitas conhecidas são eussociais, com formação de colônias, divisão reprodutiva de trabalho, castas morfológicas e sobreposição de gerações (CONSTANTINO; ACIOLI, 2008; JOUQUET *et al.*, 2016). Essas características em conjunto tornam esse grupo mais apto a sobreviver e se reproduzir em ambientes considerados “inóspitos” a outros grupos de invertebrados, como ocorreu com a plantação de eucalipto no período seco.

A alta riqueza equitativa e a presença rara do grupo Pseudoscorpiones na MATA, destacam o caráter conservador do solo desse sistema referência. Pseudoscorpiones são funcionalmente classificados como predadores e conhecidos como bioindicadores de ecossistemas conservados (DUARTE, 2004; SOUZA *et al.*, 2008). Em geral, esse grupo está presente na superfície de solos que possuem capacidade de sustentar teias alimentares complexas (BELL *et al.*, 1999; DENNIS *et al.*, 2001). A relação desse grupo com a MOL do solo na ACP corrobora com as melhores condições de solo da mata nativa em detrimento dos agroecossistemas que apresentaram menores teores de MOL (ver Tabela 2).

4.1.2. Diversidade de milípedes

Os resultados mostraram que a maior proporção de milípedes ocorreu nos sistemas CACE e CAMO (87% do total coletado), devido principalmente à maior presença de famílias Polyxenidae e Spirostreptidae. A semelhança entre os manejos desses sistemas (e.g., adubação, poda) por envolver o cultivo da espécie *C. canephora* (Tabela S1), tornou condições de solo e serapilheira mais uniformes e possivelmente mais propícias a essas famílias de milípedes. Suporta essa hipótese o maior acúmulo de K da serapilheira nesses sistemas de café e a correlação positiva entre essa variável e a família Polyxenidae (Tabela 5).

Outra hipótese para a maior presença de Polyxenidae e Spirostreptidae em CACE e CAMO foi a grande proximidade espacial dessas áreas de café comparados aos demais sistemas de cultivo, o que pode ter otimizado processos de migração de indivíduos de um sistema para o outro (Figura 1). Essa proximidade explica os maiores teores de argila e de água disponível nesses sistemas comparados aos demais (Tabela 2), além de suportar

a correlação positiva entre essas variáveis e as famílias Polyxenidae e Spirostreptidae (Tabela 5).

A baixa diversidade e equidade de milípedes em CAMO é resultado da forte dominância da família Polyxenidae (*Polyxenus* sp.). Populações numerosas e dominantes de *Polyxenus* sp. ocorrem principalmente porque essa espécie é uma oportunista de reprodução partenogenética (ENGHOFF, 1994; GOLOVATCH; KIME, 2009). Ressalta-se que é frequentemente encontrada em ambientes antropizados, abertos e propícios a oscilações bruscas de temperatura (WRIGHT; WESTH, 2006), o que explica a sua forte presença nesse monocultivo de café.

O cedro australiano consorciado com cafeeiros contribuiu para o favorecimento da riqueza, diversidade e equidade da comunidade de milípedes. O aparecimento das famílias Spirostreptidae, Spirobolidae e Pyrgodesmidae em CACE contribuiu para contrabalancear a dominância de Polyxenidae. A inserção de espécies florestais com cultivos agrícolas pode auxiliar a minimizar efeitos adversos das oscilações climáticas, além de diversificar a nutrição e os nichos ecológicos da biota edáfica (CORREIA; ANDRADE, 2008; NUNES *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

O maior valor de equitabilidade na MATA demonstra que a comunidade de milípedes possui espécimes distribuídos mais uniformemente entre as famílias. A presença de duas famílias raras e exclusivas na MATA (Chelodesmidae e Pseudonannolenidae) e suas correlações positivas com a MOL do solo ($r = 0,95$; $p \leq 0,05$) suporta as preferências desses espécimes por solos mais preservados e equilibrados.

4.2. PERÍODO CHUVOSO (2ª COLETA)

4.2.1. Densidade e relação da macrofauna com atributos de solo e serapilheira

Numa comparação entre períodos sazonais, a redução da densidade observada no período chuvoso em relação ao período seco diverge de vários estudos de fauna edáfica realizados em tipos de solos e coberturas vegetais diversas (e.g., LIMA *et al.*, 2010; ROSÁRIO *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Uma explicação foi a redução populacional drástica de Isopoda do período seco para o chuvoso, em virtude da possível reprodução sazonal da morfoespécie que compõe esse grupo (HORNUNG; WARBURG, 1993; ARAUJO; BOND-BUCKUP, 2005). Uma outra hipótese explicativa – e talvez a

mais plausível – pode estar relacionada as elevadas e atípicas precipitações que acometeram na região ao final de 2013 (Figura 2), que refletiu em reduções populacionais drásticas da macrofauna seguidas de recolonização gradual.

Ainda comparando entre períodos sazonais, as reduções mais drásticas de densidade e riqueza em CAMO do período seco para o chuvoso, sugerem diminuições da fonte energética e de hábitat para esses organismos em virtude da decomposição acentuada da serapilheira. No manejo de poda do café conilon, os cafeeiros são podados logo após a colheita o que coincide com a época mais seca (FONSECA *et al.*, 2007), e os resíduos ficam em contato com o solo, sendo que no período chuvoso grande parte já foi decomposto. Suporta essa hipótese a redução de 60% da MS de serapilheira do período seco para o chuvoso (Tabela 1). A relação dos teores de celulose com CAMO em ACP demonstra que compostos mais lábeis da serapilheira possivelmente sofreram degradação ao mesmo tempo que moléculas recalcitrantes de celulose sofreram concentração na biomassa remanescente.

Quanto mais diversa for a cobertura vegetal, mais heterogênea será a serapilheira que apresentará diversidade de fontes energéticas e de hábitats para sustentar comunidades diversificadas de fauna edáfica (CORREIA; ANDRADE, 2008). Isso justifica o fato da MATA apresentar maior riqueza no período chuvoso comparado aos demais sistemas. Além disso, a manutenção e o sensível incremento de grupos taxonômicos do período seco para o chuvoso permitem inferir que, ao contrário dos agroecossistemas, sistemas naturais nativos proporcionam maior estabilidade de recursos ecológicos para a fauna, conforme observou Nunes *et al.* (2012) em sistema nativo Mata dos Cocais.

A presença de Pseudoscorpiones apenas na MATA no período seco e chuvoso associada à relação desse grupo com esse sistema na ACP ratificam esses aracnídeos como bons indicadores de solos conservados. Apesar da forte dominância de Gastropoda em CACE, esse grupo contribuiu pouco para explicar a variabilidade do estudo pela ACP, mostrando que o seu incremento populacional está pouco relacionado a atributos de solo e serapilheira desse sistema.

4.2.2. Diversidade de milípedes sob diferentes coberturas vegetais

Comparado aos agroecossistemas, o sistema referência MATA apresentou manutenção com ligeira melhora de aspectos ecológicos (abundância, riqueza e diversidade) da comunidade de milípedes entre períodos sazonais, o que reforça a estabilidade desse sistema natural e expõe a baixa capacidade de suporte de milípedes nos agroecossistemas estudados. Ressalta-se que quando se perde populações dentro de comunidades não se perde somente indivíduos, mas também a funcionalidade que esses exercem e o potencial de resiliência dos solos (BLACK; OKWAKOL, 1997).

A correlação negativa das famílias Chelodesmidae e Pseudonannolenidae com a Dp e positiva com umidade da serapilheira, reforça a afinidade dessas famílias pelo solo da MATA, uma vez que esse sistema foi o que apresentou menor Dp e maior umidade de serapilheira.

5. CONCLUSÕES

No período seco, o *litterfall* do eucalipto foi menos atrativo para a macrofauna epigeica devido aos altos níveis de polifenóis, relação C/N e outros. A baixa diversidade da comunidade de milípedes em CAMO no período seco, ocorreu devido à forte dominância de *Polyxenus* sp. (Polixenidae), uma vez que essa espécie é oportunista em ambientes abertos e propícios a oscilações bruscas de temperatura.

Numa comparação entre períodos, as reduções mais drásticas de densidade e riqueza do período seco para o chuvoso ocorreram no CAMO, devido a decomposição acentuada dos resíduos orgânicos (ramos dos cafeeiros) podados no período seco anterior. Isso demonstra o impacto dos manejos adotados sobre a dinâmica dos invertebrados edáficos.

Ao contrário dos agroecossistemas, a referência MATA proporcionou manutenção e sensível incremento da riqueza de macrofauna do período seco para o chuvoso, o que permite inferir que solos de florestas nativas são mais estáveis por proporcionar recursos em quantidade e qualidade para esses invertebrados. A presença do predador *Pseudoscorpiones* exclusivamente na MATA em ambos períodos associada a relação desse grupo com esse sistema na ACP, ratificam esse grupo como um bom indicador de solos conservados.

Em todos os sistemas de cultivos ocorreram reduções da diversidade de milípedes no período chuvoso comparado ao seco, o que sugere baixa capacidade de suporte desses agroecossistemas para as comunidades de miriápodes. Por outro lado, o fragmento de mata nativa utilizado como referência demonstrou manutenção da diversidade entre períodos sazonais.

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Tabela S1. Manejos e tratos culturais dos sistemas de cultivo utilizados no estudo

<p>Cafeeiro em monocultivo (CAMO): plantas de <i>Coffea canephora</i> com onze anos de idade; poda de produção e limpeza anual (após a colheita); irrigação por aspersão tipo convencional; adubado com 800 g por planta com formulado 21-02-09 mais 1% de magnésio, 0,2% de zinco, 4% de enxofre, 0,2% de manganês e 0,2% de boro parcelado em quatro vezes ao ano; calagem em área total de dois em dois anos para elevar saturação por bases a 60%; o controle da vegetação espontânea é com o uso de herbicidas uma vez por ano, complementado com roçadas; o manejo fitossanitário é com a aplicação de defensivos uma vez ao ano;</p>
<p>Cafeeiro consorciado com cedro (CACE): Cedro e cafeeiro (<i>Coffea canephora</i>) com onze anos de idade; plantas de cedro receberam 50 g de P₂O₅ por cova no plantio; calagem é realizada em área total a cada dois anos para elevação da saturação por bases a 60%; irrigação por gotejamento; cafeeiros seguem a mesma adubação, manejo da vegetação espontânea, de poda e fitossanitário do CAMO.</p>
<p>Cacaueiro consorciado com cedro (CAUCE): Cacaueiro e cedro com onze anos de idade; cedro com ramos laterais podados para condução em haste única; adubação com 2400 g por planta do formulado 10-10-10 parcelado quatro vezes ao ano; plantas de cedro 50 g de P₂O₅ por cova de plantio; calagem em área total a cada dois anos para elevar a saturação por bases a 60%.</p>
<p>Eucalipto (EUCAL): plantas de <i>Eucalyptus urophylla</i> com sete anos de idade; calagem em área total antes do plantio na dose de 2,5 Mg ha⁻¹; no plantio aplicação de 100 g/cova do formulado 06-30-06 e 5 g de sulfato de Zn por cova; em cobertura aplicação de 20 g/planta de N no terceiro e 12º mês após o plantio; manejo de cortes esporádicos para cercas, lenha e outras finalidades desde os 4 anos de idade.</p>
<p>Mata Atlântica nativa (MATA): Mata secundária utilizada como referência do estudo com 38 anos de idade</p>

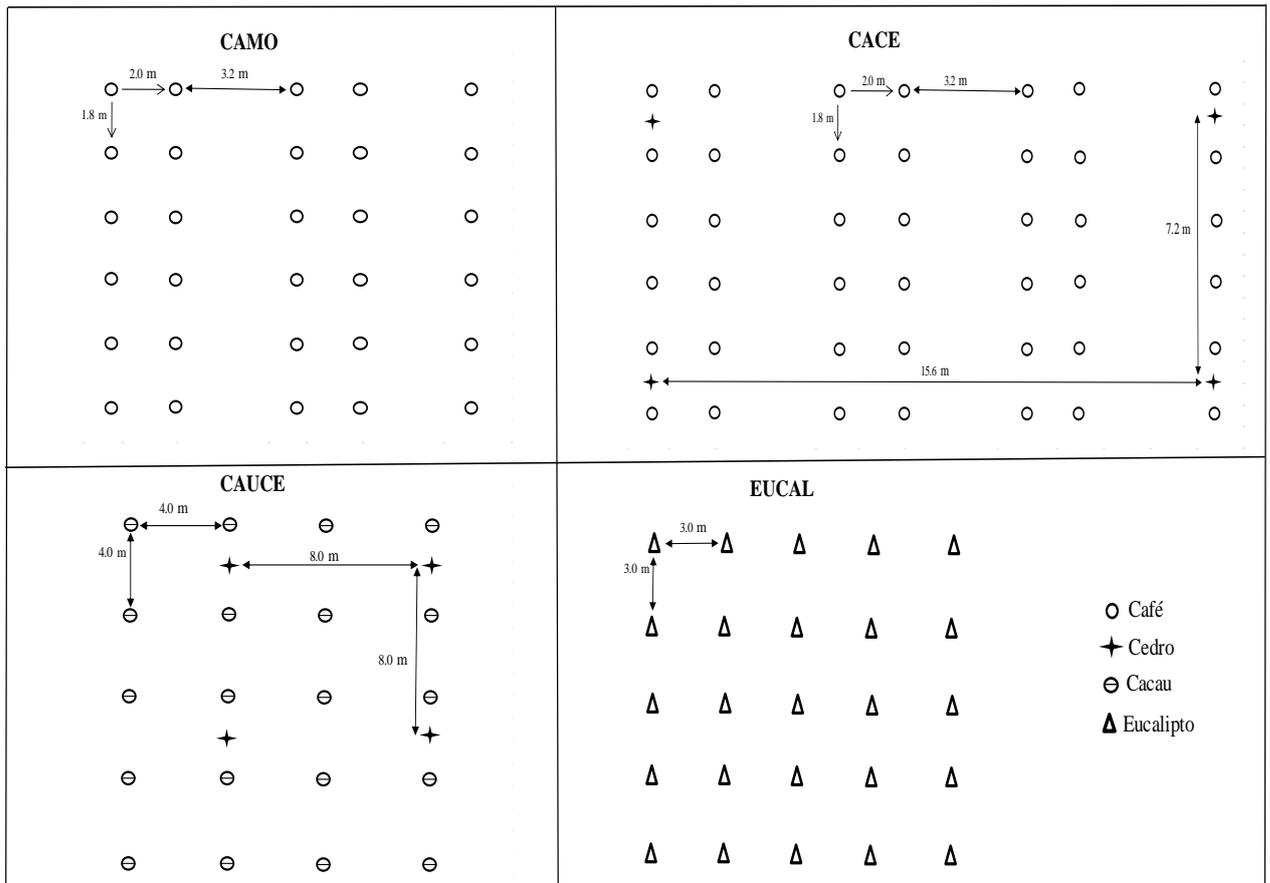


Figura S1. Espaços das espécies utilizadas no estudo: cafeeiro em monocultivo (CAMO), cafeeiro consorciado com cedro (CACE), cacaueiro consorciado com cedro (CAUCE), eucalipto (EUCAL).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Biologia do Solo é reconhecida mundialmente como disciplina científica essencial para a compreensão de diversos processos do solo, assim como as relações existentes entre a biota edáfica (microrganismos e invertebrados) com atributos abióticos do solo e espécies vegetais. Ressalta-se que no Brasil, país que apresenta grande diversidade de clima, solos e organismos edáficos, os estudos de Biologia do Solo ainda são incipientes. Isso decorre por diversos motivos, dentre os quais podemos destacar a escassez de investimentos por parte dos órgãos governamentais, além da problemática em trabalhar com a biota edáfica devido a natureza complexa das respostas envolvidas comparadas, por exemplo, aos estudos de fertilidade e física do solo. Além disso, é muito pequena a quantidade de universidades brasileiras que desenvolvem e/ou estimulam os estudos nesse sentido, ou seja, poucos locais estão sensibilizados sobre a real dimensão da importância dessas pesquisas. Esses aspectos fazem com que haja carência de formação de profissionais habilitados à desenvolverem pesquisas nessa área, além de culminar com baixos níveis de informações técnicas e científicas para direcionar práticas e manejos conservacionistas que possam otimizar o potencial biológico dos solos.

Porém, como foi observado no presente estudo, investigar a biota edáfica em estudos básicos e aplicados é imprescindível dentro da perspectiva ambiental e da produção vegetal. No Capítulo 1 da presente tese foi constatado em estudo de laboratório que após 28 dias de incubação, o aumento das densidades populacionais de *Glyphiulus granulatus* reduziu agregados do solo entre 1,00-2,00 mm ao mesmo tempo que otimizou a formação de agregados 2,00-4,76 mm. Ainda nesse estudo, a atividade da enzima extracelular β -glicosidase do solo foi potencializada nas maiores densidades de *G. granulatus* (6 e 12 milípedes por microcosmo).

No Capítulo 2 foi constatado por meio de estudo de laboratório que independentemente da presença de milípedes *Rhinocricus botocudus* a presença de minhocas *Eisenia andrei* otimizou a decomposição e maturidade de uma mistura de esterco bovino e resíduos de cafeeiro formado por folhas e galhos < 5 mm de diâmetro (1:1, v:v). Além disso, observamos nesse estudo que a espécie *R. botocudus* testada isoladamente não consumiu, e, portanto, não transformou o esterco bovino. Tendo como base o Capítulo 2, deve-se ressaltar que se o objetivo do agricultor for a reutilização dos invertebrados *R. botocudus* e *E. andrei* para a produção de adubos e substratos orgânicos,

não recomendamos utilizar ambas espécies ao mesmo tempo, uma vez que observamos alta mortalidade de milípedes quando da presença de minhocas, sendo que ao final do processo de incubação (120 dias) nenhum milípede sobreviveu nesse tratamento (dados não apresentados). Assim, recomenda-se que se o cafeicultor tiver a sua disposição o esterco bovino, deve-se lançar mão da associação desse esterco com resíduos de cafeeiro e inserir apenas a minhoca *E. andrei* para auxiliar na decomposição e acelerar a maturidade dessa mistura de resíduos.

No Capítulo 3, também realizado em laboratório, foi demonstrado que *R. botocudus* consumiu e transformou os resíduos de cafeeiro de forma muito promissora, otimizando a decomposição e maturidade desse resíduo. Portanto, se o cafeicultor não dispor de esterco na propriedade agrícola, mas apenas os resíduos de cafeeiro, recomendamos utilizar apenas o milípede *R. botocudus* para acelerar a decomposição e maturidade desses resíduos. No entanto, por meio do consumo seletivo de folhas, essa espécie otimizou a concentração dos ramos lignificados de cafeeiros. Portanto, se a utilização do insumo gerado for para a produção de substratos para mudas, recomenda-se a separação desses ramos remanescentes por meio de peneiramento.

O Capítulo 4 demonstrou que em todos os agroecossistemas estudados ocorreram reduções da diversidade de milípedes entre períodos sazonais e o fragmento de mata Atlântica nativa utilizado como referência demonstrou manutenção da diversidade entre períodos. Isso demonstra a alta estabilidade ecológica do solo da mata, e reforça a baixa capacidade de suporte das comunidades edáficas quando da transformação de sistemas nativos em agroecossistemas. Portanto, nesses agroecossistemas (e.g., café, cacau), deve-se inserir gradativamente práticas agroecológicas, por exemplo, substituir gradualmente adubos minerais por fontes orgânicas (esterços estabilizados, adubos verdes, compostos orgânicos), além de promover a substituição de herbicidas por roçadas para o manejo de espontâneas, dentre outras. Ou seja, deve-se manejar o solo para estimular o seu potencial biológico, e, dessa forma, a construção da fertilidade refletirá em retornos econômicos a médio e longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Rebanho Bovino Brasileiro. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Acesso em: 28/12/16.
- AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; GÓNZALEZ-PORTO, P.; DOMÍNGUEZ, J. Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9633–9637, 2011.
- ALIDADI, H.; HOSSEINZADEH, A.; NAJAFPOOR, A.A.; ESMAILI, H.; ZANGANEH, J.; TAKABI, M.D.; PIRANLOO, F.G. Waste recycling by vermicomposting: Maturity and quality assessment via dehydrogenase enzyme activity, lignin, water soluble carbon, nitrogen, phosphorous and other indicators. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 134-140, 2016.
- AMBARISH, C.N.; SRIDHAR, K.R. Production and quality of pill-millipede manure: a microcosm study. **Agricultural Research**, v. 2, p. 258–264, 2013.
- AMIR, S.; JOURAIPHY, A.; MEDDICH, A.; GHAROUS, M.E.; WINTERTON, P.; HAFIDID, M. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 524–529, 2010.
- ANDERSON, J.D.; INGRAM, J.S.I. Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods. 2 ed. Wallingford, CAB International, 1996. 171p.
- ANTIL, R.S.; RAJ, D.; NARWAL, R.P.; SINGH, J.P. Evaluation of maturity and stability parameters of composts prepared from organic wastes and their response to wheat. **Waste Biomass Valor**, v. 4, p. 95-104, 2013.
- ANTUNES, L.F.S.; SCORIZA, R.N.; SILVA, D.G.; CORREIA, M.E.F. Production and efficiency of organic compost generated by millipede activity. **Ciência Rural**, v. 46, p. 815-819, 2016.
- ANTUNES, R.M.; CASTILHOS, R.M.V.; CASTILHOS, D.D.; LEAL, O.A.; DICK, D.P.; ANDREAZZA, R. Transformações químicas dos ácidos húmicos durante o processo de vermicompostagem de resíduos orgânicos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, p. 699-708, 2015.

AQUINO, A.M. **Manual para macrofauna do solo**. Seropédica, RJ: EMBRAPA Agrobiologia, 2001. 21p. (Documentos, 130).

AQUINO, A.M.; SILVA, R.F.; MERCANTE, F.M.; CORREIA, M.E.F.; GUIMARÃES, M.F.; LAVELLE, P. Invertebrate soil macrofauna under different ground cover plants in the no-till system in the Cerrado. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, p. 191-197, 2008.

ARAÚJO, P.B.; BOND-BUCKUP, G. Population structure and reproductive biology of *Atlantoscia floridana* in southern Brazil. **Zootaxa**, v. 1018, p. 55-60, 2005.

ASHWINI, K.M.; SRIDHAR, K.R. Leaf litter preference and conversion by a saprophagous tropical pill millipede, *Arthrosphaera magna* Attems. **Pedobiologia**, v. 49, p. 307-316, 2005.

ASHWINI, K.M.; SRIDHAR, K.R. Breakdown of plantation residues by pill millipedes (*Arthrosphaera magna*) and assessment of compost quality. **Current Science**, v. 90, p. 954-959, 2006.

BADDI, G.A.; HAFIDI, M.; CEGARRA, J.; ALBURQUERQUE, J.A.; GONZALVEZ, J.; GILARD, V.; REVEL, J.C. Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and ¹³C-NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 285–290, 2004.

BARDGETT, R.D., 2005. **The biology of soil: a community and ecosystem approach**. New York: Oxford University Press, 2005. 254p.

BARROS, E.; GRIMALDI, M.; SARRAZIN, M.; CHAUVEL, A.; MITJA, D.; DESJARDINS, T.; LAVELLE, P. Soil physical degradation and changes in macrofaunal communities in Central Amazon. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 157–168, 2004.

BARROS, E.; NEVES, A.; BLANCHART, E.; FERNANDES, E.C.M.; WANDELLI, E.; LAVELLE, P. Development of the soil macrofauna community under silvopastoral and agrosilvicultural systems in Amazonia. **Pedobiologia**, v. 47, p. 273–280, 2003.

BARROS, E.; PASHANASI, B.; CONSTANTINO, R.; LAVELLE, P. Effects of land-use system on the soil macrofauna in western Brazilian Amazonia. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 338–347, 2002.

BARTLETT, R.J.; ROSS, D.N. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, p. 1191-1192, 1988.

- BASTOS, R.S.; MENDONÇA, E.S.; ALVAREZ V., V.H.; CORRÊA, M.M.; COSTA, L.M. Formação e estabilização de agregados do solo influenciados por ciclos de umedecimento e secagem após adição de compostos orgânicos com diferentes características hidrofóbicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 21-31, 2005.
- BELL, J.R.; GATES, S.; HAUGHTON, A.J.; MACDONALD, D.W.; SMITH, H.; WHEATER, C.P.; CULLEN, W.R. Pseudoscorpiones in field margins: effects of margin age, management and boundary habitats. **Journal of Arachnology**, v. 27, p. 236–240, 1999.
- BENÍTEZ, E., SAINZ, H., NOGALES, R. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 785–790, 2005.
- BERNAL, M.P., ALBURQUERQUE, J.A., MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5444–5453, 2009.
- BERNAL, M.P.; PAREDES, C.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A.; CEGARRA, J. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 91-99, 1998.
- BIANCHI, M.O.; CORREIA, M.E. Mensuração do consumo de material vegetal depositado sobre o solo por diplópodes. EMBRAPA Agrobiologia, Rio de Janeiro, 2007.
- BLACK, H.I.J.; OKWAKOL, M.J.N. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of termites. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 37-53, 1997.
- BRAGANÇA, S.M.; MARTINEZ, H.E.P.; LEITE, H.G.; SANTOS, L.P.; LANI, J.A.; SEDIYAMA, C.S.; ALVAREZ V., V.H. Acumulação de matéria seca pelo cafeeiro conilon. **Revista Ceres**, v. 1, p. 48-52, 2010.
- BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. **Total nitrogen**. In: PAGE, A.L. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Madison: American Society of Agronomy, pp. 595-624, 1982.
- BUSWELL J.A.; ODIER E. Lignin biodegradation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 6, p. 1–60, 1995.

CAMARA, R.; CORREIA, M.E.F.; VILLELA, D.M. Effects of eucalyptus plantations on soil arthropod communities in a brazilian atlantic forest conservation unit. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 445-455, 2012.

CÁRCAMO, H.A.; ABE, T.A.; PRESCOTT, C.E.; HOLL, F.B.; CHANWAY, C.P. Influence of millipedes on litter decomposition, N mineralization, and microbial communities in a coastal forest in British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 30, p. 817–826, 2000.

CASTALDI, P.; GARAU, G.; MELIS, P. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. **Waste Management**, v. 28, p. 534-540, 2008.

CHANYASAK, V.; KUBOTA, H. Carbon/organic nitrogen ratio in water extract as measure of composting degradation. *Journal of Fermentation Technology*, v. 59, p. 215–219, 1981.

CHAREST, M.-H.; ANTOUN, H; BEAUCHAMP, C.J. Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of de-inking paper sludge. **Bioresource Technology**, v. 91, 53–67, 2004.

CIAVATTA, C.; GOVI, M.; ANTISARI, L. V.; SEQUI, P. Determination of organic carbon in aqueous extracts of soils and fertilizers. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 22, p. 1467-1476, 1991.

CONSTANTINO, R.; ACIOLI, A.N.S. Diversidade de cupins (Insecta: Isoptera) no Brasil. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Editora UFLA, 2008, p. 277-298.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D.S. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 925-930, 2002.

CORREIA, M.E.F.; ANDRADE, A.G. Formação de serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS G. A. *et al.* **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metropole, 2008, p. 137-158.

CORREIA, M.E.F.; AQUINO, A.M. **Os diplópodes e suas associações com microrganismos na ciclagem de nutrientes**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2005.

CORREIA, M.E.F.; AQUINO, A.M.; AGUIAR-MENEZES, E.L. **Aspectos ecológicos dos Isopoda terrestres**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2008. 23p.

COÛTEAUX, M-M.; ALOUI, A.; KURZ-BESSON, C. *Pinus halepensis* litter decomposition in laboratory microcosms as influenced by temperature and a millipede, *Glomeris marginata*. **Applied Soil Ecology**, v. 20, p. 85–96, 2002.

CROWTHER, T.W., JONES, T.H., BODDY, L., BALDRIAN, P. Invertebrate grazing determines enzyme production by basidiomycete fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 2060-2068, 2011.

DAMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; SALES, E.F.; ARAÚJO, J.B.S. O café em sistemas agroflorestais. In: FERRÃO, R. G. *et al.* (Ed.). *Café conilon*. Vitória: Incaper, 2007. 377-388.

DARONCO, C.; MELO, A.C.G.; MACHADO, J.A.R. Consórcio de espécies nativas da floresta estacional semidecidual com mandioca (*Manihot sculenta* Crantz) para restauração de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 36, p. 291-299, 2012.

DE BERTOLDI, M.; SEQUI, P.; LEMMES, B.; PAPI, T. *The Science of Composting*. Chapman & Hall, London, 1996.

DELMER, D.P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 987-1000, 1995.

DENNIS, P.; YOUNG, M.R.; BENTLEY, C. The effects of varied grazing management on epigeal spiders, harvestmen and pseudoscorpions of *Nardus stricta* grassland in upland Scotland. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 86, p. 39–57, 2011.

DEV, R.; ANTIL, R.S. Evaluation of maturity and stability parameters of composts prepared from agro-industrial wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2868– 2873, 2011.

DIAS, B.O., SILVA, C.A., HIGASHIKAWA, F.S., ROIG, A., SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: Effect on organic matter degradation and humification. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1239-1246, 2010.

DICK, R.P.; BREACKWELL, D.P.; TURCO, R.F., 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators, In: DORAN, J.W., JONES, A.J. (Eds.). **Methods for assessing soil quality**. Madison, Wisconsin, 1996. p. 247-271.

- DOANE, T.A., DEVÊVRE, O.C., HORWATH, W.R. Short-term soil carbon dynamics of humic fractions in low-input and organic cropping systems. **Geoderma**, v. 114, p. 319–331, 2003.
- DOMÍNGUEZ, J.; GÓMEZ-BRANDÓN, M. The influence of earthworms on nutrient dynamics during the process of vermicomposting. **Waste Management & Research**, v. 31, p. 859–868, 2013.
- DOMÍNGUEZ, J.; MARTÍNEZ-CORDEIRO, H.; ÁLVAREZ-CASAS, M.; LORES, M. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. **Waste Management & Research**, v. 32, p. 1235–1240, 2014.
- DON, A.; STEINBERG, B.; SCHÖNING, I.; PRITSCH, K.; JOSCHKO, M.; GLEIXNER, G.; SCHULZE, E. Organic carbon sequestration in earthworm burrows. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1803–1812, 2008.
- DONAGEMMA, G.K.; CAMPOS, D.V.B.; CALDERANO, S.B.; TEIXEIRA, W.G.; VIANA, J.H.M. **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2011.
- DUARTE, M.M. Abundância de microartrópodes do solo em fragmentos de mata com araucária no sul do Brasil. **Iheringia**, v. 94, p. 163-169, 2004.
- DUNGER W.; VOIGTLÄNDER K. Soil fauna (Lumbricidae, Collembola, Diplopoda and Chilopoda) as indicators of soil eco-subsystem development in post-mining sites of eastern Germany – a review. **Soil Organisms**, v. 81, p. 1–51, 2009.
- EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. **Biology and Ecology of Earthworms**. 3ed. London, Chapman and Hall, 1996.
- EDWARDS, C.A. **Earthworm Ecology**. Boca Raton, CRC Press, 2004.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**, 2ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2009. 627p.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solos**, 2ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2011. 230p.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**, 3ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2013.

ENGHOFF, H. Geographical parthenogenesis in millipedes (Diplopoda). **Biogeographica**, v. 70, p. 25–31, 1994.

ERNST, G.; HENSELER, I.; FELTEN, D.; EMMERLING, C. Decomposition and mineralization of energy crop residues governed by earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1548–1554, 2009.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C. Properties of termite mound soils and responses of rice and bean to nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization on such soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 35, p. 2097-2109, 2004.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 23-36, 2006.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.J.; NOGALES, R.; INSAM, H.; ROMERO, E.; GOBERNA, M. Continuous-feeding vermicomposting as a recycling management method to revalue tomato-fruit wastes from greenhouse crops. **Waste Management**, v. 30, p. 2461–2468, 2010.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M.; FILHO, A.C.V.; VOLPI, P.S. Cultivares de café conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A.F.A.; BRAGANÇA, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; DE MUNER, L.H. **Café conilon**. Vitória, ES: INCAPER, 2007. p. 205-225.

FERREIRA, E.V.O.; MARTINS, V.; INDA JUNIOR, A.V.; GIASSON, E.; NASCIMENTO, P.C. Ação dos térmitas no solo. **Ciência Rural**, v. 41, p. 804-811, 2011.

FINK, J.R.; INDA, A.V.; BAVARESCO, J.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; BAYER, C. Phosphorus adsorption and desorption in undisturbed samples from subtropical soils under conventional tillage or no-tillage. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, p. 198–205, 2016a.

FINK, J.R.; INDA, A.V.; BAVARESCO, J.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.R.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; BAYER, C. Diffusion and uptake of phosphorus, and root development of corn seedlings, in three contrasting subtropical soils under conventional tillage or no-tillage. **Biology and Fertility of Soils**, v. 52, p. 203–210, 2016b.

FINK, J.R.; INDA, A.V.; BAVARESCO, J.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; BAYER, C. Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. **Soil & Tillage Research**, v. 155, p. 62–68, 2016c.

FIUZA, D.T.F.; KUSDRA, J.F.; FIUZA, S.S. Crescimento do milho em solo sob atividade de *Chibui bari* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 359-366, 2012.

FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G.; VERDIN FILHO, A.C.; VOLPI, P.S. Qualidade do café conilon: operações de colheita e pós-colheita. In: FERRÃO, R.G., FONSECA, A.F.A., BRAGANÇA, S.M., FERRÃO, M.A.G., DE MUNER, L.H. **Café conilon**. Vitória, ES: INCAPER, 2007. p. 499-529

FUJIMAKI, R.; SATO, Y.; OKAI, N.; KANEKO, N. The train millipede (*Parafontaria laminata*) mediates soil aggregation and N dynamics in a Japanese larch forest. **Geoderma**, v. 159, p. 216–220, 2010.

GARAY, I.; KINDEL, A.; CARNEIRO, R.; FRANCO, A.A.; BARROS, E.; ABBADIE, L. Comparação da matéria orgânica e de outros atributos do solo entre plantações de *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 705-712, 2003.

GERASIMOVWICZ, W.V.; BAYLER, D.F. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids. **Soil Science**, v. 139, p. 270–278, 1985.

GOLOVATCH, S.I.; GEOFFROY, J.J.; MAURIÈS, J.J.; VAN DEN SPIEGEL, D. Review of the millipede genus *Glyphiulus* Gervais, 1847, with descriptions of new species from Southeast Asia (Diplopoda, Spirostreptida, Cambalopsidae). Part 1: the *granulatus*-group. **Zoosystema**, v. 29, p. 7-49, 2007.

GOLOVATCH, S.I.; HOFFMAN, R.L.; ADIS, J.; MORAIS, J.W., 1995. Identification plate for the millipede orders populating the Neotropical region south of Central Mexico (Myriapoda, Diplopoda). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, p. 159-164, 1995.

GOLOVATCH, S.I.; KIME, R.D. Millipede (Diplopoda) distributions: A review. **Soil Organisms**, v. 81, p. 565–597, 2009.

GRIGATTI, M.; CIAVATTA, C.; GESSA, C. Evolution of organic matter from sewage sludge and garden trimming during composting. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 163–169, 2004.

GUERRA, J.G.M.; SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CAMARGO, F.A.O.; 2008. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS,

- L.P.; CAMARGO, F.A.O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais**. Porto Alegre, RS: Metropole, 2008, p. 19-26.
- HASHIMOTO, M.; KANEKO, N.; ITO, M.T.; TOYOTA, A. Exploitation of litter and soil by the train millipede *Parafontaria laminata* (Diplopoda: Xystodesmidae) in larch plantation forests in Japan. **Pedobiologia**, v. 48, p. 71–81, 2004.
- HEDLEY, M.J.; STEWART, J.W.B.; CHAUHAN, B.S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, p. 970-976, 1982.
- HIRAI, M.F.; CHANYASAK, V.; KUBOTA, H. 1983. A standard method for measurement of compost maturity. **Biocycle**, v. 24, p. 54–56, 1983.
- HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- HORNUNG, E.; WARBURG, M.R., 1993. Breeding patterns in the oniscid isopod, *Porcellio ficulneus* Verh., at high temperature and under different photophases. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 23, p. 151–158, 1993.
- HUANG, G.F.; WU, Q.T.; WONG, J.W.C.; NAGAR, B.B., 2006. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1834–1842, 2006.
- HUE, N.V.; LIU, J. Predicting compost stability. **Compost Science & Utilization**, v. 3, p. 8-15, 1995.
- INBAR, Y.; CHEN, Y.; HADAR, Y. Humic substances formed during the composting of organic matter. **Soil Science Society of America Journal**, v. 54, p. 1316-1323, 1990.
- ISLAM K.R.; WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 408-416, 1998.
- JIMÉNEZ, J.J.; CEPEDA, A.; DECAËNS, T.; OBERSON, A.; FRIESEN, D.K. Phosphorus fractions and dynamics in surface earthworm casts under native and improved grasslands in a Colombian savanna Oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 715–727, 2003.
- JOUQUET, P.; BOTTINELLI, N.; SHANBHAG, R.R.; BOURGUIGNON, T.; TRAORÉ, S.; ABBASI, S.A. Termites: the neglected soil engineers of tropical soils. **Soil Science**, v. 181, p. 157-165, 2016.

- KAISER, P.A.; LUSSENHOP, J. Collembolan effects on establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae in soybean (*Glycine max*). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p. 307-308, 1991.
- KALISZ, P.J.; POWELL, J.E. Effect of calcareous road dust on land snails (Gastropoda: Pulmonata) and millipedes (Diplopoda) in acid forest soils of the Daniel Boone National Forest of Kentucky, USA. **Forest Ecology and Management**, v. 186, p. 177–183, 2003.
- KARTHIGEYAN, M.; ALAGESAN, P., 2011. Millipede composting: a novel method for organic waste recycling. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, p. 62-67, 2011.
- KASCHUK, G.; SANTOS, J.C.P.; ALMEIDA, J.A.; SINHORATI, D.C.; BERTON-JUNIOR, J.F. Termite activity in relation to natural grassland soil attributes. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 583-588, 2006.
- KEMPER, W.D.; CHEPIL, W.S. Size distribution of aggregates. In: BLACK, C.A. **Methodos of Soil Analysis - Part 1**. Madison, Wisconsin, 1965. p. 495-509.
- KÖHLER, H.-R.; ALBERTI, G., 1990. Morphology of the mandibles in the millipedes (Diplopoda, Arthropoda). **Zoologica Scripta**, v. 19, p. 195-202, 1990.
- KOMILIS, D.P.; HAM, R.K. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes. **Waste Management**, v. 23, p. 419-423, 2003.
- KONZEN, E.A.; ALVARENGA, R.C. Adubação orgânica. Brasília, EMBRAPA. Disponível em : http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_48_168200511159.html. Acesso em: 29/12/16.
- KRISTIANSEN, S.M.; AMELUNG, W.; ZECH, W. Phosphorus forms as affected by abandoned anthills (*Formica polyctena* Förster) in forest soils: sequential extraction and liquid-state ³¹P-NMP spectroscopy. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, p. 49-55, 2001.
- LANI, J.L.; RESENDE, M.; REZENDE, S.B.; FEITOSA, L.R. **Atlas do Ecosystemas do Espírito Santo**. Viçosa, MG: UFV, 2008.
- LAOSSI, K.; BAROT, S.; CARVALHO, D.; DESJARDINS, T.; LAVELLE, P.; MARTINS, M.; MITJA, D.; RENDEIRO, A.C.; ROUSSEAU, G.; SARRAZIN, M.; VELASQUEZ, E.; GRIMALDI, M. Effects of plant diversity on plant biomass

production and soil macrofauna in Amazonian pastures. **Pedobiologia**, v. 51, p. 397-407, 2008.

LARRAÑAGA, A.; BASAGUREN, A.; ELOSEGI, A.; POZO, J. Impacts of *Eucalyptus globulus* plantations on Atlantic streams: changes in invertebrate density and shredder traits. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 175/2, p. 151–160, 2009.

LAVELLE, P. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research*, v. 21, p. 93–132, 1997.

LAVELLE, P.; SPAIN, A.V., 2001. **Soil ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

LAZCANO, C.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; DOMÍNGUEZ, J. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. **Chemosphere**, v. 72, p. 1013–1019, 2008.

LE BAYON, R.C.; BINET, F. Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 235–246, 2006.

LIMA, S.S.; AQUINO, A.M.; LEITE, L.F.C.; VELÁSQUEZ, E.; LAVELLE, P. Relação entre macrofauna edáfica e atributos químicos do solo em diferentes agroecossistemas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 322-331, 2010.

LOPEZ, M.J.; ELORRIETA, M.A.; VARGAS-GARCIA, M.C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 123–129, 2002.

LOPEZ-HERNANDEZ, D.; LAVELLE, P.; FARDEAU, J.C.; NIÑO, M. Phosphorus transformations in two P-sorption contrasting tropical soils during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae: Oligochaeta). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 789-792, 1993.

LOUREIRO, S.; SAMPAIO, A.; BRANDÃO, A.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A. Feeding behaviour of the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* Brandt, 1833 (Crustacea, Isopoda) in response to changes in food quality and contamination. **Science of Total Environment**, v. 369, p. 119-128, 2006.

MAHBOUB KHOMAMI, A.; MAMMADOV, G.M.; FATEMI CHOKAMI, A.; SEDAGHATHOOR, S. Growth and reproductive performance of *eisenia foetida* in cow manure, cow manure + sugarcane bagasse, and cow manure + sawdust waste. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 14, p. 237-247, 2016.

- MAKOTO, K.; ARAI, M.; KANEKO, N. Change the menu? Species-dependent feeding responses of millipedes to climate warming and the consequences for plant-soil nitrogen dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 72, p. 19-25, 2014.
- MANNA, M.C.; JHA, S.; GHOSH, P.K.; ACHARYA, C.L. Comparative efficacy of three epigeic earthworms under different deciduous forest litters decomposition. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 197–206, 2003.
- MANNA, M.C.; SINGH, M.; KUNDU, S.; TRIPATHI, A.K.; TAKKAR, P.N. Growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Perionyx excavatus* as influenced by food materials. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 129-132, 1997.
- MENTONE, T.O., DINIZ, E.A., MUNHAE, C.B., BUENO, O.C., MORINI, M.S.C. Composição da fauna de formigas (Hymenoptera: Formicidae) de serapilheira em florestas semidecídua e de *Eucalyptus* spp., na região sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 237-246, 2011.
- MERLIM, A.O.; GUERRA, J.G.M.; JUNQUEIRA, R.M.; AQUINO, A.M. Soil macrofauna in cover crops of figs grown under organic management. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 57-61, 2005.
- MINELLI, A.; GOLOVATCH, M.S. Myriapods. In: LEVIN, S.A. **Encyclopedia of Biodiversity**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 291-303.
- MORA, P.; MIAMBIA, E.; JIMÉNEZ, J.J.; DECAËNS, T.; ROULANDA, C. Functional complement of biogenic structures produced by earthworms, termites and ants in the neotropical savanas. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1043–1048, 2005.
- MUPONDI, L.T.; MNKENI, P.N.S.; MUCHAONYERWA, P. Effects of a precomposting step on the vermicomposting of dairy manure–waste paper mixtures. **Waste Management & Research**, v. 29, p. 219–228, 2011.
- MUSSURY, R.M.; SCALON, S.P.Q.; SILVA, S.V.; SOLIGO, V.R. Study of Acari and Collembola populations in four cultivation systems in Dourados-MS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 257-264, 2002.
- NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, p. 267-275, 2002.
- NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 1527–1536, 2002.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N., 2007. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2007. p. 472-550.

NUNES, L.A.P.L.; SILVA, D.I.B.; ARAÚJO, A.S.F.; LEITE, L.F.C.; CORREIA, M.E.F. Caracterização da fauna edáfica em sistemas de manejo para produção de forragens no Estado do Piauí. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 30-37, 2012.

OBERSON, A.; JONER, E.J. Microbial turnover of phosphorus in soil. In: TURNER, B.L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D.S. **Organic phosphorus in the environmental**. Wallingford: CAB International, 2005. p. 133-164.

OUATMANE, A.; PROVENZANO, M.R.; HAFIDI, M.; SENESI, N. Compost maturity using calorimetry, spectroscopy and chemical analysis. **Compost Science and Utilization**, v. 8, p. 124-134, 2000.

PARADELO, R.; MOLDES, A.B.; BARRAL, M.T. Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 116, p. 18-26, 2013.

PARTHASARATHI, K.; BALAMURUGAN, M.; PRASHIJA, K.V.; JAYANTHI, L.; BASHA, S.A. Potential of *Perionyx excavatus* (Perrier) in lignocellulosic solid waste management and quality vermifertilizer production for soil health. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, p. 65–86, 2016.

PIELOU, E. C. **Ecological diversity**. New York: John Wiley & Sons, 1975.165p.

PLAZA, C.; NOGALES, R.; SENESI, N.; BENITEZ, E.; POLO, A. Organic matter humification by vermicomposting of cattle manure alone and mixed with two-phase olive pomace. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5085–5089, 2008.

RAMANATHAN, B.; ALAGESAN, P. Evaluation of millicompost versus vermicompost. **Current Science**, v. 103, p. 140-143, 2012.

RAWLINS, A.J.; BULL, I.D.; INESON, P.; EVERSLED, R.P. Stabilisation of soil organic matter in invertebrate faecal pellets through leaf litter grazing. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1202–1205, 2007.

RAWLINS, A.J.; BULL, I.D.; POIRIER, N.; INESON, P.; EVERSLED, R.P. The biochemical transformation of oak (*Quercus robur*) leaf litter consumed by the pill

millipede (*Glomeris marginata*). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1063–1076, 2006.

RIZZINI, C.M.; ADUAN, R.E.; JESUS, R.M.; GARAY, I. Contribuição ao conhecimento da Floresta Pluvial de Tabuleiros, Linhares, ES, Brasil. **Leandra**, v. 12, p. 54-76, 1997.

ROSÁRIO, V.S.V.; BATISTA, T.F.V.; PROVENZANO, R.; LEMOS, L.J.U.; SANTOS, J.D.V.D.; LUNZ, A.M. Edaphic insect fauna associated with reforestation with *Schizolobium parahyba* Barneby in Amazonia. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 57, p. 373-381, 2014.

RÜCKAMP, D.; AMELUNG, W.; THEISZ, N.; BANDEIRA, A.G.; MARTIUS, C. Phosphorus forms in Brazilian termite nests and soils: relevance of feeding guild and ecosystems. **Geoderma**, v. 155, p. 269–279, 2010.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 7ed. São Paulo: Roca, 2005. 1168p.

SALES, E.F.; MÉNDEZ, V.E.; CAPORAL, F.R.; FARIA, J.C. Agroecological Transition of Conilon Coffee (*Coffea canephora*) Agroforestry Systems in the State of Espírito Santo, Brazil. **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 37, p. 405–429, 2013.

SALGADO, P.R.; FAVARIN, J.L.; LEANDRO, R.A.; FILHO, O.F.L. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 354-359, 2008.

SCHEU, S.; WOLTERS, V. Influence of fragmentation and bioturbation on the decomposition of ¹⁴C-labelled beech leaf litter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p. 1029–1034, 1991.

SCHUBART, O. Novas espécies brasileiras da Família Rhinocricidae (Diplopoda, Opisthospermophora). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 34, p. 69–87, 1962.

SEMENYUK, I.I.; TIUNOV, A.V.; GOLOVATCH, S.I. Structure of mandibles in relation to trophic niche differentiation in a tropical millipede community. **International Journal of Myriapodology**, v. 6, p. 37-49, 2011.

- SENESI, N.; MIANO, T.; PROVENZANO, M.; BRUNETTI, G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of IHSS reference and standard fulvic and humic acids of various origin. **Science of the Total Environment**, v. 81, p. 143–156, 1989.
- SIDDIQUE, J.; KHAN, A.A.; HUSSAIN, I.; AKHTER, S. Growth and reproduction of earthworm (*Eisenia fetida*) in different organic media. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 37, p. 211-214, 2005.
- SIERWALD, P.; BOND, J.E. Current status of the Myriapod Class Diplopoda (millipedes): taxonomic diversity and phylogeny. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 401-420, 2007.
- SILVA, R.F.; AQUINO, A.M.; MERCANTE, F.M.; GUIMARÃES, M.F. Macrofauna invertebrada do solo sob diferentes sistemas de produção em Latossolo da Região do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 697-704, 2006.
- SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. 1.ed. Viçosa-MG: SBCS, 2007. p. 275-374.
- SILVA, V.M.; TEIXEIRA, A.F.R.; REIS, E.F.; MENDONÇA, E.S. Yield and nutritional status of the conilon coffee tree in organic fertilizer systems. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 773-781, 2013.
- SIX, J.; BOSSUYT, H.; DEGRYZE, S.; DENEFF, K. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. **Soil & Tillage Research**, v. 79, p. 7–31, 2004.
- SMIDT, E.; MEISSL, K. The applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management. **Waste Management**, v. 27, p. 268–276, 2007.
- SOIL SURVEY STAFF. **Keys to Soil Taxonomy**. 11ed. Washington: USDANRCS, 2010.
- SOUZA, R.C.; CORREIA, M.E.F.; PEREIRA, M.G.; SILVA, E.M.R.; PAULA, R.R.; MENEZES, L.F.T. Estrutura da comunidade da fauna edáfica em fragmentos florestais na Restinga da Marambaia, RJ. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, p. 49-57, 2008.

SRIDHAR, K.R.; AMBARISH, C.N. Pill millipede compost: a viable alternative to utilize urban organic solid waste. **Current Science**, v. 104, p. 1543-1547, 2013.

STATSOFT, INC. **Statistica** (data analysis software system), version 7, 2004.

STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: Genesis, Composition Reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1994.

STEWART, J.W.B.; TIESSEN, H. Dynamics of soil organic phosphorus. **Biogeochemistry**, v. 4, p. 41-60, 1987.

SUBHEDAR, P.B., GOGATE, P.R. Alkaline and ultrasound assisted alkaline pretreatment for intensification of delignification process from sustainable raw-material. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 216–225, 2014.

SVYRYDCHENKO, A.O.; BRYGADYRENKO, V.V. Trophic preferences of *Rossiulus kessleri* (Diplopoda, Julidae) for the litter of various tree species. **Folia Oecologica**, v. 41, p. 202-212, 2014.

SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Berkeley: University of California Press, 1979. 372p.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAJOVSKÝ, K.; ŠANTRŮČKOVÁ, H.; HÁNĚL, L.; BALÍK, V.; LUKEŠOVÁ, A. Decomposition of faecal pellets of the millipede *Glomeris hexasticha* (Diplopoda) in forest soil. **Pedobiologia**, v. 36, p. 146–158, 1992.

TAYLOR, E.C.; CRAWFORD, C.S. Microbial gut symbionts and desert detritivores. **Arid Zone Research**, v. 1, p. 37–52, 1982.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ed. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TEIXEIRA, A.F.R.; SILVA, V.M.; MENDONÇA, E.S. Fauna edáfica em sistemas arborizados de café conilon em solo de tabuleiros costeiros. **Coffee Science**, v. 9, p. 385-393, 2014.

TIAN, G.; BRUSSAARD, L.; KANG, B.T., 1995. Breakdown of plant residues with contrasting chemical compositions under humid tropical conditions: effects of earthworms and millipedes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 277-280, 1995.

TIESSSEN, H.; MOIR, J.O. Characterization of available P by sequential extraction In: CARTER, M.R. (Ed.). **Soil Sampling and Methods of Analysis**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. p. 75-86.

TORTOSA, G.; ALBURQUERQUE, J.A.; AIT-BADDI, G.; CEGARRA, J. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste (“alperujo”). **Journal of Cleaner Production**, v. 26, p. 48-55, 2012.

URBASEK, F.; TAJOVSKÝ, K. The influence of food and temperature on enzymatic activities of the millipede *Glomeris hexasticha* (Diplopoda). **Revue d'écologie et de biologie du sol**, v. 28, p. 155–163, 1991.

VAN SOEST, P.; WINE, R.H. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forages. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 51, p. 780-785, 1968.

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the Deytjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v. 37, p. 29-38, 1934.

WANG, C.; TU, Q.; DONG, D.; STRONG, P.J.; WANG, H.; SUN, B.; WU, W. Spectroscopic evidence for biochar amendment promoting humic acid synthesis and intensifying humification during composting. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 409–416, 2014.

WRIGHT, J.C.; WESTH, P. Water vapour absorption in the penicillate millipede *Polyxenus lagurus* (Diplopoda: Penicillata: Polyxenida): microcalorimetric analysis of uptake kinetics. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2486-2494, 2006.

WU, L.; MA, L.; MARTINEZ, G. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, p. 424–429, 2000.

WU, Q.; LI, Y.; ZOU, Y.; HE, X. Arbuscular mycorrhiza mediates glomalin-related soil protein production and soil enzyme activities in the rhizosphere of trifoliolate orange grown under different P levels. **Mycorrhiza**, v. 25, p. 121–130, 2015.

YAMADA, Y.; KAWASE, Y. Aerobic composting of waste activated sludge: Kinetic analysis for microbiological reaction and oxygen consumption. **Waste Management**, v. 26, p. 49–61, 2006.

YAN, Z.; SONG, Z.; LI, D.; YUAN, Y.; LIU, X.; ZHENG, T. The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 266–273, 2015.

YEOMANS, J.C.; BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, p. 1467-1476, 1988.

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

ZHOU, Y.; SELVAM, A.; JONATHAN, W.C.; WONG, J.W.C. Evaluation of humic substances during co-composting of food waste, sawdust and Chinese medicinal herbal residues. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 229–234, 2014.

ZMORA-NAHUM, S.; MARKOVITCH, O.; TARCHITZKY, J.; CHENA, Y. Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 2109–2116, 2005.

ZOCCAL, R. Alguns números do leite. **Revista Balde Branco**. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/alguns-numeros-do-leite/>. Acesso em 29/12/16.