



## Minhocas nativas em testes ecotoxicológicos

Andressa Cristhy Buch<sup>(1)</sup>; Klaus Dieter Sauter<sup>(2)</sup> & George Gardner Brown<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Mestre em Ciências do Solo, Universidade Federal do Paraná, andressabuch@bol.com.br; <sup>(2)</sup>Professor da Universidade Positivo, ksautter@up.edu.br; <sup>(3)</sup>Pesquisador da Embrapa-Florestas, e, professor do Programa de Pós Graduação em Ciências do Solo, Departamento de Solos e Eng. Agrícola, Universidade Federal do Paraná, brownng@cnf.embrapa.br

### Pôster

#### INTRODUÇÃO

Em regiões de clima temperado como Europa e América do Norte são bem avançados o desenvolvimento, a padronização e a utilização de ensaios ecotoxicológicos para análise de risco de locais contaminados, com utilização de organismos de solo, como as minhocas, como bioindicadores. No entanto, poucos são os estudos já conduzidos para avaliar impactos de agrotóxicos em ecossistemas tropicais e, quando existentes, a maioria dos dados é gerada a partir de espécies exóticas em regiões tropicais, ocasionando uma extrapolação possivelmente tendenciosa dos resultados, pelo fato de usarem metodologias baseadas em protocolos para regiões de clima temperado, mascarando a situação real para regiões tropicais, e podendo levar a conclusões equivocadas.

Os testes padronizados, como os da ISO, geralmente preconizam a utilização de espécies nativas de clima temperado, como *Eisenia fetida* e *E. andrei*, as quais podem ser pouco relevantes para estudos ecotoxicológicos em regiões tropicais, já que não são espécies nativas da região, e pelo fato de viverem na serapilheira, ou seja, alimentam-se próximo à camada superficial do solo (epigêica). Quando o agrotóxico é aplicado no solo, este não fica restrito à camada superficial do solo, mas pode migrar para as camadas mais profundas (por exemplo, quando chove) onde os animais endogêicos se encontram.

*Pontoscolex corethrurus* é uma espécie nativa de regiões tropicais e de ampla distribuição, comumente encontrada em solos antropogênicos (Römbke & Verhaagh, 1992), apresenta maior relevância ecológica que as espécies padrão por viver abaixo das camadas superficiais do solo (endogêica), e por ingerir solo, enquanto que *E. andrei* se alimenta mais de resíduo vegetal, sendo, portanto, uma alternativa para testes ecotoxicológicos em solos tropicais.

Ao escavar e ingerir solo ou serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com poluentes que podem estar na solução do solo ou adsorvidos nas partículas minerais e na matéria orgânica. Elas podem ainda absorver os

contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula. Assim as minhocas podem se intoxicar, morrer ou sobreviver, incorporar ou até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (Visanathan, 1994; Cortet et al., 1999; Burger, 2006). Isso pode ser um perigo para seus predadores, influenciando a cadeia trófica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade das espécies *Eisenia andrei* e *Pontoscolex corethrurus* através de testes ecotoxicológicos, como bioindicadoras de solos contaminados com carbendazim, carbofurano e glifosato, alguns dos agrotóxicos mais utilizados em frutíferas e grãos no Brasil.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Os testes ecotoxicológicos foram realizados na Embrapa Florestas, situada no município de Colombo – Paraná. Foi utilizado nos testes, solo artificial tropical – SAT (Garcia et al., 2004) cuja formulação foi de 70% de areia fina, 20% de argila branca (caulim), 10% de pó de casca de coco triturada, com pH de  $6,0 \pm 0,5$  e, capacidade de retenção de água ajustada para 60%.

Para a realização dos testes ecotoxicológicos foram selecionadas duas espécies de minhocas: *E. andrei* (Lumbricidae), adquiridas de vermicompostagem do Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA), e *P. corethrurus* (Glossoscolecidae), coletada em áreas próximas a Embrapa Florestas, de solos classificados como Cambissolos. Para o teste foram selecionados animais na fase adulta com biomassa entre 0,7 g e 1,0 g (*P. corethrurus*) e 0,3 g a 0,6 g (*E. andrei*). Os animais foram colocados em solo artificial 24 horas antes do início dos testes para aclimatização.

Os agrotóxicos avaliados foram: 1) Inseticida/Nematicida sistêmico, Furadan<sup>®</sup> 350 SC, cujo ingrediente ativo é o carbofurano (350 g L<sup>-1</sup>), de classe toxicológica I - extremamente tóxico. 2) Herbicida sistêmico, Glifosato Pica-Pau<sup>®</sup> 480 SC, cujo ingrediente ativo é o glifosato (480 g L<sup>-1</sup>), de classe toxicológica II - altamente tóxico. 3) Fungicida sistêmico, Derosal<sup>®</sup> 500 SC, cujo



ingrediente ativo é o carbendazim ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ), de classe toxicológica III - moderadamente tóxico.

1- Teste de Fuga - Comportamental - Este experimento foi executado conforme o protocolo da ISO 17512-1 (2007). Foram realizados três testes de fuga, um para cada agrotóxico avaliado, para cada espécie de minhoca. Cada concentração foi testada com cinco repetições. As concentrações testadas foram: 0; 1; 3,2; 10; 31,6; 100; 316; 1000 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para o carbendazim; 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para o carbofurano e 0; 7; 14; 21; 30; 47 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para o glifosato. O teste foi realizado em caixa plástica transparente (26,2 cm x 17,7 cm x 8,5 cm) preenchidas com SAT até a altura de 4 a 5 cm (aproximadamente 500 g de peso seco). Com o auxílio de um tira de papelão, colocada transversalmente no meio da caixa, uma das metades foi preenchida com SAT controle, sem adição de agrotóxico, e a outra metade foi preenchida com solo homogêneo com a concentração teste de determinado agrotóxico. Em seguida, a tira de papelão foi removida e no espaço deixado foram adicionados 10 animais adultos para o teste com *E. andrei*, e 6 animais para o teste com *P. corethrurus* (número reduzido de animais devido a seu tamanho corporal). As caixas foram fechadas e armazenadas no escuro, sob temperatura ambiente de  $20 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os animais não foram alimentados durante os testes. Após o período de 48 horas foram verificados o número de animais em cada um dos tratamentos, determinando, desta forma, o seu comportamento de fuga.

2- Teste Agudo – Mortalidade - Este experimento foi executado conforme o protocolo da ISO 11268-1 (1993). Foram realizados três testes de mortalidade, um para cada agrotóxico avaliado com cinco repetições. As concentrações testadas foram: 0; 1; 3,16; 10; 31,6; 100 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para o carbendazim; 0; 2,5; 5; 10; 16; 32 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para o carbofurano e 0; 7; 14; 21; 30; 47 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para o glifosato. Os testes foram realizados em frascos de vidro, com 500 g de SAT e contaminados com as concentrações citadas anteriormente para cada agrotóxico. Foram colocados nos frascos 10 animais da espécie *E. andrei* e 6 de *P. corethrurus*. Antes de serem adicionados aos frascos os animais foram pesados. Os experimentos foram mantidos em temperatura ambiente de  $20 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após sete dias, os animais de cada concentração avaliada foram novamente pesados, e alterações morfológicas e comportamentais observadas foram anotadas. Os animais mortos foram retirados e os sobreviventes mantidos até o 14º dia, quando então, foram pesados e quantificados o número de mortos. Durante o teste

as minhocas foram alimentadas uma vez, aos sete dias, com 20 g de esterco de equino desfaunado, seco e peneirado em malha de 4 mm de diâmetro.

Os valores da concentração mediana efetiva ( $\text{CE}_{50}$ ) com 95% de confiabilidade para o teste fuga e a concentração mediana letal ( $\text{CL}_{50}$ ) para o teste de mortalidade foram determinados através do método Trimmed Spearman - Kärber (Hamilton et al., 1977). A análise de variância (ANOVA), de significância e das concentrações CENO - Concentração mais elevada sem efeito observável, e a CEO - Concentração mais baixa com efeito observável, para o teste de fuga foram determinadas através do teste de Fisher (Software 50-50 MANOVA), e a mortalidade analisada pelo Teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O carbendazim e o carbofurano nas concentrações testadas foram tóxicos para as duas espécies, para o carbendazim a  $\text{CE}_{50}$  foi 76,1 e 65,8 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT e a  $\text{CL}_{50}$  19,7 e 15,3 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para *E. andrei* e *P. corethrurus*, respectivamente. Para o carbofurano a  $\text{CE}_{50}$  foi 9,7 e 7,3 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT e a  $\text{CL}_{50}$  13,5 e 9,3 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT para *E. andrei* e *P. corethrurus*, respectivamente. O glifosato não apresentou efeito toxicológico para ambas as espécies, houve apenas 3,3 % mortalidade para *P. corethrurus* e 4% para *E. andrei*, na concentração mais alta testada (47 mg i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de SAT). Estatisticamente, a sensibilidade de *P. corethrurus* parece ser semelhante à espécie padrão, para os agrotóxicos avaliados (**Figuras 1 e 2**).

As diferenças entre as respostas das espécies usadas, podem ser devido a diferenças nas características dos quimiorreceptores (Stephenson et al., 1998), na fisiologia, morfologia (Edwards & Bohlen, 1996) e ecologia (Lukkari & Haimi, 2005) das espécies avaliadas. As variações nas concentrações-respostas das diversas espécies podem estar ainda, dentre outras variáveis, estar associada à diferença nas temperaturas analisadas, à degradação ou metabolização dos agrotóxicos testados, e ao substrato usado.

## CONCLUSÕES

A espécie endôgena *P. corethrurus* teve sensibilidade similar à espécie padrão na maioria dos testes ecotoxicológicos agudos e comportamentais avaliados. Somente no teste agudo realizado em SAT contaminado com carbofurano, houve sensibilidade maior de *P. corethrurus*.

Faz-se necessário testar um maior número de agrotóxicos e metais pesados, para comprovar se a sensibilidade de *P. corethrurus* se mantém similar a



da espécie padrão. Caso as minhocas endogêicas e nativas sejam similares à ampla gama de contaminantes, então a representatividade de *E. andrei* será fortalecida, comprovando sua utilidade como bioindicadora de solos contaminados. Porém se houver diferenças relevantes nas sensibilidades das espécies aos contaminantes, será necessário rever o uso da espécie padrão nos testes ecotoxicológicos.

#### AGRADECIMENTOS

À CAPES, Universidade Federal do Paraná, Embrapa Florestas, Centro Paranaense de Referência em Agroecologia-CPRA e ao CNPq (bolsa para G. Brown).

#### REFERÊNCIAS

BURGER, J. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v.1, p.22-39, 2006.

CORTET, J.; VAUFLERY, A.G.; BALAGUER, N. P.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **Journal Soil Biology**, v.35, n.3, p.115-134, 1999.

EDWARDS, C. A., BOHLEN, P. J. **Biology and ecology of earthworms**. Chapman and Hall Ltd, London, 1996.

GARCIA, M. V. B.; ROEMBKE, J.; MARTIUS, C. Proposal for an artificial soil substrate for toxicity tests in tropical regions. In: **25<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)**, Portland. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC, 2004. Homepage: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2004/document/?id=41943>, 2004.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.11, n.7, p.714-719, 1977.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality- Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. ISO 11268-1. Geneva, Switzerland, 1993.

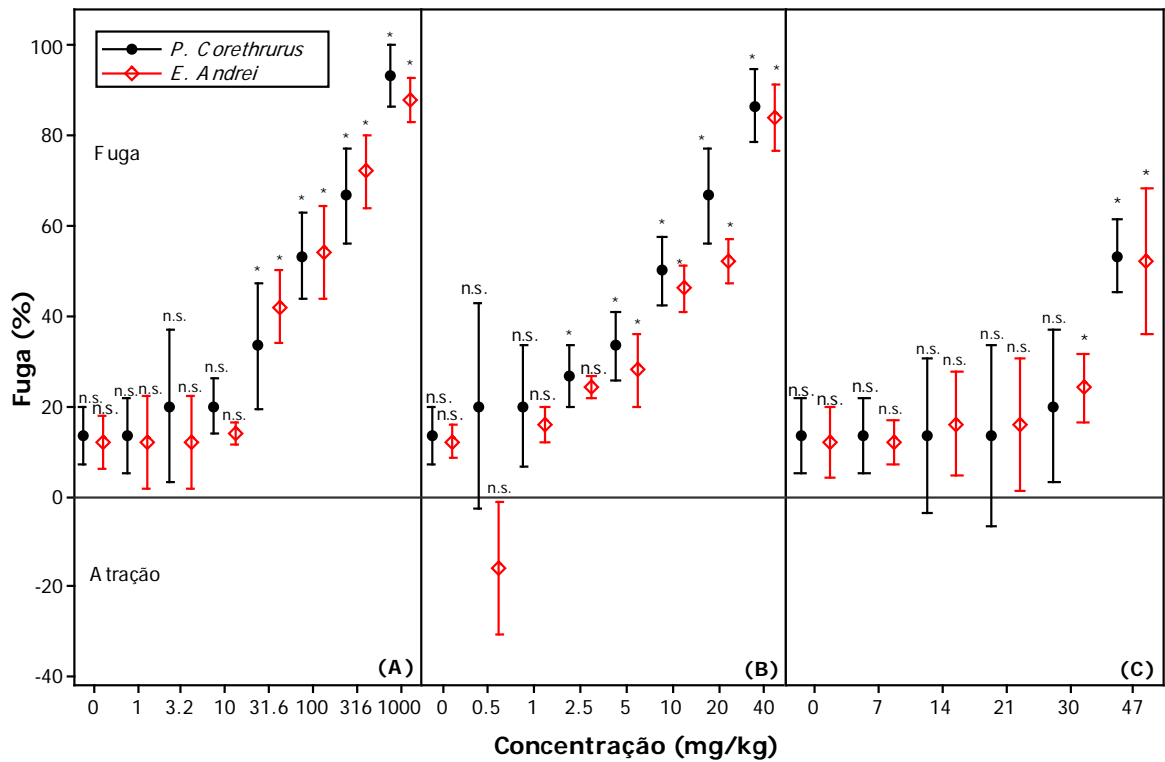
INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. Geneva, Switzerland, 2007.

LUKKARI, T.; HAIMI, J. Avoidance of Cu and Zn-contaminated soil by three ecologically different earthworm species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.35-41, 2005.

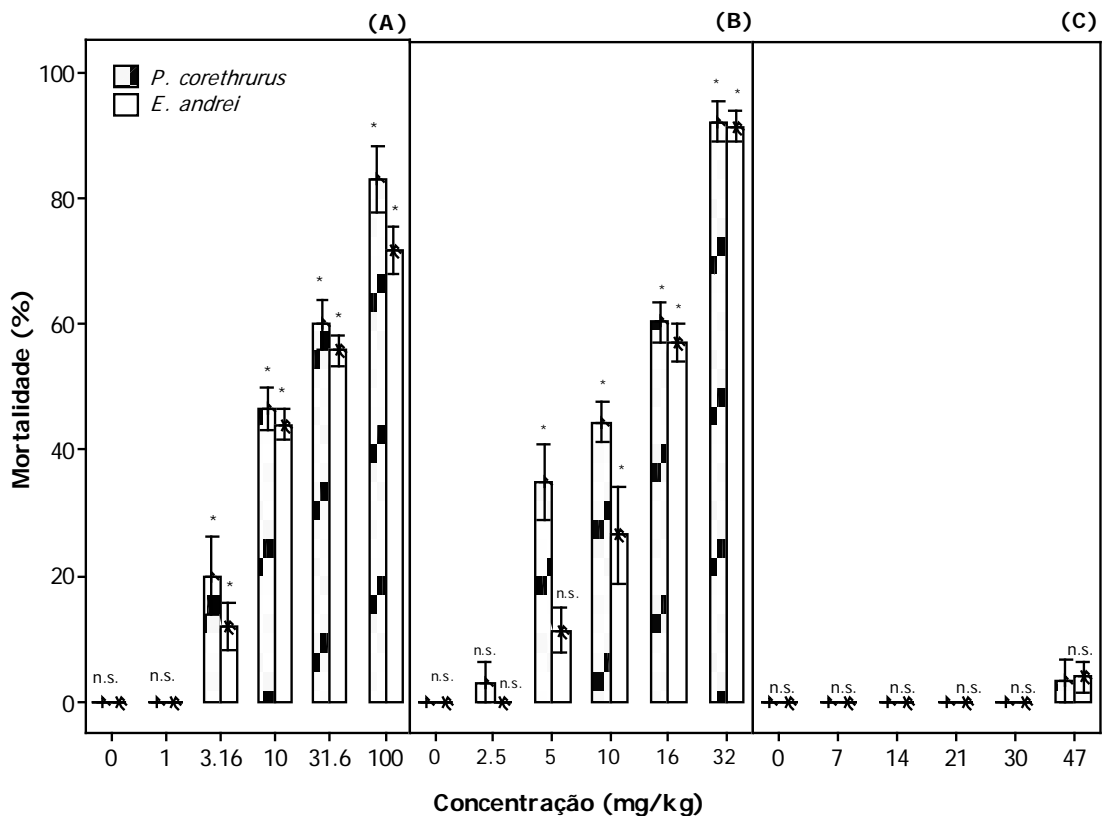
RÖMBKE, J.; VERHAAGH, M. About earthworm communities in a rain forest and an adjacent pasture in Peru. **Amazoniana**, v.12, p.29-49, 1992.

STEPHENSON, G.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N. K.; SOLOMON, K. R.; STEELE, T.; SCOGGINS, R. P. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Sheppard, S.C., Homstrup, J.D., Posthuma, L. (Eds.), **Advances in Earthworm Ecotoxicology**. SETAC Press, Pensacola, FL, 67-81, 1998.

VISNATHAN, R. Earthworms and assessment of ecological impact of soil xenobiotics. **Chemosphere**, v.28, p.413-420, 1994.



**Figura 1.** Concentração-resposta de fuga em solo artificial tropical – SAT contaminado com (A) carbendazim, (B) carbofurano e (C) glifosato para *Pontoscolex corethrus* e *Eisenia andrei*. Valores médios e desvio padrão em barras, \* estatisticamente significativo, n.s. = não significativo, Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 2.** Concentração-resposta de mortalidade em solo artificial tropical – SAT contaminado com (A) carbendazim, (B) carbofurano e (C) glifosato para *Pontoscolex corethrus* e *Eisenia andrei*. Valores médios e desvio padrão em barras, \* estatisticamente significativo, n.s. = não significativo, Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ .