

Julia Carina Niemeyer
Paulo Roger Lopes Alves
Maria Edna Tenório Nunes
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
George Gardner Brown
Katy Cantelli
Klaus Dieter Sautter
Silvia Gonçalves Egler
Julia Corá Segat
Ricardo Gonçalves Cesar
Juan Colonese
Amarildo Pasini
Jörg Römbke
José Paulo Sousa
Andressa Cristhy Buch
Dilmar Baretta

O conteúdo descrito a seguir foi baseado na Norma NBR ISO 17512-1 (ABNT, 2011) - Qualidade do Solo - Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *E. andrei*), cuja utilização não deve ser dispensada para realização de um ensaio de fuga com minhocas, seja para avaliar o efeito de uma substância adicionada ao solo artificial ou solo natural, seja para a avaliação de solo já contaminado. A metodologia abaixo foi acrescida de detalhes seguindo a literatura mais atualizada e a experiência dos próprios autores na adaptação da mesma para as condições brasileiras. Além disso, incluíram-se dados referentes ao uso de outras espécies de minhocas, além das *Eisenia* spp.

13.1 Princípio do ensaio de fuga

Os ensaios de fuga visam avaliar se um solo contaminado ou se um contaminante adicionado ao solo pode causar um comportamento de fuga/rejeição dos organismos. Considera-se como comportamento de fuga o ato de um organismo evitar o solo-teste, com preferência pelo solo controle.

Esta mudança no comportamento dos organismos pode ser utilizada para quantificar os efeitos do estresse sobre os indivíduos e as populações. Considerando o fato de que a resposta de evasão de invertebrados do solo varia entre as espécies, devido à sua sensibilidade distinta para os contaminantes e os modos de exposição, o uso dos oligoquetas se baseia no fato de que esses organismos

possuem quimiorreceptores sensíveis a uma ampla gama de produtos químicos (Edwards; Bohlen, 1996).

Os ensaios de fuga com oligoquetas são de grande relevância ecológica (Yearley et al., 1996). Se as minhocas evitam um local contaminado, temos a redução da população e, conseqüentemente, a perda da função por ela exercida naquele local. Portanto, o objetivo não é utilizar o ensaio de fuga em substituição ao ensaio de letalidade ISO 11268-1 (ISO, 1993) e ao ensaio de reprodução de oligoquetas ISO 11268-2 (ISO, 1998), mas sim avaliar outro parâmetro subletal. Enquanto a principal aplicação dos ensaios de fuga é avaliar solos potencialmente contaminados, também é possível o uso deste ensaio para a avaliação dos efeitos das substâncias químicas isoladamente, depois de serem adicionadas ao solo. Porém, os contaminantes envolvidos na situação em investigação devem ser detectáveis pelas minhocas, porque algumas substâncias não são percebidas e, conseqüentemente, não são evitadas pelos organismos (Greenslade; Vaughan, 2003). Como exemplo disto, pode-se observar substâncias orgânicas inibidoras da atividade da acetilcolinesterase que, quando testadas em altas concentrações nos testes de fuga, podem gerar um resultado confuso. Estas substâncias perturbam o mecanismo de resposta das minhocas que, ao entrarem em contato com o solo contaminado, não conseguem escapar do mesmo.

Os ensaios de fuga podem ser usados como uma ferramenta rápida, de baixo custo e ecologicamente relevante para avaliar a função de habitat dos solos (Hund-Rinke et al., 2003), sendo úteis na avaliação de áreas contaminadas ou áreas suspeitas de contaminação (Stephenson et al., 1998; Niemeyer et al., 2010) ou na avaliação de solos remediados (Shugart, 2009). Para maiores detalhes sobre a aplicação dos ensaios de fuga, ver o capítulo 2.

Na avaliação de solos de áreas contaminadas, o solo controle para as comparações deve ter propriedades físicas e químicas semelhantes ao solo contaminado, com exceção da contaminação, já que as propriedades do solo (como conteúdo de matéria orgânica e textura) têm uma grande influência sobre o comportamento das minhocas (Natal-da-Luz et al., 2008).

13.2 Organismos-teste

13.2.1 *Eisenia fetida* ou *E. andrei*

O ensaio é realizado com minhocas adultas (espécies *E. fetida* ou *E. andrei*) com peso individual entre 300 mg e 600 mg. Os cultivos não precisam ser sincronizados. A forma de cultivo de minhocas é apresentada na seção 4.1.3. As minhocas devem ser aclimatadas no solo controle por no mínimo um dia antes do ensaio.

13.2.2 Outras espécies de minhocas

Até o momento, apenas duas outras espécies foram testadas no Brasil usando o ensaio de fuga: *Pontoscolex corethrurus* (Garcia, 2004; Mestrinho, 2009; Buch, 2010; Buch et al., 2017) e *Eudrilus eugeniae* (Sautter et al., dados não publicados). No exterior, já foi testada a espécie *P. excavatus* (Silva; Van Gestel, 2009). Testes prévios de aceitação do substrato-teste devem ser realizados seguindo as instruções detalhadas na seção 4.3 pois espécies endogeicas da família Megascolecidae, como *Amyntas gracilis* e *Metaphire californica*, podem (Mostert et al., 2002) ou não (Cantelli, 2011), se adaptar ao solo artificial, mas geralmente se adaptam bem e podem ser testadas em solo natural. O ensaio é realizado com minhocas adultas de espécies geófagas (por ex.: *P. corethrurus*, *A. gracilis*) coletadas no campo ou criadas em laboratório, ou espécies epigeicas (por ex.: *P. excavatus*, *E. eugeniae*), criadas em laboratório ou adquiridas comercialmente. Caso sejam coletadas no campo, devem ser seguidas as instruções detalhadas no capítulo 5. Os adultos de *A. gracilis* e *E. eugeniae* devem pesar no mínimo 1 g e as adultas de *P. corethrurus* no mínimo 700 mg. O peso de *P. excavatus* deve estar entre 200 mg e 400 mg. As minhocas a serem usadas devem ter tamanho, peso e idades (caso venham de cultivos em laboratório) semelhantes, e devem ser aclimatadas no solo controle por no mínimo um dia antes do ensaio.

13.3 Recipientes-teste e equipamentos

Para a realização dos testes de fuga são necessários alguns equipamentos básicos de laboratório como recipientes-teste, balança para pesagem do solo, e os equipamentos necessários para a determinação de pH e umidade, como placa agitadora e estufa (ver capítulo 7).

Para *E. andrei* e *E. fetida*, são comumente utilizados recipientes-teste de plástico, vidro ou aço inoxidável, com capacidade para 1 L a 2 L, com área de cerca de 200 cm² e que possibilitem adicionar cerca de 5 cm a 6 cm de solo. Devem possuir tampas transparentes com furos para permitir trocas gasosas, e o acesso à luz. Recomenda-se recipientes em aço inox para testar solo contaminado com compostos orgânicos, e recipientes em plástico de alta densidade para testar solo contaminado com metais ou compostos metalóides. Materiais inertes como o vidro são preferíveis mas, devido ao curto período do teste e ao grande volume proporcional de solo no recipiente-teste, pode-se considerar desprezível a redução da concentração química no solo resultante da adsorção às paredes do recipiente-teste.

Para as espécies maiores como *A. gracilis* e *E. eugeniae*, devem ser usadas caixas de plástico maiores com volume de aproximadamente 3 L (preferivelmente dimensões 10-12 cm altura, 15 cm largura e 20-22 cm comprimento), que possam comportar maior quantidade de solo. Para as espécies menores

como *P. corethrurus* e *P. excavatus*, pode-se usar os mesmos recipientes usados para as espécies padrão.

Dois diferentes desenhos de recipientes-testes foram desenvolvidos e têm sido aplicados com sucesso: a câmara com duas seções e a câmara com seis seções. Ambos os desenhos são tanto aplicáveis para uma concentração única (ex: para determinar a qualidade do solo de uma área) quanto para multi-concentrações (ex: para determinar a ecotoxicidade de substâncias químicas adicionadas ao solo). Ambos os casos permitem que as minhocas façam a escolha inicial entre os compartimentos (solo controle versus solo contaminado).

Os recipientes-teste mais utilizados são os de duas seções (Figura 13.1), divididas com o auxílio de uma divisória móvel durante a pesagem das porções de solo e no momento da leitura do teste.

O recipiente-teste com seis seções foi proposto por Stephenson et al. (1998) (Figura 13.2) e desenvolvido em plexiglas (um tipo de acrílico), mas não está disponível comercialmente. O recipiente-teste é circular, podendo ser feito também de aço inox, onde as seções são interconectadas por buracos que possibilitam a movimentação das minhocas entre os compartimentos de solo.

Divisórias de plástico, vidro ou metal são utilizadas para separar as seções do recipiente-teste durante a montagem do ensaio e no momento da leitura, quando as seções são novamente separadas, o número de minhocas em cada seção é determinado.

Foto: Julia Carina Niemeyer



Figura 13.1. Exemplo de recipiente-teste em plástico, câmara com duas seções. A divisória está inserida durante a pesagem de cada uma das porções de solo. Após a pesagem, a divisória é retirada e as minhocas são adicionadas ao centro da caixa.

Foto: Paulo Roger Lopes Alves



Figura 13.2. Exemplo de um recipiente-teste com seis seções.

13.4 Montagem do ensaio de fuga

Câmara de duas seções

Os recipientes são divididos em duas seções iguais através de uma divisória introduzida verticalmente (Figura 13.1). Uma das seções do recipiente-teste é preenchida com o solo controle (sem contaminação) e a outra seção é preenchida com o solo-teste, ambas contendo o mesmo peso de solo. Em seguida, a divisória é removida, sem que as duas partes percam o contato, e são adicionadas as 10 minhocas, simultaneamente, no centro da caixa, na linha de separação entre as duas seções. Assim, as minhocas terão a possibilidade de mover-se entre as duas seções. Quando as minhocas entrarem no solo, os recipientes são tampados e levados à câmara ou ambiente para o teste. O teste é realizado em cinco repetições por tratamento. As minhocas não são alimentadas durante o teste.

Ao final do período de exposição de 48 horas, as duas seções dos recipientes são separadas novamente pela inserção das divisórias, antes mesmo de removê-las do ambiente do ensaio, evitando que as minhocas se movam devido à manipulação dos recipientes. Em seguida, realiza-se a contagem das minhocas em cada seção, ou seja, no solo controle e no solo-teste em cada uma das réplicas. Quando algum organismo é dividido pela inserção da divisória, conta-se meia (0,5) para cada lado da caixa-teste, independentemente do comprimento do corpo, ou da direção para a qual a minhoca estava se locomovendo. As minhocas não encontradas (devido ao escape do recipiente-teste ou à mortalidade) são registradas como mortas.

Para as duas espécies de *Eisenia* e *P. corethrurus*, os recipientes devem comportar cerca de 500 g de solo de cada lado, e para *A. gracilis* são necessários recipientes que comportem 1.000 g de solo de cada lado, devido ao seu tamanho corporal maior.

Câmara de seis seções

O solo-teste e o solo-controle são preparados e colocados nos recipientes-testes com 5-6 cm de profundidade (350 mL de solo), em cada um dos três compartimentos de forma aleatória (por exemplo, compartimentos 1, 3 e 5 contendo solo-teste e 2, 4 e 6 contendo solo-controle) (Figura 13.2). Não adicionar solo na câmara central. Dez minhocas são adicionadas à câmara central, uma de cada vez, e o compartimento onde cada minhoca entrou é registrado. Os recipientes são cobertos e colocados na câmara de incubação.

O ensaio é realizado com cinco replicatas para ensaios com uma única concentração, e pelo menos em duplicatas para um ensaio com multiconcentrações. Para ensaios de multiconcentrações, o solo da área é diluído com o solo-controle apropriado.

No fim do período do ensaio (48 horas), os divisores são posicionados para impedir a movimentação de minhocas entre os compartimentos. Os divisores devem ser inseridos antes dos recipientes-testes serem removidos da câmara

de incubação. O número de minhocas em cada compartimento é registrado e o número total em cada tratamento dentro de uma unidade de ensaio determinada. As minhocas seccionadas devido à inserção do divisor são contadas como 0,5, independentemente do comprimento do restante do corpo. Tanto as minhocas que escaparam do recipiente-teste, bem como as que morreram e se desintegraram durante o ensaio são consideradas perdidas.

13.5 Ensaio preliminar do ensaio de fuga de minhocas

O ensaio de fuga é planejado para detectar efeitos subletais sendo invalidado se mais de uma minhoca por recipientes-teste (ou seja, 10%) estiver morta ou perdida ao final do ensaio. Portanto, recomenda-se a realização de um ensaio preliminar na busca por concentrações subletais como descrito na seção 11.2.5.

13.6 Ensaio definitivo do ensaio de fuga de minhocas

Tanto os ensaios preliminares, usando quatro concentrações (por exemplo, 1 mg kg⁻¹, 10 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ e 1.000 mg kg⁻¹) quanto os ensaios definitivos devem seguir as recomendações de contaminação do solo e design (para determinar valores de CEx) descritos para os demais ensaios com minhocas (ver capítulos 10 e 14).

13.7 Substância de referência

O ácido bórico (H₂BO₃) é recomendado como substância de referência tóxica. Um comportamento de fuga deve ser obtido numa concentração de 750 mg H₂BO₃ por kg de solo (peso seco), em solo artificial ou solo natural.

Quando utilizado solo natural como substrato-teste, as propriedades principais do solo devem ser expressas no relatório do ensaio, tais como textura, pH e conteúdo de matéria orgânica (ver capítulo 7).

13.8 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de fuga de minhocas

Os requisitos e especificações recomendadas para a condução do ensaio de fuga com minhocas estão descritos na Tabela 13.1 e o resumo do cronograma para condução do ensaio de fuga está descrito na Tabela 13.2.

Tabela 13.1. Resumo dos requisitos para o ensaio de fuga com minhocas.

Requisitos	Especificação
Tipo de ensaio	Comportamental
Referências	NBR/ISO 17512-1 (ABNT, 2011)
Duração total	48 h
Organismo-teste	Minhocas <i>E. fetida</i> ou <i>E. andrei</i> (adultos, com peso individual entre 300 mg e 600 mg). <i>A. gracilis</i> e <i>E. eugeniae</i> adultas com peso individual >1 g. <i>P. corethrurus</i> adultas com peso individual >700 mg. <i>P. excavatus</i> adultas com peso individual entre 200 e 400 mg.
Alimentação	Sem alimentação durante o ensaio
Substrato	Solo artificial/natural ou de áreas contaminadas.
Quantidade de solo por recipiente	Preencher cada lado da caixa (1 L a 3 L de capacidade, dependendo do organismo teste) com solo até a altura de 5 cm a 6 cm
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, temperatura 20 ± 2 °C, luminosidade entre 400 e 800 lx, fotoperíodo controlado em ciclos de claro/escuro entre 12 h/12 h e 16 h/8 h (ABNT, 2011).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle
Número mínimo de repetições/tratamento	5
Número de organismos por repetição	10
Efeito observado	Comportamento de fuga (% de fuga)
Expressão dos resultados	CENO, CEO, CE50/CE20 em 48 horas. Além de: tóxico ou não tóxico
Crterios de validade	Ensaio controle com uma proporção média de 40% a 60% das minhocas em cada compartimento; mortalidade < 10%
Substância de referência	Ácido bórico, resposta de fuga para 750 mg H ₃ BO ₃ kg ⁻¹ solo (massa seca)

Tabela 13.2. Cronograma de execução do ensaio de fuga com minhocas.

Etapas	Período	Tarefas
Preparo do material	Dia 1-2	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.2.4).
	Dia 3	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).
	Dia 4-6	- Seleção de organismos para aclimatação (ver seções 11.2.1 e 11.2.2). - Separação do substrato em lotes.
Montagem do ensaio	Dia 7	- Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste. - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Introdução dos organismos. - Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade iniciais do ensaio.
Finalização do ensaio	Dia 9	- Reinserção da divisória e contagem dos organismos-teste em cada lado das caixas (ver seção 13.4). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade finais do ensaio.

13.9 Validação do ensaio de fuga de minhocas

Como o objetivo do teste de fuga é detectar efeitos subletais, não deve haver mortalidade neste ensaio. Portanto, o teste é invalidado se o número de minhocas mortas ou perdidas for > 10% por tratamento ou por réplica.

Para validar o ensaio, também é preciso conferir a homogeneidade da distribuição das minhocas no recipiente-teste. Para tanto, realiza-se um teste em paralelo com os tratamentos onde o recipiente-teste recebe o mesmo solo nas duas seções. A orientação dos recipientes-testes deve ser a mesma na sala de incubação. Ao final do ensaio, a proporção de minhocas deve ser entre 40-60% para cada lado, mostrando que a distribuição é homogênea.

13.10 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de fuga

Ao final do ensaio, determina-se a média e o desvio padrão do número de indivíduos no solo-teste. Quando se testa apenas uma concentração, como o solo de um local contaminado, compara-se a média de indivíduos no solo-teste com a média de indivíduos no solo controle através do teste exato de Fisher ou outro teste estatístico para comparações de amostras pareadas (Zar, 1999). Quando há um número médio significativamente baixo de minhocas no solo-teste em relação ao solo controle, indica uma resposta de fuga do solo-teste. Isto sugere que a função de habitat do solo-teste é limitada.

O cálculo do percentual de fuga do solo-teste (ou de uma concentração de uma substância) é realizado de acordo com a equação (1). Respostas negativas (quando as minhocas preferem o solo-teste) são consideradas com 0% de fuga.

$$x = \left(\frac{n_c - n_t}{N} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

x = fuga, expressa em porcentagem.

n_c = número de minhocas no solo controle (por recipiente-teste ou no solo controle de todas as replicatas).

n_t = número de minhocas no solo-teste (por recipiente-teste ou no solo-teste de todas as replicatas).

N = número total de minhocas (geralmente 10 por recipiente-teste ou no solo controle de todas as replicatas).

Usando estes dados, qualquer concentração mediana efetiva, CEx, para um efeito percentual específico (CE50 ou CE20) e seus limites de confiança asso-

ciados podem ser calculados. Para análises estatísticas de dados de ecotoxicidade ver Zar (1999).

Os cálculos estatísticos apresentados aqui não são apropriados para o caso em que o solo controle e o solo-teste diferem em outras propriedades principais além dos contaminantes. Neste caso, recomenda-se a aplicação de um valor limiar fixo ao invés de uma diferença estatística significativa entre o número de minhocas no controle e o solo-teste. Quando o número total de minhocas no solo-teste for < 20%, o solo-teste é classificado como tendo função de habitat limitada.

Se for observada a atração de > 80% das minhocas pelo solo-teste, não significa que possamos excluir a presença de substâncias químicas. Inclusive, o resultado deve também ser avaliado como um efeito.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 17512-1/2011**: qualidade do solo: ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento: parte 1: ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro, 2011.

BUCH, A. C. ***Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) e *Eisenia andrei*, (Bouché 1972), como bioindicadoras de solos contaminados por agrotóxicos**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; CORREIA, M. E. F.; LOURENÇATO, L. F.; SILVA-FILHO, E. V. Ecotoxicology of mercury in tropical forest soils: impact on earthworms. **Science of the Total Environment**, v. 589, p. 222-231, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.150.

CANTELLI, K. B. **Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. **Biology and ecology of earthworms**. 3rd. ed. London: Chapman & Hall, 1996.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn, Bonn.

GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v. 47, p. 171-179, DOI: 10.1078/0031-4056-00180.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: results of a laboratory comparison test. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, p. 7-12, DOI: 10.1007/BF02989462.

ISO. International Organisation for Standardization. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 1: determination of acute toxicity using soil substrate. Geneve, 1993.

ISO. International Organisation for Standardization. **ISO 11268-2**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 2: determination of effects on reproduction. Geneve, 1998.

MESTRINHO, C. C. **Toxicidade aguda e repelência do fungicida oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* e *Pontosclex corethrurus* (Oligochaeta)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MOSTERT, M. A.; SCHOEMANN, A. S.; VAN DER MEWE, M. The relative toxicities of insecticides to earthworms of the *Pheretima* group (Oligochaeta). **Pest Management Science**, v. 58, 446-450, DOI: 10.1002/ps.473.

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests in site-specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1112-1117, 2008. DOI: 10.1897/07-386.1.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA-SANTOS, M.; RIBEIRO, R.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Environmental risk assessment of a metal contaminated area in the tropics. Tier I: screening phase. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 1557-1571, 2010. DOI: 10.1007/s11368-010-0255-x.

SHUGART, L. R. **Emerging topics in ecotoxicology: principles, approaches and perspectives**. Oak Ridge: Springer Science, 2009.

STEPHENSON, G. L.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N. K.; SOLOMON, K. R.; STEELE, T.; SCROGGINS, R. P. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: SHEPPARD, S.; BEMBRIDGE, J.; HOLMSTRUP, M.; POSTHUMA, L. (Ed.). **Advances in earthworm ecotoxicology**. Pensacola: Setac Press, 1998. p. 67-81.

YEARDLEY, R. B.; LAZORCHAK, J. M.; GAST, L. C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 1532-1537, 1996. DOI: 10.1002/etc.5620150915.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663 p.