

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

## **RESPOSTAS ECOTOXICOLÓGICAS DE EISENIA ANDREI EXPOSTAS AO COBRE<sup>1</sup>**

**João Paulo Conrad Arboit<sup>2</sup>, Camila Alves Carvalho<sup>3</sup>, Guilherme Eduardo Mörschbacher Gabriel<sup>4</sup>, Jéssica Tais Kerkhoff<sup>5</sup>, Bárbara Clasen<sup>6</sup>.**

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa Realizado no Curso de Agronomia da UERGS de Três Passos

<sup>2</sup> Aluno do Curso de Graduação em Agronomia da UERGS, bolsista IniCie UERGS

<sup>3</sup> Aluna do Curso de Graduação em Agronomia da UERGS, bolsista IniCie UERGS

<sup>4</sup> Aluno do Curso de Graduação em Agronomia da UERGS

<sup>5</sup> Aluna do curso de graduação em Agronomia da UERGS

<sup>6</sup> Professora Orientadora Doutora do Departamento de Estudos da Agronomia da UERGS

### **1. INTRODUÇÃO**

O uso indiscriminado e sem orientação profissional de insumos agrícolas contribuem para o aumento da poluição ambiental, em função da liberação de produtos químicos considerados tóxicos para a fauna, flora e a saúde humana. Dentre estes compostos químicos utilizados na agricultura, destaca-se a calda bordalesa, um fungicida amplamente utilizado no controle do míldio em videiras. A intensa utilização deste produto a base de cobre resulta em uma adição considerável do metal ao solo, aumentando o potencial de toxicidade e contaminação ao ambiente (MIOTTO et al., 2014). O efeito das substâncias químicas aplicadas ao solo pode ser avaliado através de testes ecotoxicológicos, pois estes permitem compreender e prever os efeitos destas substâncias sobre as comunidades naturais em condições realistas (CHAPMAN, 2002). A ecotoxicologia utiliza indicadores biológicos para prever e/ou quantificar as mudanças na qualidade do solo, tendo como objetivo o desenvolvimento de estratégias para interromper, reverter ou remediar esses impactos (AZEVEDO & CHASIN, 2003). Como os ensaios de toxicidade com organismos do solo ainda não são bem desenvolvidos no Brasil, faz-se necessário a utilização de técnicas internacionalmente reconhecidas como a International Standard Organization (ISO) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Nestas normas estão presentes protocolos padrões para ensaios de toxicidade aguda e crônica em minhocas, permitindo a padronização de estudos e comparações internacionais. É crescente o número de trabalhos que utilizam minhocas em testes ecotoxicológicos, em função desses organismos serem altamente influenciados pela contaminação do solo, pois ao ingerir resíduos destas substâncias durante sua alimentação podem se intoxicar, incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (MABOETA & FOUCHÉ, 2014). As minhocas podem ainda absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula (BROWN & DOMÍNGUEZ, 2010). A presença de metais no solo influencia as minhocas podendo ocasionar mortalidade (SPURGEON et al., 2000), redução de seu crescimento (KHALIL et al., 1996), diminuição na fertilidade (SIEKIERSKA & URBANSKA-JASIK, 2002), redução na produção de casulos e na viabilidade dos casulos (MA, 1988). Estas alterações observadas no organismo são utilizadas como indicativos de contaminação em ensaios ecotoxicológicos. O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos toxicológicos das diferentes doses de cobre na biomassa e reprodução das minhocas *Eisenia andrei*, através dos testes de toxicidade aguda e crônica.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Testes ecotoxicológicos

Para o teste de toxicidade aguda (teste de mortalidade) e o teste de toxicidade crônica (teste de reprodução) utilizou-se minhocas *Eisenia andrei* como bioindicadores da contaminação por cobre. Os ensaios utilizou diferentes doses de cobre, (0, 35, 70, 105, 140, 175 mg.Kg<sup>-1</sup>), aplicados ao solo na forma líquida, de uma solução de sulfato de cobre. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos, com três repetições. A montagem do ensaio consistiu em adicionar 500 gramas de solo contaminado com as diferentes doses de cobre nos recipientes com capacidade de 1L, formando uma lâmina de solo de 5 cm. A umidade do solo foi mantida em 60% da capacidade de campo. Para cada unidade experimental foi adicionado esterco bovino seco, e em seguida foram pesadas 10 minhocas e alocadas em cada unidade experimental. Com peso que variou de 250 a 600 mg. Os recipientes foram acondicionados em BOD com temperatura constante de 20°C.

### 2.2 Teste de Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda foi baseado na orientação da “Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)”- Guia para testes químicos nº 207 (OECD-1984). As minhocas foram pesadas no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia após instalação do experimento.

### 2.3 Análise estatística

No teste de toxidade aguda, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas através do software Assistat.

### 2.4 Teste de Toxicidade Crônica

O solo utilizado para os testes ecotoxicológicos foram coletados na camada de 0-20 cm da área de campo sem histórico de uso agrícola. O solo coletado apresenta as seguintes características: pH em água 5,6; matéria orgânica 1,2%; Argila 26%, CTC 12,9; P 18 mg/L; K 40 mg/L; Ca 6,9 cmolc/L; Mg 3,3 cmolc/L; H+Al 2,5 cmolc/L; Cu 0,4 mg/L; Zn 1,7 mg/L.

No experimento avaliou-se a dose de cobre com potencial para interferir na reprodução das minhocas. Estas minhocas foram colocadas individualmente em placas de Petri contendo solo e esterco bovino como alimento. Posteriormente as placas foram acondicionadas em uma BOD onde permanecem até as minhocas atingirem a fase adulta. O ensaio de toxicidade crônica seguiu a orientação do International Standard Organization (ISO 1997) – Efeitos de poluentes em minhocas, determinação do efeito na reprodução. Foi adicionado semanalmente esterco bovino ao longo do período de 28 dias. No final deste período as minhocas foram removidas, e os casulos deixados nos solos contaminados durante um período de 56 dias. Após este período, o número de casulos, bem como os juvenis foram contados. O ensaio foi composto por seis tratamentos, com três repetições para cada tratamento.

### 2.5 Análise estatística

No teste de toxidade crônica os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade de erro.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Solo utilizado

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

Os solos contaminados com as diferentes doses de cobre foram enviados para determinação química no Laboratório de análise de solos da UFSM.

### 3.2 Teste de Toxicidade Aguda

No teste de toxicidade aguda foi avaliada a biomassa média das minhocas expostas ao solo contaminado com diferentes doses de cobre. Durante os 21 dias de ensaio não foram observados nenhuma mortalidade.

No primeiro dia não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as minhocas expostas aos solos contaminados e o controle. Com o passar dos dias, houve uma tendência de aumento na biomassa das minhocas *Eisenia andrei* até a dose de 140 mg.Kg<sup>-1</sup> Cu. Este resultado apresenta similaridade com os ensaios de Svendsen & Weeks (1997), onde foi possível verificar que nas concentrações de cobre de até 80 mg/Kg-1 não foi observado inibição no crescimento médio de minhocas *E. andrei*. No entanto nos ensaios realizados com *Eisenia andrei* em laboratório de Maboeta & Fouché (2014), apenas minhocas expostas ao solo sem adição de cobre apresentaram aumento significativo de biomassa, enquanto que as minhocas presentes em concentrações de 39,17 mg.Kg<sup>-1</sup> de Cu, aos sete dias de exposição, já apresentaram redução na biomassa. As possíveis razões das variações na dose de cobre que causam toxicidade as minhocas relatada por diferentes autores pode ser em função da espécie utilizada no teste, no tempo de contato e nas características de cada solo (MABOETA & FOUCHÉ, 2014). As propriedades do solo exercem grandes influências sobre a absorção e toxicidade dos metais pesados para as minhocas, pois características físico-químicas, tais como pH, teor de argila, porcentagem de matéria orgânica, influenciam diretamente no comportamento e na biodisponibilidade do cobre (SPADOTTO et al., 2004). Como os testes foram conduzidos em solos coletados a campo, os resultados da toxicidade do cobre nas minhocas é ambientalmente mais realista do que estudos de toxicidade realizado com solo artificial.

As minhocas são consideradas acumuladoras eficazes de metal do solo, levando ao armazenamento ou excreção dos íons a partir de seus tecidos (LUKKARI et al., 2005). Estes apresentam a capacidade de redistribuir os metais em seu corpo, especialmente o cobre, metal essencial, levando o equilíbrio entre a absorção e excreção (HOPKINS, 1989). No entanto em altas concentrações ocorre um desequilíbrio entre absorção e excreção, causando toxicidade ao organismo. Esta toxicidade pode ser observada nas minhocas expostas ao solo contaminado com a dose de 175 mg.Kg<sup>-1</sup> de Cu, que apresentaram uma significativa redução média na biomassa em relação as demais doses a partir dos quatorze dias de exposição, seguindo até os vinte um dias, final do ensaio. Este resultado esta de acordo com os ensaios de Svendsen & Weeks (1997), onde verificaram que nas concentrações mais elevadas de cobre no solo (160 e 320 mg.Kg<sup>-1</sup>) as minhocas *Eisenia andrei* começaram a perder peso corporal. Aos vinte um dias de exposição as minhocas presentes no solo contaminado com a dose de 140 mg.Kg<sup>-1</sup>Cu apresentaram menor peso corporal em relação as demais minhocas presentes nas diferentes doses, exceto a dose de 175 mg.Kg<sup>-1</sup> que apresentou redução acentuada na biomassa. Este resultado apresenta similaridade com os ensaios de Maboeta et al. (2004), onde se verificou que na concentração de 121,37 mg.Kg<sup>-1</sup> a minhoca *E. fetida* apresentou redução média em sua biomassa. Segundo Heckmann et al. (2010), o perigo de toxicidade pode aumentar com o tempo de exposição.

Apesar dos solos apresentarem diferentes características físicas que influenciam na disponibilidade dos metais, os testes ecotoxicológicos fornecem informações sobre quais concentrações de metais que causam redução na população de minhocas (NAHMANI et al., 2007). As alterações na

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

biomassa são consideradas parâmetros mais sensíveis do que a sobrevivência (MABOETA et al., 2004), pois em testes de toxicidade aguda onde é avaliada a concentração de cobre que causa letalidade em 50% dos indivíduos expostos (CL50), Lukkari et al. (2005) encontrou valores de 249 mg.Kg<sup>-1</sup> Cu para *Aporrectodea tuberculata*; Honeycutt et al. (1995) relataram para *Lumbricus rubellus*, CL50 519 mg.Kg<sup>-1</sup>; Neuhauser et al. (1985) encontraram valores de CL50 643 mg.Kg<sup>-1</sup> para *Eisenia fetida*. Estas doses de cobre que causam letalidade são maiores que as doses onde já é possível observar redução na biomassa das minhocas. Populações de minhocas com histórico de exposição a solos contaminados com metais a longos períodos de tempo são menos influenciadas em altos teores de metais do que minhocas recém expostas (LUKKARI et al., 2005). Ao final do experimento as minhocas presentes no solo controle, sem adição de cobre, apresentaram um incremento de biomassa no valor de 48,17% em relação ao início do ensaio, já nas doses de 35, 70, 105 e 140 mg.Kg<sup>-1</sup> o incremento foi de 59,21; 63,16; 39,51 e 29,27%, respectivamente. No controle, solo sem adição de cobre, o incremento de biomassa foi menor que nas doses de 35 e 70 mg.Kg<sup>-1</sup> Cu, esse menor incremento pode ser explicado pela deficiência desse oligoelemento essencial, com papel importante no transporte de substâncias em células e tecidos. Resultado semelhante foi relatado nos ensaios de Lukkari et al. (2005), onde se observou uma redução na biomassa das minhocas no controle, em decorrência de uma deficiência do metal.

Durante os 21 dias do teste de toxicidade aguda as minhocas *E. andrei* foram alimentadas regularmente, uma vez por semana, com 5g de esterco bovino. Portanto, a redução na biomassa das minhocas pode ser utilizada como critério de validação do teste, pois nas doses mais altas de cobre foi observado perda de peso significativa indicando efeito subletal. A longo prazo, estes efeitos subletais podem levar a redução na densidade populacional de minhocas *E. andrei*.

### 3.3 Teste de Toxicidade Crônica

O sucesso reprodutivo foi avaliado através da contagem do número de casulos e juvenis e do peso dos casulos após os 56 dias do teste. Não foram observadas diferenças significativas entre o número médio de casulos produzido pelas minhocas expostas nas doses de 35; 70 e 105 mg.Kg<sup>-1</sup> de cobre em relação ao controle natural. Porém nos solos contaminados com as maiores doses de cobre, 140 e 175 mg.Kg<sup>-1</sup> foi verificada uma redução significativa na produção de casulos.

Estudos anteriores apresentaram similaridade com o resultado atual, indicando a ocorrência de redução na produção de casulos na dose de 159 mg.Kg<sup>-1</sup> Cu (SPURGEON & HOPKIN, 1996). No entanto outros estudos indicaram que em doses similares de cobre, 119 mg.Kg<sup>-1</sup> (LUKKARI et al., 2005) e 160 mg.Kg<sup>-1</sup> (SVENDSEN & WEEKS, 1997) as minhocas *Aporrectodea tuberculata* e *Eisenia andrei* não produziram casulos. As possíveis causas para redução na produção de casulos se deve ao gasto de energia disponibilizado pela minhoca para resistir ao contaminante, através da remoção (DONKER et al., 1993). Esta exigência de energia adicional vai reduzir a energia disponível para o crescimento, diferenciação e produção de casulo (DONKER et al., 1993). Além do que as minhocas expostas a solos contaminados podem apresentar retardo na maturação sexual e por consequência uma redução na produção de casulos (SPURGEON & HOPKIN, 1996).

A produção de casulos é o parâmetro avaliado com maior sensibilidade em testes ecotoxicológicos, pois apresenta redução na produção média em concentrações crescentes do metal (MABOETA & FOUCHÉ, 2014). No entanto, em alguns testes foi observado que em concentrações mais baixas de metais no solo, a produção foi maior, embora a viabilidade do casulo tenha sido alterada (PHILIPS & BOLGER, 1998). No estudo atual, apenas efeitos negativos foram

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

observados nas doses mais altas em relação a produção de casulos. Este resultado indica que as maiores doses de cobre utilizadas no teste interferiram negativamente nos parâmetros reprodutivos das minhocas *E. andrei*, devido a maior presença do metal pesado que pode interferir na produção de gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário (REINACKE et al., 2001). Além disso, a redução na taxa de crescimento, como observado no teste de toxicidade aguda, ocorrido nas maiores doses de cobre, tem influência nos parâmetros reprodutivos da minhoca, ocasionando atraso na maturação (KLOK & DE ROSS, 1996).

O número de juvenis foi dependente do número de casulos produzidos, refletindo o mesmo padrão em relação as doses de cobre tal como descrito para os casulos. Não foi observado, no entanto, nenhum efeito significativo ( $p > 0,05$ ) no sucesso de eclosão (número de juvenis/número de casulos) e no peso médio dos casulos das diferentes doses de cobre. No presente estudo verificou-se que a biomassa e a reprodução podem servir de parâmetros sensíveis de toxicidade do cobre em minhocas *Eisenia andrei*.

#### 4. CONCLUSÃO

- As minhocas *Eisenia andrei* expostas a dose de 175 mg.Kg<sup>-1</sup> cobre, apresentaram redução média na biomassa a partir dos 14 dias de exposição seguindo até o final do ensaio. Aos 21 dias, as minhocas presentes na dose de 140 mg.Kg<sup>-1</sup> cobre, apresentaram redução significativa na biomassa em relação as demais doses.

- Em relação aos parâmetros reprodutivos, as minhocas expostas as doses de 140 e 175 mg.Kg<sup>-1</sup> cobre apresentaram redução na produção de casulos. Desta forma deve-se considerar que o uso intensivo de agrotóxicos a base de cobre e suas cargas crescentes no solo podem resultar em potenciais riscos ecológicos para a macrofauna terrestre.

#### REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: Ed. Rima, p. 322, 2003.
- BROWN, G. G. & DOMINGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – O 3º Encontro Latino Americano de Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). Acta Zool. Mexicana, v. 2, p. 1-18, 2010.
- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. Mar Pollut Bull, v.44, n.1, p.7-15. 2002.
- DONKER, M. H.; VAN CAPELLEVEEN, H. E.; VAN STRAALLEN, N. M. Metal contamination affects size–structure and life history dynamics in isopod field populations. In Ecotoxicology of Metals in Invertebrates (R. Dallinger and P. S. Rainbow, Eds.), pp. 383–399. Lewis Pub., Chelsea, MI.1993.
- HECKMANN, L.H.; BAAS, J.; JAGER, T. Time is of the essence. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 29, p. 1396-1398, 2010.
- HONEYCUTT, M. E.; ROBERTS, B. L.; ROANE, D. S. Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicol. Environ, v.30, p. 143-150, 1995.
- HOPKIN, S. P. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science, p. 366, 1989.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

- KHALIL, M. A.; ABDEL-LATEIF, H. M.; BAYOUMI, B.M.; VAN STRAALEN, N. M.; VAN GESTEL, C.A.M. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Pedobiologia*, v. 40, p. 548-556, 1996.
- KLOK, C. & A. M. de ROOS. Population level consequences of toxicological influences on individual growth and reproduction in *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae, Oligochaeta). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 33, p. 118 – 127, 1996.
- LUKKARI, T.; AATSINKI, M.; VAISANEN, A.; HAIMI, J. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology*, v. 30, p. 133-146, 2005.
- MA, W. Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. *Ecological Bulletins*, v. 39, p. 53-56, 1988.
- MABOETA, M.; FOUCHÉ, T. Utilizing an Earthworm Bioassay (*Eisenia andrei*) to Assess a South African Soil Screening Value with Regards to Effects from a Copper Manufacturing Industry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 93, n. 3, p. 322-326, 2014.
- MABOETA, M.S.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia Fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxochloride. *Environmental Research*, v. 96, p. 95-101, 2004.
- MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; GIROTTO, E.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DE CONTI, L.; TRENTIN, G. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant and Soil*, v. 374, p. 593-610, 2014.
- NAHMANI, J.; HODSON., BLACK, S. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution*, v.149, p. 44-58, 2007.
- NEUHAUSER, E. F.; LOEHR, R. C.; MILLIGAN, D. L.; MALECKI, M. R. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 1, p. 149-152, 1985.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guia para testes Químicos, OECD 207. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.
- PHILLIPS, D. R.; BOLGER, T. Sublethal toxic effects of aluminium on the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*, v. 42, p. 125–130, 1998.
- REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A.; MABOETA, M. S. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. *Pedobiologia*, v. 45, p. 61-68, 2001.
- SIEKIERSKA, E; URBANSKA-JASIK, D. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). *Environ Pollut.*, v. 120, p. 289-297, 2002.
- SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, Documentos No. 42. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2004.
- SPURGEON, D. J & HOPKIN, S. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 35, p. 86-95, 1996.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

SPURGEON, D. J. & HOPKIN, S. P. The Development of Genetically Inherited Resistance to Zinc in Laboratory-selected Generations of the Earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, v. 109, p.193-201, 2000.

SVENDSEN, C. & WEEKS, J. M. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory stud with *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 36, p. 72–79, 1997.

#### 5. Agradecimentos

Este trabalho teve apoio da CAPES, IniCie UERGS e UFSM.