

Coleta de oligoquetas no campo e seu preparo para ensaios ecotoxicológicos

George Gardner Brown
Katy Boniza Cantelli
Jörg Römbke
Cintia Carla Niva

5.1 Coleta e preparo de minhocas

A coleta de minhocas deve ser realizada em locais não contaminados por agrotóxicos ou metais pesados. O método mais comum de coleta, para fins ecotoxicológicos, é o de extração manual, onde amostras de solo, contendo minhocas, são retiradas com auxílio de uma enxada ou pá reta, e separadas manualmente. Registros ou procedimentos necessários:

1. Coordenadas Geográficas (GPS) do local de coleta (é importante mencionar o Datum utilizado e o tipo de coordenadas, e.g., UTM).
2. Data de coleta.
3. Identificação da localidade e município de coleta.
4. Descrição da vegetação vigente por ocasião da coleta (por ex.: mata nativa; plantio florestal, horta orgânica).
4. Coleta de uma amostra composta de solo (uma amostra tomada a partir de pelo menos cinco pontos ao redor do local de coleta) e analisar pelo menos: umidade do solo no momento da coleta, pH (conforme instruções detalhadas na seção 7.5), matéria orgânica e granulometria (segundo Teixeira et al., 2017 ou ISO/TS 17892-4, 2004) e, preferivelmente, uma análise química de rotina segundo manual da Embrapa (Teixeira et al., 2017).
6. Coleta de solo para manutenção das minhocas no laboratório por até uma semana (peso dependente do número de minhocas coletadas; ver abaixo).

Idealmente, também se devem anotar dados como:

1. Profundidade da coleta.
2. Tipo de solo na classificação brasileira.
3. Histórico do manejo do local.

Devido à variabilidade genética de espécies partenogenéticas, como *P. corethrurus* (Dupont et al., 2012; Cunha et al., 2014; Taheri et al., 2018) e algumas espécies de *Amyntas* e *Metaphire* (Huang et al., 2007; Chang et al., 2009), é importante que todas as minhocas a serem utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos sejam provenientes do mesmo local de coleta (Lowe; Butt, 2007), e que esse local não seja muito amplo (de preferência <0,5 ha). Isso

irá melhorar a probabilidade de ter apenas um ou poucos clones/linhagens da mesma espécie dentro da população coletada para os ensaios, reduzindo a variabilidade genética intra-específica e possíveis variações nas respostas dos indivíduos usados nos testes.

As espécies endogêicas e epi-endogêicas dos gêneros *Amyntas* e *Metaphire* geralmente se encontram mais próximas à superfície do solo, e são frequentemente associadas à serapilheira de florestas secundárias e capoeiras, plantios florestais e solos de áreas urbanas, jardins, pomares e em agricultura orgânica (Brown et al., 2006). Preferem solos com maior teor de matéria orgânica e podem ser facilmente coletadas cavando-se o solo superficial até aproximadamente 10 cm e triando-se manualmente o solo. Como são espécies de movimento rápido, recomenda-se atenção ao cavar e triar o solo, para não escaparem. A espécie *P. corethrurus* também é frequente em florestas secundárias e plantios florestais, além de pastagens e solos de zonas urbanas (Brown et al., 2006). Também habita preferencialmente a camada superficial do solo, e frequentemente é encontrada junto com as espécies de *Amyntas* e *Metaphire*, mas também pode viver em solos mais pobres. Contudo, em solos com menor teor de matéria orgânica, a abundância e o tamanho médio dos indivíduos adultos tende a ser menor (Nurhidayati et al., 2012).

Após a coleta, deve ser feita a triagem das minhocas, separando os exemplares adultos a serem utilizados e descartando as minhocas com lesões aparentes ou com comportamento alterado (por ex.: apáticas, letárgicas, em diapausa) (Fründ et al., 2010).

As minhocas podem ser mantidas em laboratório, por até uma semana, sem adição de alimento, no mesmo solo do local de coleta. Se a espécie em questão for *A. gracilis*, recomenda-se colocar no máximo 10 indivíduos adultos kg⁻¹ solo úmido trazido do campo. Com *P. corethrurus*, recomenda-se no máximo 20 indivíduos kg⁻¹ solo. Portanto, em um pote de plástico de 2 L de capacidade, podem ser colocados aproximadamente 20 *P. corethrurus* ou 10 *A. gracilis*, com 1 kg solo. Caso se necessite manter as minhocas por maior período de tempo no laboratório, ou criá-las, deve-se seguir os procedimentos descritos nas seções 4.4 e 4.5. De fato, essa prática é preferida, pois a idade dos indivíduos adultos coletados no campo é difícil de determinar, e ao realizar a criação no laboratório poderão ser usados indivíduos de aproximadamente a mesma idade, eliminando um importante fator de variabilidade (Lowe & Butt, 2007).

Antes de realizar o ensaio com as minhocas, deve-se verificar a adaptação das mesmas ao substrato teste (solo natural ou SAT), seguindo-se as recomendações detalhadas no capítulo 6. Caso a adaptação seja confirmada, então as minhocas a serem utilizadas nos ensaios devem ser adicionadas aos recipientes com substrato teste por 48 horas antes do início do ensaio preliminar e definitivo, para aclimação. Após esse período, elas devem ser retiradas desses recipientes, e adicionadas aos recipientes com o substrato teste do ensaio.

No mínimo cinco mas, preferivelmente, 10 exemplares adultos das espécies a serem utilizadas devem ser preservados em formol 10% e depositados em

uma coleção formal (fiel depositária do patrimônio genético nacional; por ex.: Museu de Zoologia da USP, Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção de Oligoquetas Fritz Müller na Embrapa Florestas) para conservação permanente e para confirmação taxonômica posterior por um especialista. Adicionalmente cinco a 10 exemplares adultos devem também ser preservados em álcool absoluto, e mantidas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para análise posterior de DNA (por ex., código de barras), para avaliação genética da espécie utilizada. Alternativamente, um pedaço pequeno ($0,5\text{ cm}^2$) de tecido muscular epitelial pode ser cortado de cada um dos indivíduos a serem conservados em formol, e guardado em pequenos criotubos com álcool absoluto e mantidos em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Caso se adote essa alternativa, é importante etiquetar adequadamente cada uma das amostras nos criotubos para que tenham o seu “voucher” correspondente em formol.

5.2 Coleta e preparo de enquitreídeos

Enquitreídeos de tamanho maior (mais de 1 cm de comprimento), como é o caso de *Fridericia* sp., que ocorre em pastagens e locais antropizados, podem ser coletados a campo e extraídos do solo, manualmente, com certa facilidade, como é feito com minhocas. Porém, a maioria das espécies encontradas até hoje, no Brasil, são menores e de difícil visualização a olho nu.

A norma ISO 23611-3 (ISO, 2007) e Niva et al. (2010) (este último com recomendações para o clima subtropical/tropical), descrevem metodologia específica de coleta e extração de enquitreídeos que pode ser utilizada para estudos de diversidade e de ecologia. Os métodos de extração podem ser com e sem aquecimento. Um estudo na Floresta Ombrófila Mista comparou os métodos de extração e concluiu que o método quente apresentou mais vantagens (Niva et al., 2015).

Os enquitreídeos são encontrados, em geral, na camada mais superficial do solo (5 cm de profundidade), mas podem migrar para camadas mais profundas, quando o solo está mais seco. Quando não se tem o objetivo de quantificar os enquitreídeos, eles podem ser obtidos a partir de pequenas porções de solo, recolhidas com uma pequena pá de jardinagem (um volume equivalente a uma xícara de chá é suficiente). Essas amostras são levadas à extração fria, acomodando-se o solo em peneiras imersas em uma bacia com água, sem que toquem o fundo (Figura 5.1). Os enquitreídeos (e outros organismos) migram para a água e se depositam no fundo da bacia. A extração também pode ser feita com uma fonte de calor, adaptando-se uma lâmpada incandescente sobre a amostra de solo. O gradiente de calor produzido sobre a amostra induz os enquitreídeos (e outros animais) a migrarem da superfície para o fundo do recipiente. Porém, para o método quente, recomenda-se construir um extrator (Figura 5.1) para que várias amostras de solo possam ser manuseadas ao mesmo tempo. A extração a quente pode ser realizada em 3-4 horas se a temperatura da superfície da amostra se mantiver a $40\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto a condição fria demora vários dias.



Figura 5.1. Métodos de extração de enquitreídeos. (A) Trado coletor de solo, desmontável, do tipo *split corer*, com tubo de PVC (à esquerda), que se acopla internamente. (B) Método de extração fria, onde a amostra de solo, depositada em uma peneira, fica submersa em uma bacia com água, por vários dias. (C) Método de extração a quente, onde uma lâmpada incandescente aquece a superfície da amostra de solo, em uma peneira encaixada em um funil com água. Acoplada ao funil, na porção inferior, uma mangueira transparente e uma válvula, permitem a coleta de enquitreídeos que se depositam na extremidade inferior, após algumas horas. (D) Vista superior das amostras de solo no extrator quente.

Os enquitreídeos obtidos na extração devem ser triados e encaminhados para identificação in vivo imediatamente ou preservados (ver abaixo), ou podem ser mantidos em laboratório, como descrito na seção 4.6.4, para verificar o método de criação adequado, e encaminhados para identificação posteriormente.

Quando se deseja fazer um estudo a campo, por exemplo, comparando-se áreas contaminadas, a abundância e diversidade de enquitreídeos podem ser tomadas como parâmetro e, nesse caso, amostras de solo devem ser coletadas com trado adequado (Figura 5.1; ver Niva et al., 2010) ou anel volumétrico de 5 cm a 6 cm de diâmetro (Niva et al., 2015). A utilização de enquitreídeos coletados no campo em ensaios também é possível quando o parâmetro a ser avaliado é apenas a letalidade, mas a adequabilidade da espécie ao substrato a ser utilizado deve ser previamente determinada, pois estes devem estar aclimatados ao substrato. Espécies do gênero *Fridericia*, coletadas no campo e aclimatadas em laboratório, foram utilizadas para avaliação de ecotoxicidade aguda na China (An; Yang, 2009).

Qualquer que seja o caso, a identificação da espécie é fundamental para que possa ser utilizada nos ensaios. Exemplos adultos (com clitelo), preferencialmente, ou no caso de espécies fragmentadoras que não tem clitelo mas são

longos (> 7 cm comprimento quando ainda intactos), devem ser preferencialmente fixados em solução Bouin e preservados em etanol 70%, para envio a especialistas. A fixação diretamente em etanol 70% também é possível, mas não preserva as características morfológicas tão bem quanto a solução Bouin. Mas, o ideal é que exemplares vivos também sejam examinados (ISO, 2007; Schmelz; Collado, 2010). O livro de Schmelz e Collado (2010) descreve em detalhes o método de fixação e identificação dos enquitreídeos. Como no caso das minhocas, é importante que alguns exemplares sejam depositados em uma coleção formal (ver seção 5.2). Adicionalmente, exemplares devem ser preservados em álcool absoluto, para análise posterior de DNA (por ex., código de barras) e confirmação da espécie, a nível molecular.

Referências

- AN, Y.; YANG, C. *Fridericia peregrinabunda* (Enchytraeidae) as a new test species for soil toxicity assessment. **Chemosphere**, v. 77, p. 325-329, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.013.
- BROWN, G. G.; JAMES, S. W.; PASINI, A.; NUNES, D. H.; BENTO, N. P.; MARTINS, P. T.; SAUTTER, K. D. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, v. 42 n. 3, p. 339-358, 2006.
- CHANG, C.-H.; ROUGERIE, R.; CHEN, J.-H. Identifying earthworms through DNA barcodes: pitfalls and promise. **Pedobiologia**, v. 52, p. 171-180, 2009. DOI: 10.1016/j.pedobi.2008.08.002.
- CUNHA L.; MONTIEL R.; NOVO M.; OROZCO-TERWENGEL P.; RODRIGUES A.; MORGAN A. J.; KILLE, P. Living on a volcano's edge: genetic isolation of an extremophile terrestrial metazoan. **Heredity**, v. 112, p. 132-142, 2014. DOI: 10.1038/hdy.2013.84.
- DUPONT, L.; DECAËNS, T.; LAPIED, E.; CHASSANYA, V.; MARICHAL, R.; DUBS, F.; MAILLOT, M.; ROY, V. Genetic signature of accidental transfer of the peregrine earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Clitellata, Glossoscolecidae) in French Guiana. **European Journal of Soil Biology**, v. 53, p. 70-75, 2012. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2012.09.001.
- FRÜND, H.-C.; BUTT, K.; CAPOWIEZ, Y.; EISENHAEUER, N.; EMMERLING, C.; ERNST, G.; POTTHOFF, M.; SCHÄDLER, M.; SCHRADER, S. Using earthworms as model organisms in the laboratory: recommendations for experimental implementations. **Pedobiologia**, v. 53, p. 119-125, 2010. DOI: 10.1016/j.pedobi.2009.07.002.
- HUANG, J.; XU, Q.; SUN, Z. J.; TANG, G. L.; SU, Z. Y. Identifying earthworms through DNA barcodes. **Pedobiologia**, v. 51, p. 30-309, 2007. DOI: 10.1016/j.pedobi.2007.05.003.
- ISO. International Organization for Standardization. **ISO 23611-3**: soil quality: sampling of soil invertebrates: part 3: sampling and soil extraction of enchytraeids. Geneve, 2007.
- ISO. International Organization for Standardization. **ISO/TS 17892-4**: Geotechnical investigation and testing: laboratory testing of soil: part 4: determination of particle size distribution. Geneve, 2004.
- LOWE, C. N.; BUTT, K. R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: a critical review. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. S281-S288, 2007. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2007.08.028.

NIVA, C. C.; CEZAR, R. M.; FONSECA, P. M.; ZAGATTO, M. R. G.; OLIVEIRA, E. M.; BUSH, E. F.; CLASEN, L. A.; BROWN, G. G. Enchytraeid abundance in Araucaria Mixed Forest determined by cold and hot wet extraction. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, supp. 1, p. 169-175, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.08414.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R.; BROWN, G. G. Enchytraeidae (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 351-365.

NURHIDAYATI; ARISOESILANINGSIH, E.; SUPRAYOGO, D.; HAIRIAH, K. Earthworm population density in sugarcane cropping system applied with various quality of organic matter. **The Journal of Tropical Life Science**, v. 2, p. 103-109, 2012

SCHMELZ R. M.; COLLADO R. A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta). **Soil Organisms**, v. 82, p. 1-176, 2010.

TAHERI S.; JAMES, S. W.; ROY, V.; DECAËNS, T.; WILLIAMS, B. W.; ANDERSON, F.; ROUGERIE, R.; CHANG, C.-H.; BROWN, G. G.; CUNHA, L.; STANTON, D. W. G.; DA SILVA, E.; CHEN, J.-H.; LEMMON, A. R.; MORIARTY LEMMON, E.; BARTZ, M.; BARETTA, D.; BAROIS, I.; LAPIED, E.; COULIS, M.; DUPONT, L. Complex taxonomy of the 'brush tail' peregrine earthworm *Pontoscolex corethrurus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 124, p. 68-70, 2018. DOI: 10.1016/j.ympev.2018.02.021.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. e ampliada. Brasília: Embrapa, 2017. 574p.