OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Cintia Carla Niva
George Gardner Brown
Editores Técnicos

Ecotoxicologia Terrestre

Métodos e Aplicações dos Ensaios com Oligoquetas

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Ecotoxicologia Terrestre

Métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas

Cintia Carla Niva
George Gardner Brown
Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2019

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição
Embrapa Florestas

Comitê Local de Publicações da
Embrapa Florestas

Presidente
Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente
José Elidney Pinto Júnior

Secretário-Executivo
Neide Makiko Furukawa

Membros
Cristiane Aparecida Fioravante Reis, *Krisle da Silva*, *Marilice Cordeiro Garrastazu*, *Valderês Aparecida de Sousa*, *Annete Bonnet*, *Álvaro Figueredo dos Santos*, *Guilherme Schnell e Schühli*, *Marcelo Francia Arco-Verde*

Supervisão editorial e Revisão de texto
José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica
Francisca Rasche

Projeto gráfico e editoração eletrônica
Neide Makiko Furukawa

Capa
Fabiano Bastos

Fotos da capa
Marie Luise Carolina Bartz

1ª edição
Publicação digital (2019)

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Florestas

Niva, Cintia Carla.
Ecotoxicologia terrestre : métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas / Cintia Carla Niva, George Gardner Brown, editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2019.
258 p. : il. color. ; 21,5 cm X 28,0 cm

ISBN 978-85-7035-939-1

1. Toxicologia. 2. Ecologia. 3. Fauna do solo. 4. Ecossistema. 5. Fauna edáfica. 6. Oligochaeta. 7. Legislação ambiental. 8. Bioacumulação. Brown, George Gardner. II. Título. III. Embrapa Florestas.

CDD (21. ed.) 631.46

Francisca Rasche (CRB 9/1204)

© Embrapa, 2019

Autores

Alexandre Martin Martines
Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, diretor da Martines Consultoria e Projetos, Rolândia, PR

Amarildo Pasini
Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências Biológicas, professor da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

Ana Paula Maccari
Zootecnista, bacharel em Zootecnia, mestranda na Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC

Andressa Cristhy Buch
Engenheira-agrônoma, mestre em Ciências do Solo, pós-doutoranda na Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ

Cintia Carla Niva
Bióloga, doutora em Molecular Science/Ciências (Fisiologia Geral), pesquisadora da Embrapa Cerrados, Brasília, DF

Cristina Lúcia Silveira Sisinno
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, doutora em Ciências, coordenadora de projetos na Solotox Consultoria e BfU do Brasil Serviços Ambientais, Rio de Janeiro, RJ

Dilmar Baretta
Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, professor associado da Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC

Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, professora sênior na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP

George Gardner Brown
Agrônomo, doutor em Ecologia, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR

Gustavo Schiedeck
Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Jorge Domínguez Martín

Biólogo, doutor em Biologia, professor da Universidade de Vigo, Vigo, Espanha

Jörg Römbke

Biólogo, doutor em Biologia, diretor da ECT Oekotoxikologie, Florsheim, Alemanha

José Paulo Sousa

Biólogo, doutor em Biologia, professor da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Juan Pereira Colonese

Engenheiro Ambiental, mestre em Engenharia Civil, pesquisador do Centro de Pesquisas de Energia Elétrica, Rio de Janeiro, RJ

Julia Carina Niemeyer

Bióloga, doutora em Ecologia, professora da Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, SC

Julia Corá Segat

Zootecnista, doutora em Ciência do Solo, professora da Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC

Katy Boniza Cantelli

Bióloga, mestre em Ciência do Solo, Marilândia do Sul, PR

Klaus Dieter Sautter

Engenheiro-agrônomo, doutor em Engenharia Florestal, professor do Centro Universitário Campos de Andrade, Curitiba, PR

Luís Carlos Iuñes Oliveira Filho

Engenheiro-agrônomo, doutor em Manejo do Solo, professor substituto da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Mara Mercedes de Andréa

Bióloga, doutora em Tecnologia Nuclear, pesquisadora aposentada do do Instituto Biológico, São Paulo, SP

Maria Edna Tenório Nunes

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências da Engenharia Ambiental, pesquisadora autônoma associada ao NEEA/CRHEA/ EESC na Universidade de São Paulo, São Carlos, SP

Marie Luise Carolina Bartz

Bióloga, doutora em Agronomia, professora da Universidade Positivo, Curitiba, PR

Paulo Roger Lopes Alves

Engenheiro-agrônomo, mestre em Agronomia, professor da Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, SC

Ricardo Gonçalves Cesar

Geógrafo, doutor em Geoquímica, professor adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

Silvia Gonçalves Egler

Bióloga, mestre em Ecologia, pesquisadora do Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro, RJ

Apresentação

Embora a problemática ambiental estudada pela Ecotoxicologia nos remeta a uma viagem no tempo que coincide com o início da estruturação da sociedade em cidades, a Ecotoxicologia como ciência ganhou força somente a partir da década de 1970. Por outro lado, a subárea destinada ao estudo dos problemas decorrentes da contaminação no compartimento terrestre (Ecotoxicologia Terrestre) começou a escrever seus primeiros capítulos somente da década de 1990 e se intensificou no Brasil somente nos primeiros anos do novo milênio.

Pelo fato de o solo ter estreita relação com o homem, a partir de atividades agrícolas, mineração ou uso em espaços urbanos, os estudos ecotoxicológicos com organismos edáficos têm chamado atenção de órgãos de regulação ambiental como alternativa de estimar os impactos reais de atividades potencialmente poluidoras sobre os organismos do solo e, por conseguinte, nos processos ecológicos envolvidos com esta biota.

Dentre essa biota, os oligoquetas - minhocas e enquitreídeos- possuem posição de destaque e tem sido comumente utilizados como organismos sentinela representativos desta comunidade edáfica. Embora tenhamos um número razoável de normas e protocolos publicados por diferentes agências padronizadoras para estimar os efeitos de poluentes sobre estes organismos, existe uma carência notável em obras que se aprofundem neste tema além de fornecer uma receita detalhada de como conduzir os ensaios de ecotoxicidade.

Neste sentido, sem sombra de dúvidas, esta obra é um marco que congrega discussões sobre o uso de oligoquetas como modelos para investigação de Ecotoxicologia Terrestre e dá a amplitude das inquietações e rumos que esta área da ciência deve tomar nos próximos anos.

Como pesquisador na área de Ecotoxicologia Terrestre, me sinto orgulhoso em ver, nesta obra, os frutos dos trabalhos realizados no Brasil neste tema. A expectativa é que este livro dará não somente orientações para os pesquisadores que atuam na área, como também servirá de guia para as gerações futuras de ecotoxicologistas terrestres.

Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior
Presidente da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia

Prefácio

A proteção dos ecossistemas pode, muitas vezes, entrar em conflito com a necessidade de se assegurar a produção de alimentos, fibras, energia e outros produtos essenciais à sobrevivência da sociedade no mundo atual. No entanto, a ciência gera conhecimentos que podem ser aplicados a fim de que essa proteção ocorra concomitantemente ao uso e manejo dos ecossistemas. Os estudos ecotoxicológicos auxiliam a sociedade a usufruir dos recursos naturais de forma racional. Estes estudos podem indicar, por exemplo, a dose ambientalmente segura de qualquer composto, químico ou mesmo de origem biológica, utilizado no controle de pragas e doenças. Por outro lado, também podem indicar o quanto um determinado compartimento do ecossistema pode estar comprometido em áreas com suspeita de contaminação. Os estudos ecotoxicológicos também podem auxiliar no monitoramento da qualidade do solo, da água e do ar. A preocupação com a proteção da qualidade da água é mais antiga, mas estudos em ecotoxicologia terrestre tem ganhado força no Brasil devido à crescente conscientização sobre a necessidade de se usar os recursos naturais de forma sustentável.

O compartimento solo é de suma importância para a produção agropecuária, a silvicultura, a mineração e outras atividades industriais e urbanas. Muito do que é utilizado pelo homem nessas atividades deposita-se no solo direta ou indiretamente, de forma voluntária ou não, antes mesmo de atingir o ecossistema aquático. O solo é o habitat de um quarto da biodiversidade mundial e estes seres vivos, muitas vezes invisíveis ou ignorados pelo homem, são provedores de importantes serviços ecossistêmicos. Entre os habitantes do solo mais conhecidos mundialmente estão as minhocas, por simbolizarem a fertilidade e a vida no solo. A subclasse Oligochaeta, o grupo taxonômico ao qual pertencem as minhocas, apresenta tamanhos corporais que variam desde animais quase microscópicos, como os enquitreídeos, até os gigantes, como os minhocuçus. Esses invertebrados do solo são também sensíveis a alterações no seu habitat e têm sido utilizados como organismos-teste e indicadores da qualidade do solo mundialmente.

Vários grupos de pesquisa no Brasil, especialmente de universidades e institutos de pesquisa, preocupados com a qualidade do solo e a manutenção de sua funcionalidade ecossistêmica, iniciaram estudos de avaliação da contaminação do solo, especialmente a partir do ano

2000. Representantes desses grupos se reuniram, pela primeira vez, em 2011, no “Workshop Ecotoxicologia com Oligoquetas: Métodos, práticas e importância”, em Curitiba, PR. O evento contou com a participação de mais de 20 profissionais entre pesquisadores, professores e estudantes atuantes na área de ecotoxicologia terrestre, entre brasileiros e estrangeiros, a maioria deles colaboradores do projeto da Embrapa “Adaptação de ensaios ecotoxicológicos para avaliação da contaminação do solo usando oligoquetas” (2009-2012). Em vista da necessidade de alinhamento das metodologias utilizadas em ensaios para avaliações ecotoxicológicas no Brasil, o workshop possibilitou o compartilhamento de experiências e discussões de problemas em comum e suas soluções, e o início da elaboração do livro Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas.

O presente livro é fruto da dedicação conjunta de 25 autores de 19 instituições brasileiras e duas estrangeiras e foi organizado de forma a dar um panorama geral sobre a importância e o porquê da ecotoxicologia terrestre na primeira parte, onde os primeiros três capítulos abordam os fundamentos da ecotoxicologia terrestre e da utilização de organismos edáficos nos ensaios ecotoxicológicos internacionalmente (capítulo 1), a história e a aplicação de estudos ecotoxicológicos utilizando oligoquetas no Brasil, juntamente com o enfoque normativo e regulamentador no país (capítulos 2 e 3). A segunda parte do livro (capítulos 4 a 18), destina-se aos métodos, onde os ensaios ecotoxicológicos para avaliação do efeito sobre a letalidade, reprodução, fuga e bioacumulação em minhocas e enquitreídeos são descritos detalhadamente, com base em metodologias padronizadas internacionalmente e experiências dos autores com as adaptações necessárias para as condições brasileiras, conforme discutidas no workshop. O capítulo 17 é uma contribuição dos colaboradores estrangeiros experientes Jörg Römbke (ECT, Alemanha) e José Paulo Sousa (Universidade de Coimbra, Portugal), com vistas para avanços tecnológicos, descrevendo métodos importantes com abordagem de semi-campo e campo ainda pouco aplicados no Brasil.

O livro tem o intuito de oferecer aos leitores da área acadêmica, de pesquisa, de prestação de serviços ou de órgãos reguladores, uma base conceitual e metodológica de como realizar estudos ecotoxicológicos com oligoquetas. Esse livro não é um manual completo de ecotoxicologia terrestre, pois ainda existem outros organismos já utilizados que são tão relevantes ecologicamente quanto as minhocas e enquitreídeos, como por exemplo, os colêmbolos, isópodos, ácaros, microorganismos e plantas. Também não tem a pretensão de ser a “bíblia” da ecotoxicologia com oligoquetas, pois a ciência não para e as neces-

sidades humanas, a exploração de recursos naturais e a conservação do meio ambiente evoluem. Sempre haverá necessidade de atualizar, aprimorar e reinventar, para que a os métodos ecotoxicológicos sejam adequados às novas realidades.

Esperamos que a nossa contribuição sirva como base para estimular a aplicação, desenvolvimento e avanços de metodologias cada vez mais eficientes e práticas para a avaliação e monitoramento da qualidade do solo, avaliação de risco ambiental e em tomadas de decisão em gestão ambiental no país.

Claramente, um trabalho como esse nunca seria possível sem o apoio de diversas pessoas e instituições, dentre as quais queremos destacar de forma especial a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), e particularmente a Embrapa Florestas e Embrapa Cerrados, que acolheram a ideia e apoiaram os dois editores desse livro, e também financiaram diversos projetos relacionados à ecotoxicologia terrestre, incluindo o que gerou esse livro. Também queremos agradecer o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que financiou e continua financiando diversos projetos de pesquisa e bolsistas que contribuíram para a elaboração deste livro, e que proporcionou uma bolsa de PNPD à Cintia Niva por cinco anos (2008-2013), que inspirou a produção deste livro. Para a realização do workshop em Curitiba, recebeu-se apoio da Universidade Positivo, da Fundação Agrisus, da Embrapa, e do CNPq, a quem expressamos nossa profunda gratidão. Agradecemos também as contribuições, muitas vezes não adequadamente reconhecidas, de diversos colegas ao longo dos anos para a pesquisa em ecotoxicologia terrestre, como Marcos Garcia (Embrapa Amazonia Ocidental), Elizabeth Correia (Embrapa Agrobiologia) (e muitos outros que fariam essa lista ficar muito longa); à Angela Melechenko pelo auxílio com o capítulo de fuga; à Francisca Rasche (Embrapa Florestas) pela ajuda com a bibliografia; à Neide Furukawa (Embrapa Florestas) pelo esmero e dedicação na diagramação do livro; ao Wellington Cavalcanti (Embrapa Cerrados) pela confecção de ilustrações; ao Fabiano Bastos (Embrapa Cerrados) pela composição da capa; e ao Danilo Lourenço de Sousa e à Clara Wandenkolck Silva Aragão (ambos do Ibama) pelo apoio e esclarecimentos sobre questões de regulamentação ambiental. Finalmente, também agradecemos às nossas famílias pelo apoio incondicional ao longo de vários anos, e em particular, durante a realização desse livro.

Cintia Carla Niva
George Gardner Brown
Editores Técnicos

Sumário

Parte 1 Fundamentos da ecotoxicologia terrestre

Capítulo 1 Ecotoxicologia terrestre com ênfase na fauna edáfica 23

1.1 Fundamentos da ecotoxicologia 24

1.2 Ensaios ecotoxicológicos 27

1.2.1 Letalidade 27

1.2.2 Crescimento 27

1.2.3 Reprodução 27

1.2.4 Comportamento ou fuga 27

1.3 Organismos edáficos usados em ensaios ecotoxicológicos 28

1.3.1 Collembola 29

1.3.2 Isopoda 29

1.3.3 Acari 30

1.3.4 Diplopoda 30

1.4 Fatores que podem influenciar os ensaios ecotoxicológicos 31

1.5 Padronização de ensaios ecotoxicológicos 32

1.6 Padronização de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas (ISO) 33

1.6.1 Padronização do ensaio de reprodução com enquitreídeos da ISO 34

1.7 Perspectivas 35

Referências 36

Capítulo 2 Importância e aplicações dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas 45

2.1 Introdução 45

2.2 Ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas no Brasil 49

2.3 Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas para fins normativos e legais 56

2.3.1 Registro de agrotóxicos 56

2.3.2 Classificação de resíduos sólidos 57

2.3.3 Avaliação de risco ambiental em áreas contaminadas 57

2.4 Desafios para o avanço da ecotoxicologia terrestre no Brasil 58

Referências 59

Capítulo 3 Ecotoxicologia terrestre e os instrumentos normativos e regulamentadores no Brasil 71

3.1 Legislação ambiental no Brasil e o controle da poluição do solo 71

3.2 Ecotoxicologia terrestre no Brasil: Normas Técnicas 73

Referências 76

Parte 2 Métodos de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas

Capítulo 4 Criação e manutenção dos organismos 81

4.1 *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* 82

4.1.1 Características gerais e identificação 82

4.1.2 Obtenção de matrizes, aclimatação e sincronização da população de *E. andrei* e *E. fetida* 85

4.1.3 Aspectos gerais da criação de *Eisenia andrei* e *E. fetida* 88

4.2 *Eudrilus eugeniae* 95

4.2.1 Características gerais e identificação 95

4.2.2 Criação e manutenção de *E. eugeniae* 97

4.3 *Perionyx excavatus* 99

4.3.1 Características gerais e identificação 99

4.3.2 Criação e manutenção de *P. excavatus* 101

4.4 *Pontoscolex corethrurus* 102

4.4.1 Características gerais e identificação 102

4.4.2 Criação e manutenção de *P. corethrurus* 105

4.5 *Amynthas gracilis* 108
4.5.1 Características gerais e identificação 108
4.5.2 Criação e manutenção de *A. gracilis* 111

4.6 Enquitreídeos 112
4.6.1 *Enchytraeus crypticus* 113
4.6.2 *Enchytraeus albidus* 113
4.6.3 Enquitreídeos fragmentadores 113
4.6.4 Métodos de criação 115

Referências 119

Capítulo 5 Coleta de oligoquetas no campo e seu preparo para ensaios ecotoxicológicos 133

5.1 Coleta e preparo de minhocas 133

5.2 Coleta e preparo de enquitreídeos 135

Referências 137

Capítulo 6 Ensaio de adaptação das minhocas aos solos naturais ou ao SAT 139

6.1 Ensaio rápido de aceitação ou rejeição de solo natural ou SAT 140

6.2 Ensaio de aceitação ou rejeição de SAT ou solo natural 140

Referências 141

Capítulo 7 Preparo do substrato teste 143

7.1 Solo artificial 144

7.2 Solos de áreas contaminadas 145

7.3 Solos naturais padrão não contaminados 146

7.4 Determinação da capacidade de retenção de água (CRA) 147

7.5 Determinação do pH 148

7.6 Defaunação do solo 149

Referências 149

Capítulo 8 Aplicação da substância teste 153

8.1 Substâncias solúveis em água 153

8.2 Substâncias insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos 154

8.3 Substâncias insolúveis em água ou solventes orgânicos .. 154

8.4 Considerações relativas a ensaios com agrotóxicos que simulem situações reais das práticas agrícolas 155

Referências 157

Capítulo 9 Ambiente do ensaio 159

9.1 Temperatura 159

9.2 Iluminação 159

Referências 160

Capítulo 10 Dados de ecotoxicidade e desenho experimental 163

10.1 Ensaios de letalidade e reprodução 164

10.2 Ensaio de fuga 165

Referências 165

Capítulo 11 Ensaios de letalidade 167

11.1 Princípio do ensaio de letalidade 168

11.2 Ensaio de letalidade com minhocas 168

11.2.1 *Eisenia andrei* e *E. fetida* 168

11.2.2 Outras espécies de minhocas 169

11.2.3 Recipientes-teste e equipamentos 169

11.2.4 Preparo do solo ou substrato-teste 170

11.2.5 Ensaio preliminar de letalidade de minhocas 171

11.2.6 Ensaio definitivo de letalidade de minhocas 171
11.2.7 Substância de referência 172
11.2.8 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de letalidade de minhocas 173
11.2.9 Validação do ensaio de letalidade de minhocas 174

11.3 Ensaio de letalidade com *Enchytraeus* sp..... 175
11.3.1 Organismo-teste 175
11.3.2 Recipientes-teste e equipamentos..... 176
11.3.3 Preparo do solo- ou substrato-teste..... 176
11.3.4 Ensaio preliminar de letalidade de *Enchytraeus* sp. 176
11.3.5 Ensaio definitivo de *Enchytraeus* sp. 177
11.3.6 Substância de referência 178
11.3.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de letalidade com enquitreídeos 178
11.3.8 Validação do ensaio de letalidade de *Enchytraeus* sp..... 179

11.4 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de letalidade 179

Referências 180

Capítulo 12 Ensaios de reprodução (ecotoxicidade crônica) com oligoquetas 183

12.1 Princípio do ensaio de reprodução 184

12.2 Ensaio de reprodução de minhocas 184
12.2.1 Organismo-teste 184
12.2.2 Recipientes-teste e equipamentos..... 185
12.2.3 Preparo do solo- ou substrato-teste..... 185
12.2.4 Ensaio preliminar de reprodução de minhocas..... 185
12.2.5 Ensaio definitivo de reprodução de minhocas 185
12.2.6 Substância de referência 187
12.2.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de reprodução de minhocas 188
12.2.8 Validação do ensaio 189

12.3 Ensaio de reprodução de *Enchytraeus* sp..... 190
12.3.1 Organismo-teste (ver seção 11.3.1)..... 190
12.3.2 Recipientes-teste e equipamentos (ver seção 11.3.2)..... 190

12.3.3 Ensaio preliminar de reprodução de *Enchytraeus* sp. 190
12.3.4 Ensaio definitivo de reprodução de *Enchytraeus* sp. 190
12.3.6 Método de fixação, coloração e contagem de *Enchytraeus* sp. 191
12.3.7 Substância de referência 191
12.3.8 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de reprodução de *Enchytraeus* sp. 192
12.3.9 Validação do ensaio de reprodução *Enchytraeus* sp. 194
12.4 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de reprodução 195
Referências 196

Capítulo 13 Ensaio de comportamento de fuga 199
13.1 Princípio do ensaio de fuga 199
13.2 Organismos-teste 200
13.2.1 *Eisenia fetida* ou *E. andrei* 200
13.2.2 Outras espécies de minhocas 201
13.3 Recipientes-teste e equipamentos 201
13.4 Montagem do ensaio de fuga 203
13.5 Ensaio preliminar do ensaio de fuga de minhocas 204
13.6 Ensaio definitivo do ensaio de fuga de minhocas 204
13.7 Substância de referência 204
13.8 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de fuga de minhocas 204
13.9 Validação do ensaio de fuga de minhocas 206
13.10 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de fuga 206
Referências 207

Capítulo 14 Análise estatística dos resultados de ensaios de ecotoxicidade 209
14.1 Aspectos importantes na análise de dados 209

14.2 Cálculos nos ensaios de letalidade 211
14.3 Cálculos nos ensaios de reprodução 211
14.4 Cálculos nos ensaios de fuga..... 212
Referências 214

Capítulo 15 Bioacumulação..... 215
15.1 Princípio do ensaio de bioacumulação 215
15.2 Organismos-teste 219
15.2.1 *E. andrei* ou *E. fetida* 219
15.2.2 Espécies de Enchytraeidae 219
15.3 Recipientes-teste e equipamentos 219
15.4 Preparo do conteúdo dos recipientes-testes..... 220
15.5 Ensaio preliminar de bioacumulação 221
15.6 Ensaio definitivo de bioacumulação 221
15.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de bioacumulação..... 222
15.8 Validação do ensaio de bioacumulação..... 224
15.9 Cálculos dos fatores de bioacumulação e de bioacumulação solo-biota 225
15.10 Cálculos dos parâmetros de absorção e eliminação, e da cinética do fator de bioacumulação 226
Referências 227

Capítulo 16 Descarte de substratos e organismos..... 229
Referências 229

Capítulo 17 Métodos para ensaios ecotoxicológicos em níveis hierárquicos avançados: abordagens de semi-campo e campo..... 231
17.1 Introdução..... 231

17.2 Abordagem de semi-campo 232
17.2.1 Classificação dos métodos existentes 232
17.2.2 Apresentação dos métodos de semi-campo 234
17.2.3 Avaliação de métodos de semi-campo 238
17.3 Abordagens de campo: ensaios prospectivos de compostos químicos 240
17.4 Abordagens de campo: monitoramento retrospectivo 242
17.5 Método funcional adequado para todos os níveis de ensaio (especialmente para aqueles em níveis hierárquicos superiores – *higher tiers*) 243
Referências 245
Capítulo 18 Elaboração de relatórios sobre ensaios com oligoquetas 253
Referências 258

Foto: Jorge Dominguez

Parte 1

Fundamentos da ecotoxicologia terrestre

Ecotoxicologia terrestre com ênfase na fauna edáfica

1

Dilmar Baretta
Julia Corá Segat
Luís Carlos Iuñes Oliveira Filho
Ana Paula Maccari
José Paulo Sousa
Jörg Römbke

A redução dos impactos ambientais certamente apresenta-se como um dos maiores desafios a serem enfrentados no século 21. A preocupação com a contaminação ambiental aumentou significativamente nos últimos anos em virtude da grande quantidade de substâncias tóxicas que vem sendo lançadas no ambiente (Lima, 2010).

De acordo com Guimarães (2009) e Schirmer (2010) o crescimento populacional favorece inevitavelmente a expansão da cadeia produtiva em função do maior consumo de produtos agrícolas e industrializados, elevando consideravelmente a quantidade de resíduos produzidos pelo homem. Esse aumento vem ocasionando diversos problemas, por sua inserção nos diferentes ecossistemas e com consequentes efeitos indesejados sobre os organismos vivos, inclusive o ser humano (Lima et al., 2007).

A degradação do solo pela intervenção antrópica é preocupante e a necessidade de sua proteção, assim como da biodiversidade de organismos nele inseridas têm tornado o foco principal de políticas ambientais no mundo todo (Nunes, 2010). Segundo Odum e Barrett (2008), para cada metro quadrado da superfície terrestre, estão disponíveis nos escoadouros, reguladores e recicladores em torno de mil metros cúbicos de atmosfera, quase 10 mil metros cúbicos de oceano e grandes volumes de vegetação permanente. O que não quer dizer que estes compartimentos (atmosfera, recursos hídricos, solo e vegetação) devam ser utilizados para descarte ou degradados para depois serem tomadas medidas de recuperação.

Nesse contexto, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de buscar ferramentas que possibilitem avaliar a qualidade do ambiente, antecipar o desenvolvimento de situações que possam conduzir a contaminações ambientais danosas à saúde humana e aos ecossistemas, minimizando assim os impactos advindos da intervenção antrópica e do manejo inadequado do solo para produção de alimentos.

Segundo Barros et al. (2010) o interesse pela avaliação da qualidade do solo vem crescendo com a consciência de que se trata de um componente extremamente importante da biosfera, não só relacionado à produção de alimentos, mas também sustentação da qualidade ambiental.

A qualidade do solo pode ser definida como a capacidade de funcionamento do solo dentro do ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde vegetal e animal (Doran; Parkin, 1994), para que o solo possa providenciar os serviços do ecossistema de uma forma sustentável e continuada. O conhecimento sobre a qualidade do solo é muito importante para o entendimento dos processos que ocorrem nele, e também na água e no ar, sendo os atributos edáficos determinantes na elaboração de estratégias de manejo e recuperação de áreas degradadas.

Brussaard et al. (2007) relatam que os indicadores biológicos tendem a ser mais sensíveis e, portanto, respondem de maneira mais rápida quando comparados aos parâmetros físicos e químicos, dessa forma, tem sido utilizados com maior freqüência para indicar a qualidade do solo. O uso de parâmetros biológicos é fundamental no monitoramento de impactos positivos e negativos, como no caso de descarte de resíduos industriais e agrícolas no solo (Peixoto; Rosado, 2008). Como muitos representantes da fauna edáfica apresentam alta diversidade e rápida capacidade de reprodução, são excelentes bioindicadores e sua estrutura ou funções indicam e determinam a qualidade ou o nível de degradação do solo (Knoepp et al., 2000). Por estes motivos, as comunidades de organismos edáficos podem ser utilizadas para avaliar a qualidade do solo, particularmente da função de habitat do solo (Römbke; Breure, 2005).

O uso de ensaios ecotoxicológicos constitui uma importante ferramenta na avaliação de como substâncias lançadas no ecossistema podem afetar diferentes organismos e populações, fornecendo subsídios para avaliar a qualidade de corpos receptores e proteger adequadamente a qualidade ambiental.

1.1 Fundamentos da ecotoxicologia

A ecotoxicologia terrestre consiste na obtenção de dados para as matrizes contaminadas (exemplo: solos) através da realização de ensaios em laboratório e/ou in situ, usando espécies padrões ou autóctones e a caracterização do risco derivado dessa contaminação (Van Straalen, 2002; Weeks et al., 2004; Jensen; Mesman, 2006; André et al., 2009). Nesta perspectiva, dois tipos de avaliações que implicam em duas estratégias distintas em termos de ensaios podem ser realizadas (Filser et al., 2008):

1. Avaliação prospectiva, que implica a estimativa a priori do risco potencial de substâncias químicas (exemplo: matrizes poluentes, lodos e rejeitos, entre outros) nos organismos. Neste caso os ensaios são realizados com solo artificial (SAT) ou natural que são contaminados em laboratório utilizando várias concentrações.
2. Avaliação retrospectiva, que implica na avaliação do risco potencial de solos naturais já contaminados, quando comparados com locais ou solos de referência não contaminados, como forma de programar medidas de gerenciamento para remediação desses locais. Neste caso, os ensaios são

realizados com o solo suspeito de contaminação e esta avaliação pode ser complementada com uma avaliação ecológica mais detalhada em campo.

Segundo Niemeyer et al. (2007) os ensaios de ecotoxicidade incorporam a interação entre os contaminantes e as propriedades do solo e os efeitos resultantes da mistura destes contaminantes e, ainda, o efeito da biodisponibilidade, permitindo a avaliação ecologicamente relevante dos efeitos derivados da exposição. Sendo assim, tais estudos auxiliam o estabelecimento de limites permissíveis de diversas substâncias químicas e a avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e aos corpos receptores (Römbke et al., 2006).

As atividades antrópicas inserem diversas substâncias xenobióticas nos ecossistemas, sejam elas: agrotóxicos, fertilizantes agrícolas, metais, derivados de petróleo e outros subprodutos oriundos de processos industriais. Grandes parcelas desses compostos atingem o meio ambiente via aplicação ou descarga direta ou, ainda, de maneira indireta por volatilização, percolação e dispersão, expondo e comprometendo a saúde dos organismos ali presentes, assim como do próprio ambiente (Andréa, 2010).

O solo quando contaminado é normalmente caracterizado pela presença de uma mistura complexa de agentes químicos e muitas das atividades humanas causam ou agravam esse problema ambiental (Haimi, 2000). Atualmente, a contaminação é considerada um dos principais problemas ambientais, podendo apresentar uma alta variedade de fontes de contaminação. Associada a esta constatação, verifica-se a inexistência de mecanismos de monitoramento/gerenciamento que façam um diagnóstico preciso e confiável dessa contaminação, bem como a previsão de impactos que alterem a sustentabilidade do ambiente (Silveira et al., 2009).

Uma vez identificada a complexidade da contaminação torna-se necessário desenvolver medidas para proceder à caracterização e avaliação dos riscos. O monitoramento contínuo de solo e de águas subterrâneas e superficiais deve ser realizado a fim de garantir que os impactos ambientais sejam minimizados.

Nesse sentido, a ecotoxicologia tem evoluído como ciência e se destacado como uma importante ferramenta na avaliação de risco ambiental. Seu objetivo é a proteção dos ecossistemas frente aos impactos provocados por substâncias tóxicas, uma vez que os estudos ecotoxicológicos avaliam as condições ambientais e monitoram suas tendências ao longo do tempo, predizem os efeitos dos agentes tóxicos e orientam a seleção de práticas de remediação (ISO, 2001).

De acordo com Lombardi (2004) e Magalhães e Ferrão-Filho (2008), estes ensaios permitem avaliar a contaminação ambiental e o resultado de seus efeitos sinérgicos e antagônicos das diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos, agrotóxicos, lodos de esgotos, resíduos e rejeitos da mineração, resíduos da indústria de papel e celulose, de cervejaria, dejetos de animais, poluentes orgânicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, metais, entre outros. Sendo assim, os estudos ecotoxicológicos representam um instrumento para obtenção de dados

qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de químicos e outros tóxicos aos organismos, permitindo avaliar o nível de impacto a que um dado ambiente está submetido (Rosa, 2008) e monitorar o sucesso da recuperação de solos contaminados (Fountain; Hopkin, 2005).

Segundo Sisinno et al. (2006), os efeitos da toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema são verificados por meio dos ensaios ecotoxicológicos. Os ensaios de ecotoxicidade têm como intuito determinar a relação dose-efeito e/ou dose-resposta, ou seja, a relação da concentração de uma ou mais substâncias em um determinado meio e seus efeitos nos organismos vivos (Lima, 2009).

Os ensaios de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (ecotoxicidade aguda ou crônica), o modo de ação (mortalidade, crescimento ou reprodução) ou o efeito de resposta (letal ou subletal) (Kapanen; Itaväara, 2001). Os ensaios são realizados expondo-se os organismos-teste a um solo contaminado, objetivando-se avaliar o efeito da contaminação na sobrevivência, crescimento, reprodução, mudanças comportamentais, dentre outros fatores. Estes ensaios podem ajudar a verificar se as concentrações de contaminantes em um determinado meio são altas o suficiente para causar efeitos adversos em organismos (Lima, 2009). Além disso, fornecem medidas diretas da biodisponibilidade dos poluentes ou agentes tóxicos, podendo auxiliar no estabelecimento das ligações entre a contaminação local e os efeitos ecológicos adversos (Linfhurst et al., 1995).

Ensaios de ecotoxicidade aguda ou crônica são designados para determinar a curto ou longo prazo respectivamente, os efeitos da exposição aos contaminantes, tendo uma grande variedade, incluindo crescimento, letalidade e reprodução. Ensaios de ecotoxicidade aguda avaliam respostas rápidas dadas pelo organismo e representam alterações ocorridas imediatamente após a aplicação da substância no ambiente, além de avaliar a letalidade ou a imobilidade dos organismos-teste, sendo que tais efeitos se manifestam, em geral, num período de 0 a 96 horas. Já nos ensaios de efeito crônico, o efeito da exposição contínua ao agente tóxico presente no ambiente em doses subletais durante um longo período de tempo é avaliado sobre os organismos-teste, observando-se mudanças no metabolismo, morfológicas, crescimento, reprodução, mutações genéticas e até mesmo morte dos organismos-teste. De acordo com Magalhães e Ferrão-Filho (2008) esses ensaios podem ter um período de duração de um ciclo da vida até a totalidade da vida dos indivíduos. De maneira geral, são observados efeitos subletais que permitem a sobrevivência, mas afetam uma ou mais funções biológicas, como inibição do crescimento, reprodução e alterações morfológicas.

Para avaliar a toxicidade de químicos ou de solo contaminado vários ensaios ecotoxicológicos têm sido propostos. No entanto, no presente capitulo, serão abordados apenas os ensaios de crescimento, comportamento, letalidade e reprodução.

1.2 Ensaios ecotoxicológicos

1.2.1 Letalidade

Os ensaios para avaliação de letalidade (ensaios de ecotoxicidade aguda) são conduzidos com exposição dos organismos-teste a solos com a presença de contaminante e ao solo-referência, os quais, após período de tempo determinado para cada espécie, são quantificados os sobreviventes em cada situação de contaminação. O tempo demandado para esses ensaios é comparativamente menor do que os ensaios de ecotoxicidade crônica. No entanto, devido à sua baixa sensibilidade, estes ensaios não são tão requeridos em diversas áreas, principalmente no registro de produtos veterinários na União Européia (Vich, 2004).

1.2.2 Crescimento

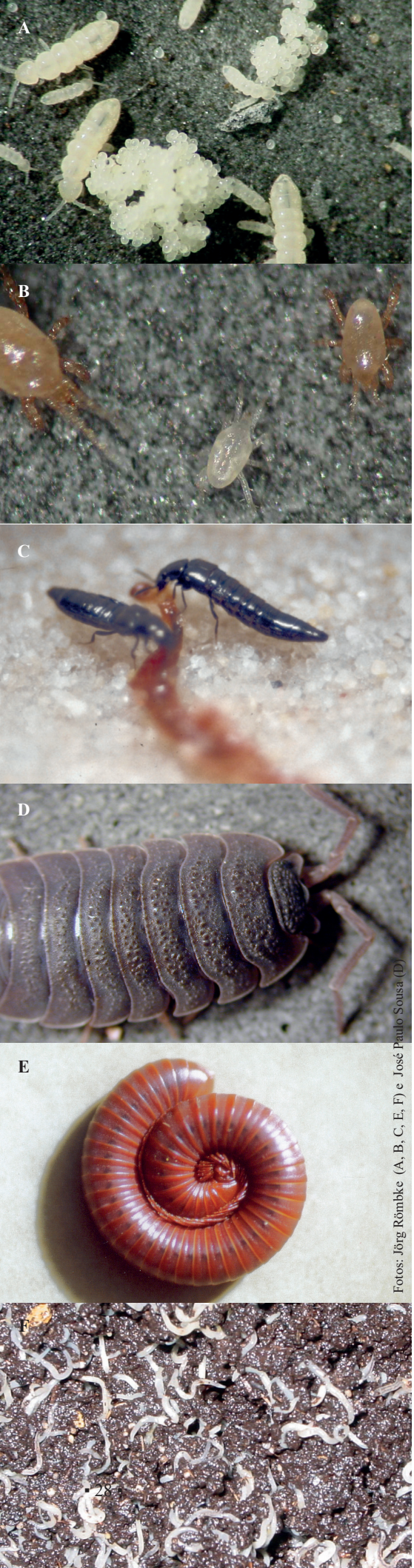
A taxa de crescimento dos invertebrados pode ser um parâmetro mensurável útil em ensaios ecotoxicológicos e para alguns organismos pode ser um parâmetro mais estável do que a reprodução (Folker-Hansen et al., 1996). A taxa de alimentação dos isópodos da espécie *Porcellio scaber* Latreille, 1804 e *Oniscus asellus* Linnæus, 1758 é um parâmetro cuja mensuração é relativamente rápida e está diretamente relacionada à taxa de crescimento, a qual também tem sido utilizada em ensaios ecotoxicológicos (Drobne, 1997). Em oligoquetas, alterações na biomassa também são avaliadas durante os ensaios de ecotoxicidade crônica (reprodução) de minhocas como parâmetro ecotoxicológico.

1.2.3 Reprodução

O ensaio de reprodução consiste na exposição dos indivíduos a solos contaminados e solo controle, durante todo o período de reprodução (diferente para cada espécie), ao final do qual, o número de indivíduos que são gerados nesse período é contabilizado (Lima, 2009). O ensaio de reprodução demanda maior tempo até o seu final, entretanto, a reprodução e sobrevivência são as duas principais forças por trás das mudanças demográficas da população, sendo uma estimação confiável dos efeitos dos poluentes e geralmente essencial para projeções dos efeitos ao nível da população.

1.2.4 Comportamento ou fuga

A habilidade dos organismos em detectar e evitar solos contaminados indica um estresse potencial do solo (Hund-Rinke; Wiechering, 2001). O ensaio de fuga (*avoidance test*) nada mais é do que a exposição simultânea dos organismos a um solo contaminado e um solo referência (não contaminado) lado a lado onde se realiza a contagem dos indivíduos que estão em cada solo após



Fotos: Jörg Römbke (A, B, C, E, F) e José Paulo Sousa (D)

um período de tempo pré-definido, geralmente dois dias. Determina-se, dessa forma, se os organismos evitaram, rejeitaram ou fugiram de um dos dois tipos de solo. Além disso, a sensibilidade desse ensaio, a relação dose-resposta e rapidez, fazem deste ensaio uma ferramenta para a avaliação inicial (fase de varredura) de locais contaminados (Natal-Da-Luz et al., 2004; Niemeyer et al., 2010).

Conforme Yeardley Junior et al. (1996), Slimak (1997), Hund-Rinke e Wiechering (2001), Garcia et al. (2008) e Brown e Dominguez (2010) ensaios de fuga baseados na resposta comportamental de minhocas têm sido propostos como uma alternativa rápida para avaliação de solos contaminados, inclusive em baixas concentrações do produto. No entanto, é importante destacar que algumas espécies demonstraram não possuir um comportamento sensível a algumas substâncias químicas como, por exemplo, o enquitreídeo *Enchytraeus albidus* Henley, 1837 (Amorim et al., 2008).

1.3 Organismos edáficos usados em ensaios ecotoxicológicos

A abundância e diversidade dos organismos edáficos são parâmetros amplamente usados para avaliar o impacto ambiental de uma variedade de poluentes do solo. Esses grupos podem ser expostos aos contaminantes por contato e/ou por ingestão direta de partículas e água do solo (Sheppard; Evenden, 1994; Fountain; Hopkin, 2005) em uma bateria de ensaios que examinam parâmetros de vida, bioacumulação e/ou comportamento (Fountain; Hopkin, 2005).

Para avaliação de solos, as minhocas *Eisenia andrei* Bouché, 1972, e *E. fetida* Savigny, 1826, enquitreídeos dos gêneros *Enchytraeus* e *Cognettia* (Römbke, 2003) e os colêmbolos *Folsomia candida* Willem, 1902 (Figura 1.1) têm sido os grupos mais utilizados por causa de sua fácil adaptação em laboratório e tempo de geração relativamente curto em salas com temperatura controlada (Fountain; Hopkin, 2005). Porém, existem vários outros organismos que podem ser utilizados, tais como: plantas, microrganismos, nematóides, ácaros Oribatida e Gamasida (Figura 1.1B), coleópteros Staphylinidae (Figura 1.1C), isópodos (Figura 1.D), milípedes (Figura 1.1E) e centopéias (Van Straalen; Van Gestel, 1993; Van Gestel; Van Straalen, 1994; Løkke; Van Gestel, 1998; Cortet et al., 1999). Vantagens e desvantagens de ensaios com invertebrados padronizados e não padronizados são discutidos no capítulo de livro publicado por Alves e Cardoso (2016) e em Alves et al. (2017).

Figura 1.1. Exemplos de organismos de solo utilizados em ensaios ecotoxicológicos. A) colêmbolos *F. candida* com ovos; B) diferentes estágios de vida do ácaro *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884); C) coleópteros estafilinídeos *Aleochara bilineata* Gyllenhal, 1810 (Coleoptera); D) isópodo *Porcellio* sp.; E) diplópode *Trigoniulus corallinus* (Gervais, 1847); F) enquitreídeos *E. albidus*.

Os ensaios com oligoquetas (minhocas e enquitreídeos - Figura 1.1F) serão detalhados na segunda parte desse livro (capítulos 4 a 16). Assim, este capítulo foca, de uma forma breve, apenas os ensaios com outros grupos de organismos.

1.3.1 Collembola

Os colêmbolos (Figura 1.1A) são pequenos artrópodes, ápteros, encontrados em todo o mundo (Bellinger et al., 2010). Esse grupo tem sido considerado e usado como importante bioindicador da qualidade dos solos por responder as diversas modificações que ocorrem no ambiente, podendo ser alterações químicas, como o pH (Baretta et al., 2008), alterações na estrutura e microclima (Pflug; Wolters, 2001), modificando a freqüência e a diversidade de espécies de acordo com a quantidade e qualidade de serapilheira disponível (Chagnon et al., 2000; Baretta et al., 2008).

A espécie *F. candida* (Figura 1.1A) é familiar entre os ecotoxicologistas para avaliar a toxicidade de novas substâncias químicas antes de serem liberadas no mercado (Hopkin, 2002), em função do papel funcional que os mesmos desempenham no solo. Todavia, outras espécies podem ser utilizadas nos ensaios como: *F. fimetaria* (Linæus, 1758), *Isotoma viridis* Bourlet, 1839, *Onychiurus armatus* (Tullberg, 1869), *Proisotoma minuta* (Tullberg, 1861) (Buch et al., 2016), *Protaphorura quadriocellata* Gisin, 1947, *Orchesella cincta* (Linæus, 1758) e *Tullbergia granulata* Mills, 1934 (Kapanen; Itävaara, 2001). Assim, a utilização de ensaios de reprodução e de fuga com colêmbolos é uma prática muito utilizada, devido à sensibilidade e facilidade de criação desta espécie em laboratório (Riepert, 1995).

A espécie *F. candida* tem sido utilizada em ensaios de fuga para avaliação de solos contaminados e de matrizes contaminadas (Natal-da-Luz et al., 2004, 2009; Niemeyer et al., 2010), usando as diretrizes estabelecidas pela pela ISO 11267 (ISO, 1999a) para os testes de letalidade e reprodução e a ISO 11268-2 (ISO, 1998) para testes de fuga. Detalhes sobre a metodologia dos ensaios com colêmbolos e as adaptações para o clima tropical podem ser encontrados no livro de Oliveira Filho et al. (2018).

1.3.2 Isopoda

A ocorrência de espécies de isópodes (Figura 1.1D) e o número de indivíduos têm sido usados como indicadores da qualidade de paisagens naturais e antropizadas (Correia et al., 2008), e a ausência local de suas populações pode indicar que a contaminação atingiu níveis críticos (Quadros, 2010). Devido à sua capacidade de tolerar níveis altos de metais (Hassall et al., 2005; Quadros, 2010), esse grupo tem sido amplamente utilizado como modelo para estudos de ecotoxicologia e bioacumulação, mostrando-se um organismo chave para o monitoramento ambiental (Hassall et al., 2005).

Grande parte das espécies de isópodes é reproduzida em laboratório, mas têm um longo ciclo de vida (1-3 anos), sendo difícil em pouco tempo obter um grande número de indivíduos. Algumas espécies são bastante utilizadas em ensaios, como *P. scaber* (Drobne, 1997), *O. asellus*, *Philoscia muscorum* (Scopoli, 1763) e *Trichoniscus pusillus* Brandt, 1833 (Van Brummelen et al., 1996; Van Gestel; Van Straalen, 1994). Entretanto, recentemente, a espécie *Porcellionides pruinosus* (Santos, 2003; Loureiro et al., 2005, 2009; Jänsch et al., 2005) e *Cubaris murina* Brandt, 1833, têm sido usadas nos ensaios ecotoxicológicos em ambiente tropical (Niemeyer et al., 2006: Da Silva-Júnior et al., 2013). Detalhes sobre a metodologia dos ensaios com isópodes e as adaptações para o clima tropical podem ser encontrados no livro de Oliveira Filho et al. (2018).

1.3.3 Acari

Ácaros oribatideos compreendem centenas de espécies, porém poucas têm sido usadas em experimentos de laboratório, destacando-se os ensaios realizados com *Platynothrus peltifer* (Koch, 1839) (Van Gestel; Doornekamp, 1998) e a espécie tropical *Archegozetes longisetosus* Aoki, 1965 (Seniczak; Seniczak, 2002). Os parâmetros estudados são letalidade, reprodução e produção de ovos, porém o ensaio é trabalhoso e demorado, cerca de 9-12 semanas. A espécie *P. peltifer* demonstra ser resistente em relação à letalidade contra metais, como cádmio, cobre e chumbo, mas muito sensível em relação à produção de ovos (Van Gestel; Van Straalen, 1994; Van Gestel; Doornekamp, 1998). O ensaio com o ácaro predador *H. aculeifer* é descrito por Alves; Cardoso (2016) e suas vatagens e desvantagens discutidas. Um ensaio com a espécie boreal *Oppia nitens* Koch, 1836 também foi desenvolvido no Canadá (Princz, 2010).

1.3.4 Diplopoda

Diplopoda é outro grupo importante de invertebrados do solo (Fig 1.1E), porém somente alguns ensaios ecotoxicológicos têm sido desenvolvidos, destacando-se os ensaios envolvendo espécies como: *Brachydesmus superus* Latzel, 1884, *Cylindroiulus britannicus* (Verhoeff, 1891) e *Glomeris marginata* (Villers, 1789) (Van Gestel; Van Straalen, 1994; Tajovski, 1998). No Brasil, Fontanetti et al. (2012) estudou a espécie *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 na avaliação da toxicidade de lodo de esgoto e Buch et al. (2018) avaliaram a preferência de *T. corallinus* a diferentes fontes de alimento em solos contaminados com mercúrio.

1.4 Fatores que podem influenciar os ensaios ecotoxicológicos

De acordo com Barahora et al. (2005) os resultados dos ensaios de ecotoxicidade podem ser influenciados por diversos fatores bióticos e abióticos. No entanto, a utilização de normas ou procedimentos de ensaios padronizados minimiza a variabilidade dos resultados elevando sua precisão. Dentre os fatores bióticos capazes de influenciar os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com organismos do solo, cabe mencionar aqueles relacionados ao estágio de vida, tamanho e idade dos organismos-teste (Lima, 2009).

Quanto aos fatores abióticos, alguns destes são de fácil controle, como temperatura (20-25 ± 2 °C, dependendo do organismo-teste), pelo uso de câmaras ou salas climatizadas e pH preferencialmente em torno de 6,0 para ensaios com solos artificiais, de acordo com a norma ISO específica para cada organismo-teste. Outros fatores abióticos, cujas características intrínsecas do solo não se pode controlar e que influenciam nos ensaios são matéria orgânica, óxidos de ferro, capacidade de troca de cátions e textura, pois influenciam na disponibilidade de nutrientes, metais e pesticidas, dentre outros. As diferenças na ecotoxicidade de metais podem ser determinadas pelo pH e conteúdo de matéria orgânica ou capacidade de troca de cátions (Lock; Janssen, 2001).

Desse modo, torna-se importante conhecer as características pedológicas do solo (ver capítulos 6 e 7), pois podem ocasionar algum fator de estresse aos organismos, que não aqueles relacionados ao contaminante, confundindo ou influenciando a resposta do ensaio.

De acordo com Natal-da-Luz et al. (2008) as espécies de minhocas mais utilizadas nos ensaios (*E. fetida* e *E. andrei*) apresentam uma tendência a evitar solos com textura fina e solos com baixo conteúdo de matéria orgânica, podendo influenciar na resposta de fuga quando comparado a solos com diferentes propriedades. Chelinho et al. (2011) encontraram maior sensibilidade de *E. andrei* quando submetidas a modificações nas propriedades do solo como pH, matéria orgânica, textura - areia grossa, areia fina, silte, argila, N total, capacidade de retenção de água e capacidade de troca de cátions.

Chelinho et al. (2011) relataram que a reprodução de enquitreídeos da espécie *E. crypticus* foi sensível a diferentes propriedades do solo, mas não a ponto de prejudicar o atendimento dos critérios de validade do ensaio. Contudo, a resposta de fuga para enquitreídeos foi altamente variável, sendo encontrados efeitos significativos para textura e pH do solo.

A umidade tem influência no suprimento de oxigênio, por exemplo, limitando o suprimento de oxigênio devido à umidade excessiva do solo. Como a demanda dos organismos em relação à umidade e suprimento de oxigênio diferem, a otimização da umidade depende do organismo. Para ensaios com minhocas é mais apropriada uma umidade em torno de 60% da capacidade máxima de retenção de água, pois sua superfície é bastante sensível à dessecação. Além disso, as espécies de minhocas padrões (*E. andrei*, *E.*

fetida) usadas nos ensaios ecotoxicológicos são adaptadas à alta umidade (Eisentraeger et al., 2005).

1.5 Padronização de ensaios ecotoxicológicos

Em nível internacional, diversas organizações são responsáveis pela padronização de ensaios ecotoxicológicos. A Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) em Paris (França) é responsável pela padronização de ensaios voltados para uma avaliação prospectiva, enquanto a International Organization for Standardization (ISO) em Genebra (Suíça) composta por diversas organizações nacionais de padronização, como a Deutsches Institut für Normung (DIN) na Alemanha, Association Française de Normalisation (AFNOR) na França e Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) no Brasil, que está responsável pela padronização de ensaios vocacionados para uma avaliação de risco retrospectiva. Já o Comitê Europeu de Padronização (CEN) em Bruxelas, Bélgica, cobre uma área de ensaios específicos para o ensaio de toxicidade de resíduos. E ainda, a Environment Canada no Canadá, e American Society for Testing and Materials (ASTM) nos United States of America (EUA).

De uma forma geral, todos os ensaios ecotoxicológicos que sejam utilizados para fins regulamentares, devem ser padronizados. Na prática, esta premissa é válida para todos os ensaios laboratoriais. Já nos ensaios de *high-tier* (ensaios de "semi-campo" e campo), devido à sua inerente complexidade (ver capítulo 17), apenas parte dos procedimentos são padronizados. Por exemplo, no caso de um monitoramento de fauna em campo, os procedimentos de coleta e processamento das amostras deverão ser padronizados, enquanto o nível do desenho experimental e apenas algumas indicações deverão ser informatizadas, pois este vai depender de caso para caso e do tipo de estudo.

Além dos ensaios para avaliação de efeitos ecotoxicológicos também ensaios para a avaliação do comportamento dos contaminantes no ambiente, e ainda, os métodos para caracterização de um solo como, por exemplo, pH, textura, entre outros, devem ser padronizados quando são utilizados neste contexto regulamentar. No entanto, a padronização não faz muito sentido para ensaios que são raramente requeridos pelos órgãos ambientais como os ensaios com milípedes. De qualquer modo, a decisão de padronizar novos métodos/ensaios depende fortemente de requisitos legais.

A padronização é considerada importante nos seguintes contextos:

1. Contexto legal: os resultados dos ensaios deverão ser justificáveis e validados, pois o tribunal pode decidir se, por exemplo, um agrotóxico pode ser aceito para utilização num determinado país ou se um local contaminado deverá ser recuperado ou não.

2. Contexto econômico: a comparabilidade dos dados obtidos em laboratórios diferentes e em momentos diferentes deve ser assegurada de forma a evitar a duplicação desnecessária da realização dos ensaios.
3. Contexto científico: as conclusões e extrapolações do laboratório para a realidade em campo devem ser baseadas em dados confiáveis.

Na ISO, o Comitê Técnico (TC) 190 é o responsável pela padronização das normas para solo. Este comitê possui vários subcomitês (SC), entre os quais o SC3 que lida com os métodos biológicos em solo. O trabalho é conduzido em quatro grupos de trabalho (WG) que estão organizados da seguinte forma: WG 1 = Biodegradação, WG 2 = Fauna do Solo, WG 3 = Flora e WG 4 = Microbiologia. Adicionalmente no WG3 do subcomitê SC7 que lida com a proteção do solo, há elementos envolvidos na elaboração de normas sobre desenho experimental e avaliação de dados e estratégias de avaliação ecotoxicológica.

A elaboração de uma norma ISO segue um processo formal por etapas:

1. Desenvolvimento e publicação de um novo método ou ensaio, um artigo científico, uma tese ou uma diretiva nacional.
2. Preparação (já no formato ISO) como um Projeto de trabalho (WD): discussão ao nível do WG seguido pelo voto dos países membros do TC ISO 190.
3. Depois de um voto positivo, aceitação como Novo item de trabalho (NWI): os comentários dos diferentes países membros são incorporados pelo líder de projeto pertencente ao país proponente.
4. Após a incorporação dos comentários, distribuição do documento pelos países membros do TC 190 como Rascunho de Comitê (CD).
5. Após voto positivo dos membros do TC 190, submissão ao gabinete da ISO para exame formal e publicação como Rascunho de Norma Internacional (DIS).
6. A versão final da norma é a Versão Final de Norma Internacional (F-DIS). Todo o processo dura pelo menos cinco anos já que todas as discussões são efetuadas apenas uma vez por ano na reunião anual do TC 190.

1.6 Padronização de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas (ISO)

Na ISO, o primeiro ensaio com oligoquetas a ser padronizado foi o ensaio de ecotoxicidade aguda com minhocas, ISO 11268-1 (ISO, 1993). Este foi praticamente uma cópia do ensaio de ecotoxicidade aguda da OECD 207 (OECD, 1984), e focado na avaliação de efeitos de produtos químicos em solo artificial. Cinco anos mais tarde outro ensaio com minhocas, o ensaio de ecotoxicidade crônica (reprodução), ISO 11268-2 (ISO, 1998) foi padronizado. Neste caso, o método nacional alemão (Biologische Bundesanstalt Für Land Und

Forstwirtschaft, 1994b) para ensaios de agrotóxicos foi adotado pela ISO. O mesmo procedimento ocorreu no ano seguinte com o ensaio de campo com minhocas, ISO 11268-3 (ISO, 1999b), que também é baseado num método alemão desenvolvido pela BBA (Biologische Bundesanstalt Für Land Und Forstwirtschaft, 1994a). Em paralelo, e devido à necessidade crescente por parte da comunidade científica de mais ensaios ecotoxicológicos e também, parcialmente acompanhada por um aumento nas exigências legais, a ISO publicou mais duas normas: ensaio de reprodução com enquitreídeos, ISO 16387 (ISO, 2014) atualizada em 2014 e traduzida pela ABNT em 2012 (ABNT, 2012), e o ensaio de fuga para minhocas, ISO 17512-1 (ISO, 2008), traduzido pela ABNT em 2011 (ABNT, 2011). Ambos os ensaios foram resultantes de projetos científicos realizados principalmente na Alemanha e Canadá.

Todos estes ensaios concentravam-se principalmente na avaliação de substâncias químicas isoladas (não misturas), já que a sua aplicação para avaliação de solos contaminados apenas se encontra descrita em um anexo da ISO. Posteriormente a ISO, em conjunto com a OECD, iniciaram modificações nas normas para a aplicação dos testes para avaliação de substâncias em conjunto (misturas). A descrição detalhada dos procedimentos dos ensaios é relatada nos capítulos da segunda parte desse livro. Num contexto mais generalizado, não apenas para avaliação de contaminação, a ISO padronizou vários métodos descrevendo os procedimentos de amostragem de organismos do solo em campo. Entre estes se encontram os procedimentos de amostragem para minhocas, ISO 23611-1 (ISO, 2006) e enquitreídeos, ISO 23611-3 (ISO, 2007).

1.6.1 Padronização do ensaio de reprodução com enquitreídeos da ISO

Para explicar como a padronização de um ensaio ecotoxicológico com oligoquetas é efetuada na prática, utilizaremos como exemplo o ensaio de reprodução com enquitreídeos (Römbke, 2003). Muito embora a primeira utilização de enquitreídeos em ensaios ecotoxicológicos de laboratório tenha sido documentada há mais de 30 anos (Weuffen, 1968), as normas padronizadas com espécies do gênero *Enchytraeus* (*E. albidus*, *E. crypticus*) foram publicadas muito depois (Römbke; Moser, 2002). Durante esta fase de desenvolvimento, estes organismos foram testados não apenas em solo, mas também em água (Römbke; Knacker, 1989; Achazi et al., 1995) e ágar (Westheide; Bethge-Beilfuss, 1991).

Ensaios utilizando solo como substrato são mais difíceis de se realizar do que aqueles que utilizam água ou ágar, mas estes últimos não são úteis para uma avaliação de produtos químicos no solo ou para a avaliação da qualidade do solo, já que as condições de exposição são muito artificiais. Neste contexto, foi desenvolvido um ensaio laboratorial de ecotoxicidade crônica em solo para avaliação da letalidade e da reprodução destes organismos. Em relação ao desenho experimental (incluindo a utilização de solo artificial) este ensaio

é muito semelhante aos ensaios de reprodução com minhocas ou colêmbolos (ISO 11268-2, 1998; ISO 11267, 1999a), que foram desenvolvidos na mesma época. O ensaio, conhecido como ERT (*Enchytraeid Reproduction Test*), tem sido validado e padronizado nacional e internacionalmente (ASTM, 2000; ISO, 2014; OECD, 2004).

Até relativamente pouco tempo atrás, a maioria dos estudos eram focados na avaliação de toxicidade de substâncias químicas isoladas (sem mistura). No entanto, ensaios com enquitreídeos têm sido utilizados na avaliação de solos contaminados, ou seja, substratos onde há mistura de substâncias (Achazi et al., 1996; Römbke et al., 2000). Para ambas as finalidades, os enquitreídeos possuem várias vantagens, já que o mesmo gênero pode ser utilizado em pesquisa a diferentes níveis (laboratório, semi-campo e campo; Römbke et al., 1994; Moser et al., 2004). Adicionalmente, novas metodologias, como ensaios de bioacumulação foram desenvolvidos com estes organismos (Bruns et al., 2001). No entanto, devido ao hábito alimentar saprotrófico dos enquitreídeos, seu corpo mole, e por pertencerem à mesofauna edáfica, não cobrem todos os cenários potenciais de exposição nem todos os grupos tróficos. Assim, a avaliação ecotoxicológica de químicos individuais ou de solos contaminados deve ser complementada com uma bateria de ensaios incluindo minhocas, colêmbolos e ácaros (Fairbrother et al., 2002).

Um método com um novo organismo teste só é padronizado e se torna norma publicada da ISO após estudos detalhados de sua aplicabilidade em situações diversas e documentados em publicações e depois de passar pelas etapas descritas acima.

1.7 Perspectivas

Os seguintes desafios atuais e futuros estão previstos para a ISO:

1. Aumentar o número de ensaios com espécies-teste de regiões tropicais e regiões polares, preferencialmente não alterando o desempenho básico dos ensaios já padronizados.
2. Promover o desenvolvimento de ensaios ao nível de comunidades para serem utilizados em etapas posteriores nos esquemas e avaliação.
3. Dar clara preferência para parâmetros crônicos e aqueles de sensibilidade semelhante.
4. Inclusão de parâmetros funcionais, como ensaio com “bait-lamina” para medição da atividade alimentar de organismos edáficos.
5. Dar relevância para a elaboração de normas com esquemas elaborados de avaliação, como por exemplo, a abordagem tríade.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 17512-1**: 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.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.

ACHAZI, R. K.; CHROSZCZ, G.; PILZ, B.; ROTHE, B.; STEUDEL, I.; THROL, C. Der Einfluss des pH-Werts und von PCB52 auf Reproduktion und Besiedlungsaktivität von terrestrischen Enchytraeen in PAK-, PCB- und schwermetallbelasteten Rieselfeldböden. **Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie**, v. 26, p. 37-42, 1996.

ACHAZI, R. K.; DÜKER, C.; HENNEKEN, M.; ROTHE, B. Einfluss von anthropogenen Schadstoffen auf terrestrische Invertebraten: 2. Einfluss von BaP, Fla und Cd auf Lebenszyklusparameter von *Enchytraeus crypticus* in Labor-Testsystemen. **Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie**, v. 24, p. 535-540, 1995.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Overview of the standard methods for soil ecotoxicology testing. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Ed.). **Invertebrates**: experimental models in toxicity screening. Rijeka: InTech, 2016, p. 35-56.

ALVES, P. R. L.; NIEMEYER, J. C.; CARDOSO, E. J. B. N. The use of non-standardized invertebrates in soil ecotoxicology. In: LARRAMENDY, M. L. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology**: non-traditional terrestrial models. Londres: Royal Society of Chemistry, 2017. p. 1-30. (Issues in toxicology, 32).

ASTM. American Society for Testing and Materials. **E1676-04**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken, 2000.

AMORIM, M. J. B.; NOVAIS, S.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta): a test organism for a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. **Environmental International**, v. 34, p. 363-371, 2008. DOI: 10.1016/j.envint.2007.08.010.

ANDRÉ, A.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 809, p. 2368-2377, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.03.023.

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoologica Mexicana**, v. 26, p. 97-107, 2010.

BARAHORA, M. L.; LOYO-VEGA, L.; GUERRERO, M.; RAMÍREZ, S.; ROMERO, L.; Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a biorremediation process. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 100-109, 2005. DOI: 10.1002/tox.20083.

BARETTA, D.; FERREIRA, C. S.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2693-2699, 2008. DOI: 10.1590/S0100-06832008000700012.

BARROS, Y. J.; MELO, V. F.; SAUTTER, K. D.; BUSCHLE, B.; OLIVEIRA, E. B.; AZEVEDO, J. C. R.; SOUZA, L. C. P.; KUMMER, L. Indicadores de qualidade de solos de área de mineração e metalurgia de chumbo: II – Mesofauna e plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1413-1426, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000400037.

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. **Checklist of the Collembola of the world**. Belgium: University of Antwerp, 1996-2010. Disponível em: <http://www.collembola.org>. Acesso em: 9 dez. 2010.

BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT FÜR LAND UND FORSTWIRTSCHAFT. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln: auswirkungen von Pflanzenschutzmittel auf Regenwürmer im Freiland. **Braunschweig**, n. 6, v. 2-3, 1994a.

BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT FÜR LAND UND FORSTWIRTSCHAFT. Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren: auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Reproduktion und das Wachstum von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. **Braunschweig**, n. 6, v. 2-2, 1994b.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas - o 3° Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 1-18, 2010.

BRUNS, E.; EGELER, P.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SPOERLEIN, P. Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). **Hydrobiologia**, v. 463, p. 185-197, 2001. DOI: 10.1023/A:1013159810067.

BRUSSAARD, L.; RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 121, n. 3, p. 233-244, 2007. DOI: 10.1016/j.agee.2006.12.013.

BUCH, A. C.; NIEMEYER, J. C.; CORREIA, M. E. F.; SILVA-FILHO, E. V. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: baseline for ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 22-29, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.01.009.

BUCH, A. C.; SISINNO, C. L. S.; CORREIA, M. E. F.; SILVA-FILHO, E. V. Food preferences and ecotoxicological test with millipedes in litter contaminated with mercury. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 1173-1182, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.280.

CHAGNON, M.; HEBERT, C.; PARE, D. Community structures of Collembola in sugar maple forests: relations to humus type and seasonal trends. **Pedobiologia**, v. 44, p. 148-174, 2000. DOI: 10.1078/S0031-4056(04)70035-9.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; ANDRÉS, P.; SOUSA, J. P. Improving ecological risk assessment in the Mediterranean Area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two Oligochaete species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 1050-1058, 2011. DOI: 10.1002/etc.480.

CORREIA, M. E. F.; AQUINO, A. M.; AGUIAR-MENEZES, E. L. **Aspectos ecológicos dos Isopoda terrestres**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 23 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 249).

CORTET, J.; GOMOT, D. E.; VAUFLERY, A.; POINSOT-BALAGUER, N.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European Journal of Soil Biology**, v. 35, n. 3, p. 115-134, 1999. DOI: 10.1016/S1164-5563(00)00116-3.

DA SILVA-JÚNIOR, F. M. R.; GARCIA, E. M.; BAISCH, P.; MIRLEAN, N.; MUCCILLO-BAISCH, A.L. Assessment of a soil with moderate level of contamination using lettuce seed assay and terrestrial isopods assimilation assay. **Soil and Water Research**, v. 8, p. 56-62, 2013.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA, 1994. p. 3-21.

DROBNE, D. Terrestrial isopods: a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1159-1164, 1997. DOI: 10.1002/etc.5620160610.

EISENTRAEGER, A.; HUND-RINKE, K.; RÖEMBKE, J. Assessment of ecotoxicity of contaminated soil using bioassays. In: MARGESIN, R.; SCHINNER, F. (Eds.). **Manual for soil analysis**: monitoring and assessing soil bioremediation. Berlin: Springer-Verlag, 2005. p. 321-359. (Soil biology, 5).

FAIRBROTHER A.; GLAZEBROOK, P. W.; VAN STRAALEN, N. M.; TARAZONA, J. V. (Ed.) **Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils**. Pensacola: SETAC Press, 2002. 97 p.

FILSER, J.; KOEHLER, H.; RUF, A.; RÖMBKE, J.; PRINZING, A.; SCHAEFER, M. Ecological theory meets soil ecotoxicology: challenge and chance. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, p. 346-355, 2008.

FOLKER-HANSEN, P.; HENNING KROGH, P.; HOLMSTRUP, M. Effects of dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 33, p. 207-216, 1996. DOI: 10.1006/eesa.1996.0027.

FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; BOZZATTO ,V.; PEREZ, D. G. Biomonitoring of substrates containing sewage sludge: assessment of the feasibility in using the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, p. 49-54, 2012.

FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): a "Standard" soil arthropod. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 201-22, 2005. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130331.

GARCIA, M.; RÖMBKE. J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behaviour of earthworms in laboratory tests performed under tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 450-456, 2008. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.08.007.

GUIMARÃES R. C. M. **Atributos químicos em solos tratados com lodo biológico de indústria de gelatina**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

HAIMI, J. Decomposer animals and bioremediation of soil. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 233-238, 2000.

HASSAL, M.; ZIMMER, M.; LOUREIRO, S. Questions and possible new directions for research into the biology of terrestrial isopods. **European Journal of Soil Biology**, v. 41, n. 3-4, p. 57-61, 2005. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2005.09.002.

HOPKIN, S. P. Collembola. In: LAL, R. (Ed.). **Encyclopedia of soil science**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 207-210.

HUND-RINKE, K.; WIECHERING, H. Earthworm avoidance test for soil assessment. **Journal for Soils Sediments**, v. 1, p. 15-20, 2001. DOI: 10.1007/BF02986464.

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

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

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 15799**: soil quality: guindance on the ecotoxicologial characterization of soil and soil materials. Geneva, 2001.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 17512-1**: soil quality: avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals: part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneve, 2008.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 23611-3**: soil quality: sampling of soil invertebrates part 3: sampling and soil extraction of enchytraeids. Geneva, 2007.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO23611-1**: soil quality: sampling of soil invertebrates part 1: hand-sorting and formalin extraction of earthworms. Geneva, 2006.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11267**: soil quality: inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneva, 1999a.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-3**: soil quality: effects of pollutants on earthworms: part 3: guidance on the determination of effects in field situations. Geneva, Switzerland, 1999b.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

JÄNSCH, S.; GARCIA, M.; RÖMBKE, J. Acute and chronic isopod testing using tropical *Porcellionides pruinosus* and three model pesticides. **European Journal of Soil Biology**, v. 41, p. 143-152, 2005. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2005.09.010.

JENSEN, J.; MESMAN M. (Ed.). **Ecological risk assessment of contaminated land**: Decision support for site specific investigations. [S.l.], 2006. (RIVM Report, 711701047).

KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 1-16, 2001.

KNOEPP, J. D.; COLEMAN, D. C.; CROSSLEY JUNIOR, D. A.; CLARK, J. S. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. **Forest Ecology and Management**, v. 138, n. 1-3, p. 357-368, 2000. DOI: /10.1016/S0378-1127(00)00424-2.

LIMA, C. A. **Avaliação de risco ambiental como ferramenta para o descomissionamento de uma indústria de metalurgia de zinco**. 2009. 238 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

LIMA, N. C.; NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Avaliação de efeitos dos agrotóxicos clorpirifós e carbofuran e dos metais cádmio, cromo e cobre sobre minhocas *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta), em condições de laboratório In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ECOLOGIA E TAXONOMIA DE OLIGOQUETAS, 3., 2007. **Minhocas como bioindicadoras ambientais**: princípios e práticas: anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. p. 50.

LINFHURST, R. A.; BOURDEAU, P.; TARDIFF, R. C. **Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems**. Chichester: Scientific Committee on Problems of the Environment, 1995. (IPCS joint activity, 23. SCOPE report, 53. SGOMSEC, 10).

LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Test designs to assess the influence of soil characteristics on the toxicity of copper and lead to the oligochaete *Enchytraeus albidus*. **Ecotoxicology**, v. 10, p. 137-144, 2001. DOI: 10.1023/A:1016633725412.

LØKKE, H.; VAN GESTEL, C. A. M. **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Chichester: John Wiley and Sons, 1998. 281 p.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTA, R. M.; LIZAMA, M. A .P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 426 p.

LOUREIRO, S.; AMORIM, M. J. B.; CAMPOS, B.; RODRIGUES, S. M. G.; SOARES, A. M. V. M. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 2, p. 625-636, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.08.010.

LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 121-131, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.02.013.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.

MOSER, T.; VAN GESTEL, C. A. M.; JONES, S. E.; KOOLHAAS, J. E.; RODRIGUES, J. M. L.; RÖMBKE, J. Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME): an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on enchytraeids. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 89-103, 2004.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Avoidance tests with Collembola and early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2188-2193, 2004.

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.

NATAL-DA-LUZ, T.; TIDONA, S; VAN GESTEL, C. A. M.; MORAIS, P. V.; SOUSA, J. P. The use of collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. **Chemosphere**, v. 77, p. 1526-1533, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.056.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA-SANTOS, M.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; RIBEIRO, R.; 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.

NIEMEYER, J. C.; SANTOS, V. C.; RODRIGUES, J. M. L.; DA-SILVA, E. M. Comportamento de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em solo com glifosato: testes de fuga em laboratório. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, p. 13-16, 2006.

NIEMEYER, J. C.; SILVA, E. M.; SOUSA J. P. Desenvolvimento de um esquema para avaliação de risco ecológico em ambientes tropicais: estudo de caso da contaminação por metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 263-267, 2007.

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo**. 2010. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. **Fundamentos de ecologia**. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 612 p.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; SEGAT, J. C.; KLAUBERG-FILHO, O.; BARETTA, D. (Ed.) **Ecotoxicologia terreste**: métodos com Collembola e Isopoda. Florianópolis: UDESC, 2018. 216 p.

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S. Monitoramento de impactos sobre a diversidade microbiana em solos agrícolas. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C.E.R.S. (Ed.). **Microrganismos e agrobiodiversidade**: o novo desafio para a agricultura. Cuiabá: Agrolivros, 2008. p. 507-526.

PFLUG, A.; WOLTERS, V. Influence of drought and litter age on Collembola communities. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, p. 305-308, 2001. DOI: 10.1016/S1164-5563(01)01101-3.

PRINCZ, J. I. Oribatid mites in soil toxicity testing-the use of *Oppia nitens* (C.L. Koch) as a new test species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 971-979, 2010. DOI: 10.1002/etc.98.

QUADROS A. F. Os isópodos terrestres são boas ferramentas para monitorar e restaurar áreas impactadas por metais pesados no Brasil? **Oecologia Australis**, v. 14, p. 569-583, 2010.

RIEPERT, F. First report of the second international ring test on a method for determining the effects of chemicals or soil contaminants on the reproduction of Collembola. **Report of the Biologische bundesanstaltfur Land**, Forstwirtschaft, 1995.

RÖMBKE, J.; BREURE, A. M. Ecological soil quality: classification and assessment. **Toxicologia and Environmental Safety**, v. 62, p. 185-308, 2005.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: a review. **Pedobiologia**, v. 47, p. 607-616, 2003.

RÖMBKE, J.; KNACKER, T. Aquatic toxicity test for enchytraeids. **Hydrobiologia**, v. 180, p. 235-242, 1989. DOI: 10.1007/BF00027556.

RÖMBKE, J.; KNACKER, T.; FÖRSTER, B.; MARCINKOWSKI, A. Comparison of effects of two pesticides on soil organisms in laboratory tests, microcosms and in the field. In: DONKER, M.; EIJSACKERS, H.; HEIMBACH, F. (Ed.). **Ecotoxicology of soil organisms**. Michigan: Lewis, 1994. p. 229-240.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organization and results of an international ring-test. **Chemosphere**, v. 46, p. 1117-1140, 2002.

RÖMBKE, J.; RIEPERT, F.; ACHAZI, R. Enchytraeen als Testorganismen. In: HEIDEN, S.; ERB. R.; DOTT. W.; EISENTRAEGER, A. (Eds.). **Toxikologische Beurteilung von Böden**. Heidelberg: Spektrum Verl, 2000. p. 105-129.

RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P.; SCHOUETEN, T.; RIPERT. F. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 61-64, 2006. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.016.

ROSA, G. A. B. **Estudo dos efeitos do fármaco propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea) com ênfase em efeitos nas populações**. 2008. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, S. A. P. Time-dependent toxicokinetics of [14C] lindane in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 2221-2227, 2003.

SCHIRMER G. K. **Utilização do lodo de esgoto na vermicompostagem e como substrato para a produção de mudas de *Pinus elliottii* Engelm**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SENICZAK, A.; SENICZAK, S. The effect of cadmium on *Archegozetes longisetosus* (Acari, Oribatida) in laboratory conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p. 315-317, 2002.

SHEPPARD, S. C.; EVENDEN, W. G. Simple whole-soil bioassay based on microarthropods. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 95-101, 1994. DOI: 10.1007/BF00197363.

SILVEIRA, A. O.; PLATTE, E. B.; ROESCH, L. F. W.; D'AGOSTINI, R.; SÁ, E. L. S.; CASALINHO, H.; CAMARGO, F. A. O. Processos biológicos como indicadores de qualidade ambiental. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, 2009.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R.; RIZZO, A. C.; MOREIRA, J. C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia foetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, p. 41-44, 2006.

SLIMAK, K. M. Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 713-715, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00027-2.

TAJOVSKI, K. Test on the millipede *Brachydesmus superus* Latzel 1884. In: LØKKE, H.; VAN GESTEL, C. A. M. (Ed.). **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Chichester: John Wiley and Sons. 1998. p. 197-205.

VAN BRUMMELEN, T. C.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A. Long-term toxicity of five polycyclic aromatic hydrocarbons for the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 1199-1210, 1996. DOI: 10.1002/etc.5620150728.

VAN GESTEL, C. A. M.; DOORNEKAMP, A. Tests on the oribatid mite *Platynothrus peltifer*. In: LØKKE, H.; VAN GESTEL, C. A. M. (Ed.). **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Chichester: John Wiley and Sons, 1998. p. 113-130.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN STRAALEN, N. M. Ecotoxicological test systems for terrestrial invertebrates. In: DONKER, M. H.; EIJSACKERS, H.; HEIMBACH, F. (Ed.). **Ecotoxicology of soil organisms**. Boca Ranton: CRC Press, 1994. p. 205-229.

VAN STRAALEN, N. M. Assessment of soil contamination: a functional perspective. **Biodegradation**, v. 13, p. 41-52, 2002. DOI: 10.1023/A:1016398018140.

VAN STRAALEN, N. M.; VAN GESTEL, C. A. M. Soil invertebrates and microorganisms. In: CALOW, P. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 299-325.

VICH. INTERNATIONAL COOPERATION ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. **Environmental impact assessment for veterinary medicinal products phase II guidance**. [s.l.], 2004. (VICH GL 38. Ecotoxicity phase II).

WEEKS, J. M.; SOROKIN, N.; JOHNSON, I. J.; WHITEHOUSE, P.; ASHTON, D.; SPURGEON, D.; HANKARD, P.; SVENDSEN, C.; HART, A. **Biological test methods for assessing contaminated land, stage 2**: a demonstration of the use of a framework for the ecological risk assessment of land contamination. Bristol, UK: Environmental Agency, 2004. (Science Report P5-069/TR1).

WESTHEIDE, W.; BETHGE BEILFUSS, D. The sublethal enchytraeid test system: guideline and some results. In: ESSER, G.; OVERDIECK, D. (Ed.). **Modern ecology**: basic and applied aspects. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 497-508.

WEUFFEN, W. Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und keimwidriger Wirkung. 20. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, [S.I.]: v. 22, p. 127-132, 1968.

YEARDLEY JUNIOR, R. B.; LAZORCHAK, J.; 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.

Importância e aplicações dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas

2

Cristina Lúcia Silveira Sisinno
Julia Carina Niemeyer
Julia Corá Segat
Luís Carlos Iuñes Oliveira Filho
Cintia Carla Niva
George Gardner Brown

2.1 Introdução

Apesar do crescente reconhecimento da aplicação dos ensaios ecotoxicológicos como instrumentos de avaliação e controle da contaminação da água no Brasil, a utilização desses ensaios para avaliação da contaminação do solo ainda é pouco demandada. Entretanto, os ensaios ecotoxicológicos com organismos vivos podem fornecer informações mais precisas e realísticas sobre os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema. Desse modo, apenas por meio desses ensaios pode-se indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes no ambiente e biodisponíveis para os organismos vivos.

Os ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas (mortalidade, reprodução, comportamento de fuga e bioacumulação) têm sido utilizados no Brasil principalmente no setor acadêmico, mas também podem ter aplicações, por exemplo, no setor regulatório de registro de substâncias a serem comercializadas e no setor de licenciamento de atividades com potencial de contaminação para avaliação da qualidade do solo. Além disso, a aplicação dos ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres como ferramenta de avaliação e controle, ainda não é realizada com a mesma frequência com que são requisitados os ensaios com organismos aquáticos, basicamente, por falta de demanda legal e pouco conhecimento, inclusive, dos técnicos dos órgãos ambientais sobre os dados produzidos e sua interpretação.

Os oligoquetas são organismos pertencentes ao Filo Annelida, Sub-classe Oligochaeta. Habitam ambientes terrestres, aquáticos e até marinhos e se caracterizam pelo corpo vermiforme, segmentado e com poucas cerdas. São hermafroditas e a maioria se reproduz por anfimixia ou partenogênese ou autofertilização, produzindo casulos. Menos comuns são alguns pequenos oligoquetas que podem se reproduzir por arquitomia ou paratomia, fragmentando-se e regenerando-se. Os representantes terrestres mais conhecidos no mundo são, sem dúvida, as minhocas, devido à sua importância na fertilidade do solo e ao seu uso como isca de pesca, e por serem facilmente visualizadas a olho nu. Os

enquitreídeos são pequenos oligoquetas da Família Enchytraeidae, bem menos conhecidos que as minhocas, mas de importância também destacável, sendo comuns em muitos solos do mundo inteiro e mais estudados na Europa e na Ásia. Devido ao seu pequeno tamanho, são visualizados a olho nu com dificuldade. Na Figura 2.1 pode-se observar o contraste de tamanho e pigmentação entre uma minhoca e um enquitreídeo. Existem ainda outros oligoquetas como os gigantes minhocuçus e os pequenos naidídeos e tubificídeos (estes últimos geralmente aquáticos), mas atualmente, as minhocas e enquitreídeos têm sido os mais utilizados no contexto da ecotoxicologia terrestre.

As minhocas são as preferidas como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos porque são comuns em uma grande variedade de solos, representando 60% a 80% da biomassa total de animais invertebrados do solo (Fragoso et al., 1999). Elas também constituem um importante grupo da fauna edáfica, cujas atividades no solo podem modificar o seu próprio habitat e criar novos para outros organismos, sendo por isso, consideradas engenheiras do ecossistema (Lavelle et al., 1997). Entre suas atividades, destacam-se o transporte de solo e a formação de galerias que favorecem o aumento da porosidade do solo, e a passagem de ar, nutrientes e água. Seus hábitos alimentares de ingestão de solo e de digestão de materiais orgânicos contribuem para a sua trituração e degradação, com consequente disponibilização de nutrientes para as plantas e estímulo da atividade microbiana no solo (Brown, 1995; Edwards; Bohlen, 1996; Lavelle et al., 1997; Römbke et al., 2005, Brown et al., 2015). Além disso, as minhocas possuem quimiorreceptores no prostômio e estruturas sensoriais na superfície do corpo, que lhes conferem alta sensibilidade a substâncias químicas presentes no solo (Reinecke et al., 2002; Zirbes et al., 2011).

Foto: Cintia Carla Niva

Figura 2.1. A minhoca "louca" *Amynthas gracilis* (Kinberg, 1867) (animal maior) e o enquitreídeo *Fridericia* sp. (animal menor), ambos coletados em Santa Catarina e fixados em formol. *Fridericia* sp. é um enquitreídeo relativamente grande e de fácil visualização mesmo a olho nu (a extremidade anterior dos espécimes encontra-se na porção superior da figura).

Os enquitreídeos (Figura 2.2) são organismos da mesofauna saprófaga do solo, pois contribuem para a segregação e decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes. Eles influenciam a estrutura do solo, mas em menor escala que as minhocas, devido ao seu tamanho corporal reduzido (de poucos milímetros a quatro centímetros de comprimento) em comparação com as minhocas (Jänsch et al., 2005a, 2005b; Niva et al., 2010a). São sensíveis a substâncias químicas e alterações no ambiente (Jänsch et al., 2005a, 2005b), podem ser abundantes em solos onde as minhocas são escassas, e em outros casos também podem atingir altas densidades populacionais em solos habitados por minhocas (Silva et al., 2006; Beylich; Graefe, 2012). Do ponto de vista prático, apenas algumas espécies do gênero *Enchytraeus* foram cultivadas em laboratório até hoje, todas elas apresentando ciclo de vida significativamente mais curto que o da minhoca, o que reduz o tempo de duração dos ensaios (por exemplo, 28 dias versus 56 dias) (ISO, 1998; Meyer et al., 2002; ABNT, 2012). O ensaio com enquitreídeos também gera menos resíduo devido à quantidade reduzida de substrato utilizado (por exemplo, 20 g de substrato por replicata para enquitreídeos versus 500 g ou mais para a minhocas). Por outro lado, devido ao tamanho corporal pequeno, exigem um pouco mais de habilidade e cuidado no seu manuseio.

Os estudos sobre oligoquetas como indicadores ecotoxicológicos ganharam impulso com o surgimento da norma da Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD) (1984) para o ensaio de mortalidade com a minhoca da espécie *Eisenia fetida* em 1984. Desde então, várias revisões sobre o assunto foram publicadas, dentre as quais, Spurgeon et al. (2003) descrevem em detalhes a história da evolução do ensaio ecotoxicológico com minhocas, desde sua origem. Andréa (2010) discute sobre o uso

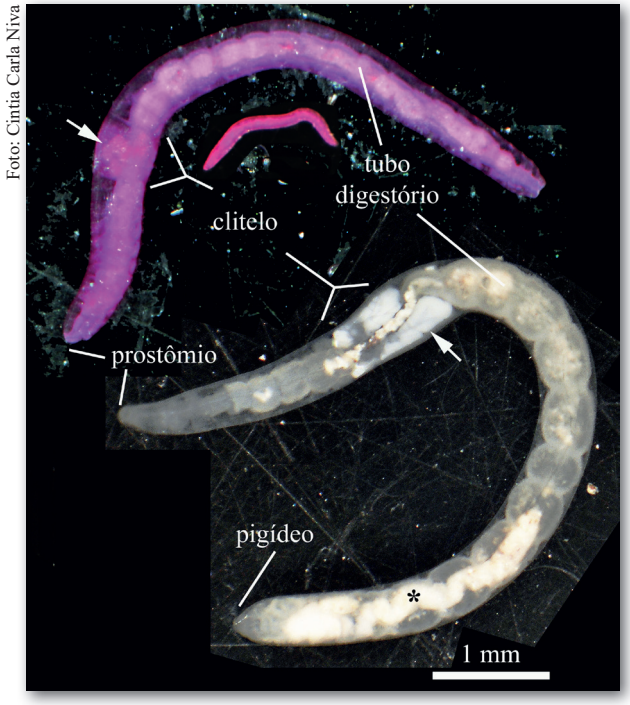


Figura 2.2. *Enchytraeus crypticus* adulto e juvenil fixados e corados com Rosa de Bengala (plano superior) e in vivo (plano inferior). Os espécimes foram fotografados sobre uma lâmina e cobertos por uma lamínula para facilitar a visualização dos órgãos internos. Setas indicam oócitos e asterisco indica conteúdo intestinal.

de minhocas como bioindicadoras da contaminação do solo em estudos de laboratório e campo, chamando a atenção para a bioacumulação e uso de biomarcadores. Didden e Römbke (2001) descrevem a importância dos enquitreídeos como indicadores de estresse químico em ecossistemas terrestres e todos os tipos de contaminantes até então estudados com esses organismos. Römbke et al. (2005) e Jänsch et al. (2005b) apresentam as vantagens da utilização das minhocas e enquitreídeos como indicadores da influência antrópica sobre o solo. Alves e Cardoso (2016) também discutem as vantagens e desvantagens e adaptações tropicais em ensaios ecotoxicológicos com diversos invertebrados, incluindo os oligoquetas. Em um livro, Cesar et al. (2014) apresentam e discutem métodos e estudos de caso na ecotoxicologia de solos em relação à contaminação por metais na região tropical com um olhar geoquímico ambiental.

O ensaio de letalidade ou ecotoxicidade aguda com minhocas das espécies *E. fetida* ou *E. andrei* tem sido o mais utilizado no mundo inteiro em avaliações ecotoxicológicas por ter sido o primeiro ensaio a ser padronizado internacionalmente, e também devido à sua relativa simplicidade (Spurgeon et al., 2003; Jānsch et al., 2005a; Andréa, 2010). Foi idealizado para ser conduzido em laboratório primeiramente em papel de filtro como *screening* da dose letal e depois com solo tratado (OECD, 1984). Alguns exemplos incluem a avaliação dos efeitos de agrotóxicos, como fungicidas (Anton et al., 1990; Römbke et al., 2007), herbicidas (Stojanović et al., 2007; Domínguez et al., 2016), inseticidas (Kula; Larink, 1997; Kolar et al., 2008; Gomez-Eyles et al., 2009), além de metais (Lock; Janssen, 2001; Langdon et al., 2005; Alves et al., 2015a) e outros poluentes ambientais (Vampré et al., 2010; Alves et al., 2015b; Cesar et al., 2015; Segat et al., 2015).

A mortalidade é, sem dúvida, um parâmetro fundamental na determinação da ecotoxicidade de uma substância química, mas algumas dessas substâncias podem não causar esse efeito em curto prazo. Concentrações subletais podem comprometer a saúde da biota exposta por períodos de tempo mais longos, podendo assim acumular a substância química em seu corpo, transferindo o contaminante para os organismos ao longo da cadeia trófica (Andréa, 2010). Desse modo, verifica-se que, para determinação da toxicidade potencial de uma substância química, também é importante a utilização de ensaios que avaliem parâmetros que expressem o efeito de níveis subletais da substância em questão, como por exemplo, os ensaios de reprodução e de fuga. Além disso, a toxicidade de uma substância química depende também da sua biodisponibilidade que, por sua vez, pode ser influenciada pelas propriedades do substrato na natureza, ou substrato-teste nos ensaios (ver seção 1.4). A presença da mistura de diferentes substâncias no solo, o que normalmente ocorre em solos antropizados, também é outro fator que pode influenciar a toxicidade sobre os oligoquetas e outros organismos e dificultar a interpretação dos resultados no caso de estudos com matrizes coletadas de regiões contaminadas. Nesse caso, métodos de semi-campo ou campo descritos no capítulo 17 são os mais indicados.

2.2 Ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas no Brasil

Mundialmente, os ensaios ecotoxicológicos com minhocas usam as espécies padrão *E. andrei* ou *E. fetida*. Essas espécies não são encontradas em solos tropicais agrícolas, nem sobrevivem longo tempo neles, necessitando de matéria orgânica fresca para sobreviverem. Assim como ocorreu em outros países, no Brasil essas espécies foram adotadas como padrão, apesar de não serem representativas da fauna edáfica tropical, e serem encontradas quase exclusivamente em atividades de vermicompostagem (Brown et al., 2006; Sisinno et al., 2006; Andréa, 2010).

A utilização de espécies mais representativas de solos brasileiros ou de regiões tropicais e subtropicais ainda é matéria de estudos, mas poderá contribuir na geração de resultados mais realistas do impacto de contaminantes no ambiente edáfico. As espécies ideais seriam as nativas de clima tropical ou subtropical, preferencialmente aquelas com ampla distribuição nos solos brasileiros, que ingerem grande quantidade de solo, que estejam presentes nos ambientes onde os contaminantes são ou foram utilizados, e que possam ser criadas e mantidas sob cultivo (especialmente em laboratório), ou coletadas facilmente no campo (ver capítulos 4, 5 e 6).

Buch et al. (2011, 2013) descrevem a falta e a necessidade de estudos com espécies nativas do Brasil e Brown e Domínguez (2010) destacam que um dos grandes desafios para o desenvolvimento dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas ainda é a falta de conhecimento sobre a biologia e a ecologia das espécies nativas da América Latina. Talvez por isso, existam poucos dados de ensaios ecotoxicológicos realizados com outras espécies de minhocas de clima tropical e subtropical (Buch, 2013).

Entre as espécies usadas até o momento e que podem ser encontradas no Brasil estão: *Amynthas gracilis*, *Metaphire californica* (Kinberg, 1867), *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857), *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872), *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867), e *Dichogaster annae* (Horst, 1881) (Brown; James, 2007). Contudo, considerando-se a presença e a facilidade de obtenção no país, pode-se recomendar apenas as espécies *A. gracilis*, *P. excavatus*, *E. eugeniae* e *P. corethrurus* (ver seções 4.2 a 4.5). As duas primeiras são de origem asiática e a terceira de origem africana, sendo todas, portanto, exóticas no Brasil. A última espécie, apesar de ser originária da região adjacente às Guianas (Righi, 1984), no Brasil em regiões fora da Amazônia, deve ser considerada peregrina e exótica. *A. gracilis* e *P. corethrurus* são comumente encontradas no país em ecossistemas perturbados (agrícolas, urbanos e florestais) (Brown et al., 2006), e podem ser criadas e mantidas em cativeiro (Buch et al., 2011; Chang, 1997; James; Guimarães, 2010; Pashanasi, 2007; ver seções 4.4 e 4.5). Além disso, são espécies geófagas, que ingerem solo durante sua alimentação, ficando, assim, mais expostas à contaminação do solo; o que pode representar a possibilidade de contaminação de toda a cadeia

trófica por meio desses organismos que se alimentam do substrato contaminado. Por outro lado, *P. excavatus* e *E. eugeniae* possuem hábito epigêico, similar às espécies adotadas como padrão internacional, e podem ser criadas em cativeiro e disponibilizadas em quantidades necessárias para ensaios ecotoxicológicos (ver seções 4.2 e 4.3). Elas são frequentemente encontradas em minhocários comerciais no país.

As normas OECD 220 (OECD, 2004b), OECD 317 (OECD, 2010) e NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012), recomendam a espécie *Enchytraeus albidus* como organismo-teste para os ensaios de letalidade, reprodução e bioacumulação com enquitreídeos. A ocorrência dessa espécie na América do Sul só foi registrada até hoje em habitats litorâneos perto da Antártida. Entretanto, essa espécie tem sido a mais utilizada por ser amplamente distribuída no mundo e ocorrer em vários habitats, ser de fácil manuseio devido ao tamanho maior (pode chegar a 4 cm), ter sensibilidade comprovada a vários tipos de contaminantes em solo artificial e natural, e também porque o ensaio de reprodução com essa espécie foi validado após um trabalho interlaboratorial internacional (Römbke; Moser, 2002; ver seção 1.6.1). No entanto, devido ao ciclo de vida mais curto (*E. crypticus* 30 dias e *E. albidus* 56 dias) e capacidade reprodutiva maior (Westheide; Graefe, 1992; ABNT, 2012), a utilização de *E. crypticus* em ensaios ecotoxicológicos de laboratório tem aumentado significativamente (Posthuma et al., 1997; Achazi et al., 1999; Kuperman et al., 2004; Chelinho et al., 2011, Castro-Ferreira et al., 2012 entre outros). Porém, um dos aspectos negativos de *E. crypticus* é o fato de sua ocorrência no campo não ser conhecida e, portanto, suas exigências ecológicas (Römbke, 2003). Outras espécies com potencial de sensibilidade e que têm sido utilizadas em ensaios ecotoxicológicos são *Enchytraeus luxuriosus* Schmelz & Collado, 1999 (Bruns et al., 2001; Amorim et al., 2005; Kuperman et al., 2006), *Enchytraeus buchholzi* Vejdovski, 1879 (Willuhn et al., 1996) e *E. coronatus* Nielsen & Christensen, 1959 (Arrate et al., 2002).

No Brasil e em toda a América do Sul a inexistência de registros de ocorrência de *E. albidus* ou *E. crypticus* em solo talvez se deva ao fato da diversidade conhecida de enquitreídeos ainda ser restrita a poucas regiões (Römbke, 2007; Schmelz et al., 2013). Algumas espécies do gênero *Enchytraeus*, gênero recomendado pela norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) foram encontradas no Brasil e têm sido criadas em laboratório (Niva et al., 2010c). Aspectos da biologia e adequabilidade dessas espécies a ensaios ecotoxicológicos ainda estão sendo estudados (Niva et al., 2010b). Até o momento, considerando-se a tolerância térmica (Dirven-Van Breemen et al., 1994), *E. crypticus* parece ser a espécie mais indicada para ensaios na região tropical e subtropical (ver seção 4.6), já que ela tem melhor desempenho sob temperaturas mais altas (25 °C a 30 °C) quando comparada a *E. albidus* (15 °C a 20 °C). Além disso, estudos com *E. crypticus* demonstraram desempenho reprodutivo melhor do que o de *E. albidus* em solos mais secos (35% - 55% versus 55% - 65% de umidade) (Dirven-Van Breemen et al., 1994). *E. crypticus* também tem maior tolerância à acidez, sobrevivendo em condições de pH de 4 a 8,2 e *E. albidus* tem uma faixa menor, isto é, pH > 5 a 7,4 (Dirven-Van Breemen et al., 1994;

Kuperman et al., 2006; Amorim et al., 2005). *E. crypticus* também se mostrou mais tolerante do que *E. albidus* em relação ao teor de argila (respectivamente, 1% - 49% versus 6% - 26%) e ao teor de matéria orgânica (0,6% - 42% versus 2,5% - 8%) (Amorim et al., 2005; Kuperman et al., 2006; Chelinho et al., 2011).

O primeiro artigo publicado com dados de ensaios ecotoxicológicos com minhocas no Brasil foi de um grupo da Unesp Jaboticabal em 1996 (Ichinose et al., 1996). Em 1999, o Intituto Biológico (SP) iniciou estudos sobre bioacumulação de diferentes agrotóxicos pelas minhocas *E. fetida* e *E. andrei* (Papini; Andréa, 2001; Andréa et al., 2004; Andréa; Papini, 2005) e outros tipos de ensaios, sempre com agrotóxicos (Ferreira et al., 2015). Em seguida, uma nova abordagem na aplicação dos ensaios com minhocas foi dada nos estudos realizados por Sisinno et al. (2006, 2007), onde ensaios com *E. fetida* ou *E. andrei* foram usados para avaliar a toxicidade de solos contaminados por hidrocarbonetos e tratados após biorremediação. Recentemente, estudos para avaliar o risco ambiental do uso de lodo de esgoto e resíduos de dragagem (Cesar et al., 2008a, 2008b, 2012), dejetos de animais (Segat et al., 2015) e vinhaça (Alves et al., 2015a) tem evidenciado a preocupação com a qualidade ambiental no aproveitamento de passivos para fins agroflorestais.

A partir do ano 2000, vários estudos pioneiros em ecotoxicologia terrestre na região tropical foram desenvolvidos no Norte do Brasil, na Embrapa Amazônia Ocidental com a colaboração de especialistas alemães (Garcia, 2004; Garcia et al., 2008). Dentre os resultados obtidos nos estudos com agrotóxicos, a adaptação do solo artificial tropical (SAT) para as condições tropicais com o uso de pó da fibra da casca de coco em substituição à turfa de esfagno (Garcia, 2004, ver capítulo 7) nos ensaios com minhocas constituiu um marco na ecotoxicologia terrestre no Brasil. Além disso, os estudos conduzidos por Garcia (2004) e Garcia et al. (2008) comparando diferentes substratos, temperaturas e agrotóxicos demonstraram a necessidade de se utilizar temperaturas mais altas (28 °C) em ensaios voltados para os trópicos, além do uso de espécies nativas. Um estudo conduzido por De Silva et al. (2009) na Holanda comparou o efeito de três agrotóxicos através de ensaios ecotoxicológicos com *E. andrei* em temperatura de clima temperado (20 °C) e tropical (26 °C). Os resultados desse estudo, assim como os obtidos por Garcia et al. (2008), reforçam a necessidade de cuidado ao extrapolar dados gerados em condições de clima temperado para o clima tropical.

Com o aumento do interesse pela preservação da qualidade do solo, vários grupos em universidades (Esalq/USP, EESC/USP, UFSC, Udesc, UFPR, UFRRJ, UFF, UFRJ, UP e outras) e instituições de pesquisa (Embrapa, Cetem, Instituto Biológico e outros) têm estabelecido estudos na área de ecotoxicologia terrestre utilizando minhocas, a maioria a partir de meados da primeira década do século 21. Alguns desses grupos ainda contam com significativa colaboração de especialistas da Universidade de Coimbra (Portugal) e da empresa ECT Oekotoxicologie GmbH (Alemanha).

O número de trabalhos acadêmicos com oligoquetas (em conjunto, ou não, com outros organismos) tem crescido e esses estudos têm sido utilizados em diferentes aplicações e na avaliação do efeito de diversos tipos de contaminantes no solo, como mostram as características de alguns trabalhos publicados (dissertações, teses e artigos científicos), descritos na Tabela 2.1.

Com base nisso, pode-se destacar que os principais organismos-teste utilizados foram minhocas do gênero *Eisenia* sp. Os agrotóxicos são os contaminantes mais avaliados em estudos de caráter prospectivo, seguidos pelos metais e pelos compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos de petróleo e o hexaclorobenzeno. Como os problemas oriundos de áreas contaminadas vêm crescendo cada vez mais no Brasil, alguns dos estudos realizados enfocam a utilização dos ensaios com oligoquetas na avaliação de risco ambiental. Além dos ensaios ecotoxicológicos para avaliação da ecotoxicidade aguda, crônica e o comportamento de fuga, o ensaio de bioacumulação também tem sido aplicado para a avaliação de agrotóxicos, metais e lodo de esgoto (Tabela 2.1).

A utilização dos ensaios de comportamento de fuga com minhocas na avaliação da função de habitat de solos tem se popularizado. Estes ensaios são ecologicamente relevantes e de baixo custo, além de fornecerem informações rápidas de caráter retrospectivo para decisões futuras sobre áreas contaminadas (Hund-Rinke et al., 2005; Natal Da Luz et al., 2004; Niemeyer et al., 2010). Essa avaliação retrospectiva de áreas contaminadas tem utilizado os ensaios com oligoquetas em esquemas integrados de avaliação de risco ambiental (Jensen; Mesman, 2006). No estudo realizado por Antunes et al. (2008a, 2008b) o ensaio de comportamento de fuga com *E. andrei* foi usado como ferramenta na avaliação de risco de uma antiga mina de extração de urânio.

Os processos de biorremediação têm sido muito utilizados para o tratamento de solos contaminados por derivados da indústria do petróleo. Apesar da biorremediação constituir-se em um processo que procura restabelecer as características do solo, por meio da remoção de poluentes por atividade biológica de microorganismos e plantas, muitos subprodutos – às vezes até mais tóxicos do que os contaminantes iniciais – podem ser gerados durante a atividade microbiológica. Devido a esse fato, a inserção dos ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres após processos de biorremediação de solos impactados com hidrocarbonetos têm sido de grande interesse em trabalhos desenvolvidos em outros países (Salanitro et al., 1997; Dorn; Salanitro, 2000; Dawson et al., 2007; Hubálek et al., 2007).

Os ensaios com oligoquetas também têm sido utilizados para testar o efeito de nanopartículas inorgânicas (Heckman et al., 2011), nanotubos de carbono (Scott-Fordsman et al., 2008), e produtos veterinários farmacêuticos (Römbke et al., 2010; Menezes-Oliveira et al., 2018b). Outros tipos de impacto, como a salinização de solos, também podem ser avaliados por meio destes ensaios, como mostra o estudo de Owojori et al. (2009).

Tabela 2.1. Resumo de alguns trabalhos ecotoxicológicos publicados no Brasil usando oligoquetas.

Organismo-teste	Ensaio (metodologia)	Contaminante	Tipo de solo	Referência
E. fetida	Bioacumulação	Herbicida Simazina	Argissolo	Papini e Andréa (2001)
E. fetida, *P. corethrurus*	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Letalidade (OECD 207 – OECD, 1984; ISO 11268-1 - ISO, 1993). Reprodução (OECD 222 – OECD, 2004b; ISO 11268-2 - ISO, 1998). Temperatura adaptada para 28 ± 2 °C.	Carbendazim, Lambda-cialotrina	Solo artificial OECD LUFA 2.2. SAT. Solo natural tropical.	Garcia (2004).
E. fetida	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Letalidade (ISO 11268-1, ISO, 1993). Reprodução (ISO 11268-2, ISO, 1998).	Hidrocarbonetos de petróleo	Areno argiloso.	Sisinno et al. (2006).
E. fetida	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1- ISO, 2008)	Hidrocarbonetos de petróleo (após tratamento em biorreator)	Argiloso e Areno argiloso.	Sisinno et al. (2007).
E. andrei	Letalidade (ASTM E1676-04: 2004). Bioacumulação (ASTM E1676-04 – ASTM, 2004)	Biodisponibilidade de Hg, Pb, Zn e Cu	Arenoso e com baixo teor de matéria orgânica.	Cesar et al. (2008a), Cesar et al. (2012)
E. andrei	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Bioacumulação (ASTM E1676-04 – ASTM, 2004).	Lodo de Esgoto (Fe, Al, Zn, Cu, Pb, Hg).	Latossolo Vermelho-amarelo. Chernossolo.	Cesar et al. (2008b).
E. fetida	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Temperatura adaptada para 28 ± 2 °C.	Fungicidas: Benomil e Carbendazim. Inseticida: Lambda-Cialotrina.	Solo artificial segundo OECD (10 % matéria orgânica). SAT – 10 % matéria orgânica. LUFA. Argissolo Vermelho (Acrisol).	Garcia et al. (2008)
E. fetida	Bioacumulação (ASTM E167695, ASTM, 1995).	Hg metálico.	-	Hinton e Veiga (2008)
E. fetida, *P. corethrurus*	Letalidade (OECD 207 - OECD, 1984). Comportamento de fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008).	Oxicloreto de cobre	SAT	Mestrinho (2009)
E. andrei	Letalidade (OECD 207 e ISO 11268-1 - OECD, 1984; ISO, 1993) Reprodução (OECD 222 e ISO 11268-2 - ISO, 1998; OECD, 2004b) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1- ISO, 2008)	Fungicidas: Captan; Carboxim+ Tiran Inseticidas: Imidacloprida, Fipronil, Tiametoxam	SAT	Alves (2010); Alves et al. (2013)
E. fetida	Reprodução (ISO 11268-1 - ISO, 1993)	Herbicidas: Glifosato, 2,4-D	Argissolo	Correia e Moreira (2010)
E. andrei, *P. corethrurus*	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Temperatura adaptada para 20 ± 4 °C	Fungicida: Carbendazim Inseticida-nematicida: Carbofurano Herbicida: Glifosato	SAT – 10% matéria orgânica	Buch (2010); Buch et al. (2013)

Continua...

Tabela 2.1. Continuação...

Organismo-teste	Ensaio (metodologia)	Contaminante	Tipo de solo	Referência
E. andrei	Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade (OECD 207; NBR 15537, ISO 11268-1 – OECD, 2007; ABNT, 2007; ISO, 1993); Reprodução (ISO 11268-2; OECD 222 - ISO, 2008; OECD, 2004b)	Avaliação de áreas contaminadas por pesticidas: Alfa-BHC, Heptacloro, otGamaBHC, Aldrin, Metolacloro, Beta-endosulfan, Clordano, Dieldrin, Endrin, 4,4 DDT, Metoxicloro, Abamectina, Carbofurano Metais pesados: Cu, Cr, Cd, Fe, Al, Pb, Ni, Co, Mn e Zn	Solos naturais e SAT – 10% matéria orgânica	Lima (2010)
E. andrei	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Temperatura adaptada para 25 ± 2 °C	Avaliação de risco em área contaminada com metais pesados: Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Fe, Co e Mn	Arenosos e argilosos	Niemeyer et al. (2010)
E. andrei	Bioacumulação (Método descrito em Papini & Andréa, 2004) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade por contato com papel filtro (OECD 207 - OECD, 1984)	Agrotóxico: Cipermetrina	Latossolo Vermelho Distrófico Típico – LV Argissolo Vermelho Eutroférrico Chernossólico – PV Gleissolo Melânico Alumínico Típico – GM	Sousa (2010); Sousa e Andréa (2011); Ferreira et al. (2015)
E. andrei	Letalidade (ISO 11268-1; NBR 15537 - ISO, 1993; ABNT, 2007). Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008). Temperatura adaptada para 25 ± 2 °C	Agrotóxico: Vertimec 18 EC	SAT- 10% matéria orgânica	Nunes (2010), Nunes et al. (2012)
E. andrei	Letalidade por contato com papel de filtro (método descrito na OECD 207- OECD, 1984). Bioacumulação verificada de acordo com Farenhorst & Prorokopowich (2003)	Hexaclorobenzeno	-	Vampré et al. (2010)
E. andrei, *A. gracilis*, *D. annae*	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Temperatura adaptada para 20 ± 4 °C	Agrotóxico: Carbofurano, Carbendazim	Latossolo Vermelho	Cantelli (2011)
E. andrei, *E. crypticus*	Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Resíduo piritoso, Avaliação de risco	Argissolo e Cambissolo	Oliveira-Filho (2013); Oliveira-Filho et al. (2017)
E. andrei, *E. crypticus*	Letalidade e reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Comportamento de fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Avaliação de risco: sedimento de dragagem, lodo de esgoto	Latossolo e Chernossolo	Cesar (2014); Cesar et al. (2015, 2016)
E. andrei, *E. crypticus*	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Modelo de Ecossistemas Terrestres (TME) com comunidades naturais	Dejeto suíno	Argissolo vermelho eutrófico Latossolo vermelho distrófico Neossolo quartzarênico	Segat (2012, 2016); Segat et al. (2015)

Continua...

Tabela 2.1. Continuação...

Organismo-teste	Ensaio (metodologia)	Contaminante	Tipo de solo	Referência
E. andrei, *E. crypticus*	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004)	Lama vermelha (resíduo do refino da bauxita)	SAT - 5% matéria orgânica; solo natural	Bianchi (2013)
Enchytraeus sp. (espécie autóctone)	Reprodução (NBR ISO 16387 - ABNT, 2012) Temperatura adaptada para 22 ± 4 °C, 21 dias	Ácido bórico; Roundup WG®; solo agrícola	SAT - 5% matéria orgânica; solo natural com histórico agrícola	Assis (2015)
E. andrei, *E. crypticus*	Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Vinhaça	Latossolo vermelho, latossolo vermelho amarelo, SAT – 10%	Alves (2015); Alves et al. (2015a)
E. andrei	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2012)	Ácido aminometilfosfônico (AMPA)	SAT – 10% matéria orgânica	Domínguez et al. (2016)
E. andrei, *P. corethrurus*	Comportamento de fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2012; mas aumentada para 91 dias) Bioacumulação (OECD, 2010)	Mercúrio- Hg	SAT – 10% matéria orgânica e solo natural	Buch et al. (2017)
E. crypticus	Reprodução (NBR ISO 16387 - ABNT, 2012)	Solo com derramamento de óleo	Solo natural com histórico de contaminação	Scoriza et al. (2018)
E. crypticus	Letalidade e reprodução (OECD 220 -OECD, 2004)	Agrotóxicos: KRAFT 36 EC, SCORE	Solo agrícola	Menezes-Oliveira et al. (2018a)
E. andrei, *E. crypticus*	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2012; NBR ISO 16387 - ABNT, 2012)	Ácido bórico	SAT - 5% matéria orgânica	Niemeyer et al. (2018a)
E. andrei	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Agrotóxico: Metsulfuron-metil	SAT - 5% matéria orgânica	De Santo et al. (2018)
E. andrei	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) e modificado para avaliar fuga em presença de aveia contaminada Levantamento de minhocas em campo em área com e sem aplicação de herbicidas	Agrotóxico: Roundup ® Original; Trop®; Zapp® Qi 620; Crucial® em laboratório e em campo	SAT - 5% matéria orgânica; húmus (com e sem aveia contaminada do campo)	Niemeyer et al. (2018b)

Em países de clima temperado, estudos de ecotoxicidade com enquitreídeos (ver também capítulo 1) têm sido aplicados tanto para avaliação de substâncias isoladas (Collado et al., 1999), como para misturas presentes em solos artificiais ou naturais (Posthuma et al., 1997) aplicadas em laboratório e também a partir da situação de campo. Peijnenburg et al. (1999) avaliaram a biodisponibilidade de metais para *E. crypticus* enfocando as diferenças existentes entre 20 diferentes tipos de solo do campo, enquanto Droge et al. (2006) avaliaram a ecotoxicidade crônica de hidrocarbonetos sobre a reprodução de oligoquetas. Várias substâncias químicas também foram avaliadas por meio do ensaio de comportamento de fuga com *E. albidus*, porém essa espécie demonstrou limitações quanto ao uso desse tipo de ensaio (Amorim et al., 2008). Römbke et al. (2017) faz uma interessante revisão sobre o uso de enquitreídeos em ensaios de laboratório e campo em relação aos efeitos de agrotóxicos.

Os enquitreídeos também têm sido utilizados em avaliações da abundância e diversidade como parâmetros da contaminação em campo (Didden; Römbke, 2001; Römbke et al., 2002). Há um grande potencial de aplicabilidade dos enquitreídeos para estudos de toxicidade de uma grande variedade de substâncias, desde agrotóxicos, metais pesados, fertilizantes, resíduos industriais e domésticos (Didden; Römbke, 2001). No Brasil, o número de estudos é crescente, em geral em conjunto com outros organismos na avaliação de substâncias em solo natural ou artificial ou na avaliação de solos já contaminados (Scoriza et al., 2015; Oliveira Filho et al., 2015; Alves, 2015a; Buch et al., 2017; Menezes-Oliveira et al., 2018b e outros) (Tabela 2.1). Existem estudos da biologia de espécies nativas da região subtropical (Niva et al., 2010b; 2010c) e uma espécie autóctone *Enchytraeus* sp. tem sido utilizada em ensaios (Assis, 2015; Oliveira-Filho et al., 2017). Espécies fragmentadoras como *E. dudichi*, que ocorrem em solo brasileiro, também tem sido utilizadas em estudos mais recentes (Niva et al., 2012; Dalla Rosa et al., 2017).

2.3 Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas para fins normativos e legais

2.3.1 Registro de agrotóxicos

Com base em uma Lei Federal nº 7.802 e a Portaria nº 84 (Brasil, 1989, 1996), ensaios de toxicidade com vários tipos de organismos não alvo são solicitados para a avaliação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) de agrotóxicos, seus componentes e afins (ver capítulo 3). São solicitados ensaios de toxicidade com organismos não alvo que, combinados aos resultados de bioconcentração, persistência e comportamento da substância em questão, servem de base para o cálculo do PPA, utilizado para a classificação do agrotóxico. Os ensaios com organismos de solo normalmente solicitados para atendimento a essa demanda legal tem sido o de microorganismos e de ecotoxicidade aguda

com minhocas (*E. fetida* ou *E. andrei*). Mas como já discutido anteriormente (seção 1.2.1), o ensaio de ecotoxicidade aguda para fins de registro de produtos caiu em desuso na Europa, sendo o ensaio de reprodução de minhocas (e ensaios com outros organismos do solo) mais aceito atualmente.

2.3.2 Classificação de resíduos sólidos

Apesar da NBR 10.004 – Resíduos Sólidos – Classificação, indicar que para a avaliação da toxicidade de um resíduo sólido deve-se considerar os efeitos nocivos da presença de agentes ecotóxicos e os efeitos associados a cada substância química ou decorrente do sinergismo entre as substâncias constituintes do resíduo (ABNT, 2004), a realização de ensaios ecotoxicológicos para complementar a classificação de resíduos perigosos ainda é pouco demandada no Brasil.

Estima-se que um dos maiores entraves para a solicitação desse tipo de ensaio pelos técnicos dos órgãos ambientais seja o pouco conhecimento sobre o assunto e a dificuldade de orientação na solicitação do ensaio decorrente, muitas vezes, da própria dificuldade de interpretação dos resultados produzidos, uma vez que muitos técnicos não possuem capacitação em ecotoxicologia. Um trabalho interlaboratorial produzido na Europa demonstrou a necessidade da utilização de uma bateria de ensaios com diferentes organismos aquáticos e terrestres, entre eles, o ensaio de fuga com minhocas, para avaliar mais seguramente a ecotoxicidade de resíduos sólidos (Moser et al., 2011).

Elutriatos de resíduos sólidos podem ser preparados para serem usados em ensaios com organismos aquáticos. Na norma NBR 15469 – Ecotoxicologia – Coleta, preservação e preparo de amostras (ABNT, 2015) pode ser encontrada uma metodologia para preparação do elutriato. No caso de amostras sólidas e semi-sólidas, a escolha do organismo-teste e o procedimento de avaliação precisam ser feitos de forma que as características da amostra não sejam alteradas significativamente, influenciando positivamente ou negativamente no resultado.

2.3.3 Avaliação de risco ambiental em áreas contaminadas

Estudos de avaliação de risco ambiental podem ser realizados em áreas contaminadas com a coleta de amostras para realização de ensaios de ecotoxicidade laboratoriais (p.ex., Römbke et al., 2006a), e em avaliações em campo, com a amostragem de organismos (Römbke et al., 2006b) e/ou ensaios in situ (Antunes et al., 2008a, 2008b). Tais estudos são, inclusive, recomendados pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 420, de 28 de dezembro de 2009 (Brasil, 2009) (ver capítulo 3). Entretanto, esses estudos ainda estão em desenvolvimento e têm sido pouco aplicados no Brasil, principalmente por serem de custo elevado e por ainda existirem muitos questionamentos com relação à melhor metodologia a ser aplicada em cada caso.

Os ensaios com oligoquetas para avaliação de áreas contaminadas podem ser utilizados para avaliação da função de habitat dos solos naturais, sendo indicados tanto os ensaios de ecotoxicidade aguda – como, por exemplo, o descrito na NBR 15537 (ABNT, 2014) – e crônica com minhocas *E. fetida* ou *E. andrei* quanto o ensaio de ecotoxicidade crônica com enquitreídeos descrito na NBR ISO 16387 (*Enchytraeus* sp.) (ABNT, 2012). Esses ensaios estão descritos no guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo - ABNT NBR ISO 17616 (ABNT, 2010). Para áreas onde ocorre a deposição de sedimentos de dragagem, Cesar et al. (2015) propuseram um índice de risco ecológico para latossolos e chernossolos, baseado em ensaios com vários organismos. Uma norma para avaliação de risco está em discussão na ABNT e o Ibama tem se esforçado para avançar nas normativas para a avaliação de risco ambiental. O meio acadêmico no Brasil tem gerado trabalhos em nível de pós-gradução que promovem avanços na avaliação de risco com organismos de solo no Brasil, como a Udesc, UFRJ, EESC/USP entre outros, sendo na maioria dos casos em cooperação com a Universidade de Coimbra – Portugal (por exemplo: Niemeyer, 2010; Cesar, 2014; Oliveira-Filho, 2013).

2.4 Desafios para o avanço da ecotoxicologia terrestre no Brasil

Apesar de todos os esforços para aplicação dos ensaios ecotoxicológicos como importante instrumento de avaliação de risco de substâncias químicas para a qualidade do solo e do ambiente, incluindo aqueles de origem biológica, muitos desafios ainda precisam ser superados.

Niemeyer et al. (2017) apontam para lacunas, tanto na avaliação de risco de caráter prospectivo quanto retrospectivo, e propõem ações para o avanço da avaliação de risco ambiental. São necessários estudos sobre o efeito e biodisponibilidade de contaminantes em diferentes tipos de solo representativos do Brasil, bem como sobre a tolerância de diferentes espécies em diferentes cenários. Consideram-se contaminantes os agrotóxicos e seu uso excessivo e as misturas presentes no solo, metais, fármacos, salinização, resíduos industriais ou da agropecuária e do tratamento de esgoto usados como fertilizantes e substâncias de origem biológica utilizados no controle de pragas, entre outros. Também não há ainda uma definição clara dos objetos de proteção por parte dos diferentes interessados, ou seja, deve-se definir o que se quer proteger e onde se quer proteger o que, e, dessa forma, implementar e operacionalizar uma avaliação de risco ambiental sólida e eficiente.

Entre os desafios mais gerais, destaca-se:

1. Maior acessibilidade às normas técnicas – desafio que aos poucos está sendo superado com o auxílio da ABNT/CEE-106 – Comissão de Estudo

Especial de Análises Ecotoxicológicas, por meio da tradução das normas ISO de qualidade do solo e adaptação para as condições brasileiras.

2. Necessidade de formação de recursos humanos e de produção de dados científicos tanto na área aplicada de métodos em ecotoxicologia terrestre, quanto em áreas de pesquisa básica em ecologia e biologia de organismos edáficos, essenciais para o desenvolvimento de métodos mais adequados– desafio que precisa de incentivo técnico e financeiro das agências de fomento e dos centros de pesquisa e universidades.
3. Maior troca de experiência por meio da realização de encontros técnicos, congressos e seminários – desafio que envolve o reconhecimento da importância da área de ecotoxicologia terrestre dentro da comunidade científica.
4. Melhor capacitação dos técnicos dos órgãos ambientais – desafio que necessita do apoio e do reconhecimento dessa necessidade pelos dirigentes dos órgãos ambientais.
5. Elaboração de Resoluções, Diretrizes e outros instrumentos legais onde a aplicação dos ensaios possa ser exigida como ferramenta de controle – desafio que envolve todos os outros citados acima.

A ecotoxicologia terrestre no Brasil tem avançado nos últimos anos. O número de estudantes de pós-graduação e estudos nessa área tem aumentado muito, graças ao esforço de algumas universidades e seus professores/pesquisadores em promover o tema em disciplinas e cursos oferecidos, bem como o apoio da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia em eventos relacionados ao tema (Niva et al., 2016; Niemeyer et al., 2017).

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10.004**: resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, 2004.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15469**: ecotoxicologia: coleta, preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2015.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2007.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2014.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 17616**: qualidade do solo: guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo. Rio de Janeiro, 2010.

ACHAZI, R. K.; FRÖHLICH, E.; HENNEKEN, M.; PILZ, C. The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992 (Enchytraeidae, Oligochaeta).

In: SCHMELZ, R.; SÜHLO, K. (Ed.). **Proceedings of the 3rd International Symposium on Enchytraeidae**, Osnabrück, Germany: 3-4 July 1998. Osnabrück: Rasch Druckerei und Verlang GmbH & Co. KG, 1999. p. 117-126.

ALVES, P. R. L. **Avaliação ecotoxicológica de agrotóxicos em *Eisenia andrei* (Oligochaeta) e Folsomia candida (Collembola)**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p. 2674-2682, 2013. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Overview of the standard methods for soil ecotoxicology testing. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Ed.). **Invertebrates**: experimental models in toxicity screening. Rijeka: InTech, 2016. p. 35-56.

ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science and Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015a. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.150.

ALVES, R. H.; RIETZLER, A. C. Toxic effects of Arsenic on *Eisenia andrei* exposed to soils surrounding gold mining operations. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 682-689, 2015b. DOI: 10.1590/01000683rbcs20140060.

AMORIM, M. J. B.; NOVAIS, S.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): a test organism in a standardized avoidance test? Effects of different chemical substances. **Environment International**, v. 34, p. 363-371, 2008. DOI: 10.1016/j.envint.2007.08.010.

AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SOARES, A. M. V. M. Effects of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. **Chemosphere**, v. 61, p. 1102-1114, 2005. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.048.

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 95-107, 2010.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S. Influence of soil properties on bioaccumulation of 14C-simazine in earthworms *Eisenia fetida*. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B., v. 40, p. 55-58, 2005.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M.B. Glyphosate: influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, v. 22, p. 95-100, 2004. DOI: 10.1590/S0100-83582004000100012.

ANTON, F.; LABORDA, E.; LABORDA, P. Acute toxicity of the fungicide captan to the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 82-87, 1990.

ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; NUNES, B.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 620-631, 2008a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.02.007.

ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. **Science of the Total Environment**, v. 390, p. 387-395, 2008b. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.07.053.

ARRATE, J. A.; RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M. Effects of three chemicals on the survival and reproduction of the oligochaete worm *Enchytraeus coronatus* in chronic toxicity tests. **Pedobiologia**, v. 46, p. 136-149, 2002. DOI: 10.1078/0031-4056-00120.

ASSIS, O. **Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como indicadores do manejo do solo e em ensaios ecotoxicológicos**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1676-04**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the *Enchytraeid potworm* Enchytraeus albidus. West Conshohocken, 2004.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1676-95**: standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with Lumbricid earthworm *Eisenia foetida*. Philadelphia, 1995.

BEYLICH, A.; GRAEFE, U. Relationships between microannelid and earthworm activity. **Landbauforschung – vTI Agriculture and Forestry Research**, special issue 357, p. 1-12, 2012. (Newsletter on enchytraeidae, 12).

BIANCHI, M. O. **Ensaios ecotoxicológicos como ferramenta para avaliação do impacto ambiental de resíduos de mineração sobre o solo**. 2013. 91 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em: <http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BRASIL. **Resolução CONAMA Nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/índex.cfm>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 1-18, 2010.

BROWN, G. G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant Soil**, v. 170, p. 209-231, 1995. DOI: 10.1007/BF02183068.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 297-381.

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.

BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; ZAGATTO, M. R. G.; FERREIRA, S. de A.; NADOLNY, H. S.; CARDOSO, G. B. X.; SANTOS, A.; MARTINEZ, G. de A.; PASINI, A.; BARTZ, M. L. C.; SAUTTER, K. D.; THOMAZINI, M. J.; BARETTA, D.; SILVA, E. da; ANTONIOLLI, Z. I.; DECAËNS, T.; LAVELLE, P. M.; SOUSA, J. P.; CARVALHO, F. Biodiversidade da fauna do solo e sua contribuição para os serviços ambientais. In: PARRON, L. M.; GARCIA, J. R.; OLIVEIRA, E. B. de; BROWN, G. G.; PRADO, R. B. (Ed.). **Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do Bioma Mata Atlântica**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 121-154.

BRUNS, E.; EGELER, P.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SPOERLEIN, P. Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). **Hydrobiologia**, v. 463, p. 185-196, 2001. DOI: 10.1023/A:1013159810067.

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, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.150.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. **Pedobiologia**, v. 54S, p. S19-S25, 2011.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 32-38, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.011.

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.; SCHMELZ, R. M.; NIVA, C. C.; CORREIA, M. E. F.; ; SILVA-FILHO, E. V. Mercury critical concentrations to *Enchytraeus crypticus* (Annelida: Oligochaeta) under normal and extreme conditions of moisture in tropical soils: reproduction and survival. **Environmental Research**, v. 155, p. 365-372, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2017.03.005.

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.

CASTRO-FERREIRA, M. P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM M. J. B. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 87, p. 1222-1227, 2012. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.021.

CESAR, R. G.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E. D.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. **(Eco)toxicologia de metais em solos**: conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental. Rio de Janeiro: CETEM, 2014. 100 p. (Série tecnologia ambiental).

CESAR, R. G. **Disposição de sedimentos de dragagem em solos tropicais**: avaliação de risco ambiental com base em indicadores pedogeoquímicos e ecotoxicológicos. 2014. 223 f. Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; ALAMINO, R. C. J.; POLIVANOV, H.; SILVA, R. C.; CASTILHOS, Z. C.; ARAUJO, P. C. Avaliação do potencial tóxico de latossolos e chernossolos acrescidos de lodo de esgoto utilizando bioensaios com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, p. 53-60, 2008a.

CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. Biodisponibilidade de metilmercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, p. 33-41, 2008b.

CESAR, R.; NATAL-DA-LUZ, T.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H.; SOUSA, J. P. Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological evaluation based on bioassays with springtails and enchytraeids. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, p. 2916-2924, 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3559-3.

CESAR, R.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H.; de CAMPOS, T. Proposta de um índice de risco ecológico para disposição sustentável de sedimentos de dragagem em latossolos e chernossolos. **Geociências**, v. 34, n. 2, p. 275-285, 2016.

CESAR, R.; SILVA, M.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; EGLER, S.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H. Influence of the properties of tropical soils in the toxicity and bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended lands. **Environmental Earth Sciences**, v. 66, p. 2281-2292, 2012. DOI: 10.1007/s12665-011-1449-2.

CHANG, Y. C. Minireview: Natural history of *Amynthas hawayanus* (Rosa, 1891). **Acta Biologica Paranaense**, v. 26, p. 39-50, 1997.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; ANDRÉS, P.; SOUSA, J. P. Improving ecological risk assessment in the mediterranean area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two oligochaete species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1050-1058, 2011. DOI: 10.1002/etc.480.

COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M.; MOSER, T.; RÖMBKE, J. Enchytraeid reproduction test (ERT): different sublethal responses of two *Enchytraeus species* (Oligochaeta) to toxic chemicals. **Pedobiologia**, v. 43, p. 625-629, 1999.

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of Glyphosate and 2,4-D on earthworms (Eisenia foetida) in laboratory tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, p. 264-268, 2010.

DALLA ROSA, V. M.; CARNIEL, L. S. C.; ALEXANDRE, D. ; NIVA, C. C. ; KLAUBERG FILHO, O. Toxicidade de Bravonil 500® (Clorotalonil) para *Enchytraeus dudichi* e *Eisenia andrei*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, 4., 2017, Lages. **Alimentos seguros, nutritivos e suficientes**: anais. Lages: Uniplac, 2017.

DAWSON, J. J. C.; GODSIFFE, E. J.; THOMPSON, I. P.; RALEBITSO-SENIOR, T. K. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 164-177, 2007. DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.06.020.

DE SANTO, F. B.; RAMOS, G. A.; RICARDO-FILHO, A. M.; MARCHIORO, C. A.; NIEMEYER, J. C. Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of adjuvant addition on ecotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 24, p. 24143-24149, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-2481-5.

DE SILVA, P. M.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C. A. M. Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, v. 76, p. 1410-1415, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.006.

DIDDEN, W.; RÖMBKE, J. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 25-43, 2001. DOI: 10.1006/eesa.2001.2075.

DIRVEN-VAN BREEMEN, E.; BAERSELMANN, R.; NOTENBOOM, J. **Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek**. Nederlands: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, 1994. 26 p. (RIVM Rapport, 719102025).

DOMÍNGUEZ, A.; BROWN, G. G.; SAUTTER, K. D.; DE OLIVEIRA, C. M. R.; DE VASCONCELOS, E. C.; NIVA, C. C.; BARTZ, M. L. C.; BEDANO, J. C. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19731, 2016. DOI: 10.1038/srep19731.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v. 40, p. 419-426, 2000.

DROGE, S. T. J.; PAUMEN, M. L.; BLEEKER, E. A. J.; KRAAK, M. H. S.; VAN GESTEL, C. A. M. Chronic toxicity of polycyclic aromatic compounds to the springtail *Folsomia candida* and the enchytraeid *Enchytraeus crypticus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 2423-2431, 2006.

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

FERREIRA, R. C.; PAPINI, S.; DE ANDRÉA, M. M. Bioavailability and influence of 14C-carbofuran on *Eisenia andrei* avoidance, growth and reproduction in treated natural tropical soils. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 50, n. 4, p. 266-274, 2015. DOI: 10.1080/03601234.2015.999599.

FRAGOSO, C.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; SENAPATI, B.; JIMÉNEZ, J. J.; MARTÍNEZ, M. A.; DECAËNS, T.; TONDOH, J. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. Pp. 27-55. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; ENDRIX, P. F. (Eds.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CABI, 1999. p. 27-55.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions. Göttingen: Cuvillier, 2004. (Ecology and Development Series, 19).

GARCIA, M.; RÖMBKE. J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 450-456, 2008. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.08.007.

GOMEZ-EYLES, J. L.; SVENDSEN, C.; LISTER, L.; MARTIN, H.; HODSON, M. E.; SPURGEON, D. J. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on Caenorhabditis elegans and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 71-79, 2009. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.07.006.

HECKMAN, L.; SUTHERLAND, D. S.; BESENBACHER, F.; HOVGAARD, M. B.; AUTRUP, H.; SCOTT-FORDSMAN, J. J. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 226-233, 2011. DOI: 10.1007/s10646-010-0574-0.

HINTON, J. J.; VEIGA, M. M. The influence of organic acids on mercury bioavailability: insight from an earthworm assessment protocol. **Environmental Bioindicators**, v. 3, p. 47-67, 2008. DOI: 10.1080/15555270801973559.

HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATEJU, V.; KOVÁCOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 1-7, 2007. DOI: 10.1065/jss2005.06.142.

HUND-RINKE, K.; LINDEMANN, M.; SIMON, M. Experiences with novel approaches in earthworm testing alternatives. **Journal of Soils & Sediments**, v. 5, p. 233-239, 2005.

ICHINOSE, A. M.; MACHADO NETO, J. G.; ZAGATTO, P. A. Acute toxicity for earthworms (*Eisenia foetida*) in agricultural soils, sand, and artsol substrate, in laboratory conditions. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 9, p. 21-26, 1996.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms: part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Genebra, 1993.

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

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 17512-1**: soil quality: avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals: part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Genebra, 2008.

JAMES, S. W.; GUIMARÃES, A. A. Discovery and development of new species for vermiculture. In: EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; SHERMAN, R. L. (Ed.). **Vermiculture technology**: earthworms, organic wastes and environmental management. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 41-52.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Reviews**, v. 13, p. 51-83, 2005a. DOI: 10.1139/a05-007.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeids in cological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 266-277, 2005b. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.10.025.

JENSEN, J.; MESMAN M. (Ed.). **Eco logical risk assessment of contaminated land**: decision support for site specific investigations. [S.].], 2006. (RIVM Report, 711701047).

KOLAR, L.; KOŽUH ERŽEN, N.; HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 1, p. 182-189, 2008. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.02.011.

KULA, H.; LARINK, O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 635-639, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00030-2.

KUPERMAN, R. G.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; LANNO, R.; CHECKAI, R. T.; DODARD, S. G.; SUNAHARA, G. I.; SCHEFFCZYK, A. Adaptation of the enchytraeid toxicity test for use with natural soil types. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S234–S243, 2006. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.028.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T. Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 48-53, 2004.

LANGDON, C. J.; HODSON, M. E.; ARNOLD, R. E.; BLACK, S. Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. **Environmental Pollution**, v. 38, n. 2, p. 368-375, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.03.002.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, v. 33, p. 159-193, 1997.

LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. **Ecotoxicology**, v. 10, n. 5, p. 315-322, 2001. DOI: 10.1023/A:1016767519556.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; BIANCHI, M.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2919-2924, 2018. DOI: 10.1002/etc.4056.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; LOUREIRO, S.; AMORIM, M. J. B.; WRONA, F.; SOARES, A. M. Hazard assessment of the veterinary pharmaceuticals monensin and nicarbazin using a soil test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2018. DOI: 10.1002/etc.4265.

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

MEYER, A. R.; RÖMBKE, J.; MOSER, T.; RATTE, H. T. Statistical results and implications of the Enchytraeid reproduction ringtest. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 2116-2121, 2002.

MOSER, H.; ROEMBKE, J.; DONNEVERT, G.; BECKER, R. Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 'ecotoxic' in the European waste list (2000/532/EC). **Waste Management & Research**, v. 29, n. 2, p. 180-187, 2011. DOI: 10.1177/0734242X10367844.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Avoidance test with Collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 2188-2193, 2004.

NIEMEYER, J. C.; CARNIEL, L. S. C.; DE SANTO, F. B.; SILVA, M.; KLAUBERG-FILHO, O. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 4, 395-401, 2018a. DOI: 10.1007/s10646-018-1915-7.

NIEMEYER, J. C.; CHELINHO, S.; SOUSA, J. P. Soil ecotoxicology in Latin America: current research and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, 1795-1810, 2017. DOI: 10.1002/etc.3792.

NIEMEYER, J. C.; DE SANTO, F. B.; GUERRA, N.; RICARDO-FILHO, A. M.; PECH, T. M. Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. **Chemosphere**, v. 198, p. 154-160, 2018b. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.127.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA SANTO, M.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; RIBEIRO, R.; 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, n. 8, p. 1557-1571, 2010. DOI: 10.1007/s11368-010-0255-x.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; BROWN, G. G. Adaptação do ensaio ecotoxicológico com enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11., 2010, Bombinhas. **Anais**... Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010b.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; BROWN, G. G. Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11., 2010, Bombinhas. **Anais**... Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010c.

NIVA, C. C.; NIEMEYER, J. C.; SILVA JÚNIOR, F. M. R.; NUNES, M. E. T.; DE SOUSA, D. L.; ARAGÃO, C. W. S.; SAUTTER, K. D.; ESPINDOLA, E. G.; SOUSA, J. P.; RÖMBKE, J. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution**, v. 23, n. 11, p. 11363-11378, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6597-1.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ , R.; BROWN, G. G. Enquitreídeos (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, Lavras, 2010a. p. 351-365.

NIVA, C. C.; SCHMELZ, R. M.; BROWN, G. G. Notes on the reproduction, fragmentation and regeneration of *Enchytraeus dudichi* Dózsa-Farkas, 1995 sensu lato (Enchytraeidae, Oligochaeta) found in Paraná State, Brazil. **Landbauforschung**, nesp. 357, p. 13-19, 2012. (Newsletter on Enchytraeidae, n. 12).

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo**. 2010. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. V. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I. D.; BARETTA, D.; ZORTÉA, T.; CASAROTTO, K.; DORS, P.; CAMPOS, M. L.; SANTOS, J. C. P. Ecotoxicological assessment of coal mining waste. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1806-1813, 2015. DOI: 10.1590/01000683rbcs20150151.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; BARETTA, D.; ZORTEA, T.; OLIVEIRA, J. P. M.; SANTOS, J. C. P. Resíduo piritoso provoca toxicidade aguda e crônica em Collembola e Oligochaeta. **Scientia Agraria**, v. 18, p. 64-75, 2017. DOI: 10.5380/rsa.v17i3.50209.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I. de. **Ecological risk assessment and mesofaunal in mining areas**. 2013. 159 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes**. Paris, 2010. (OECD. Guideline for testing chemicals, 317).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)**. Paris, 2004a. (OECD. Guideline for the testing of chemicals, 222).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004b. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

OWOJORI, O. J.; REINECKE, A. J.; VOUA-OTOMO, P.; REINECKE, S. A. Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil-dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). **Pedobiologia**, v. 52, p. 351-360, 2009. DOI: 10.1016/j.pedobi.2008.12.002.

PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 67-73, 2004. 10.1590/S0100-06832004000100007.

PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Dissipação de simazina em solo por ação de minhocas (*Eisenia fetida*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 593-599, 2001. 10.1590/S0100-06832001000300008.

PASHANASI, B. Producción masiva de lombrices de tierra (*Pontoscolex corethrurus*) en la Amazonía Peruana. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 519-523.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; POSTHUMA, L.; ZWEERS, P. G. P. C.; BAERSELMANN, R.; DE GROOT, A. C.; VAN VEEN, R. P. M.; JAGER, T. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the oligochaete *Enchytraeus crypticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p.170-186, 1999. DOI: 10.1006/eesa.1999.1773.

POSTHUMA, L.; BAERSELMAN, R.; VAN VEEN, R. P. M.; DIRVEN VAN BREEMEN, E. M. Single and joint toxic e!ects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 108-121, 1997. DOI: 10.1006/eesa.1997.1568.

REINECKE, A. J.; MABOETA, M. S.; VERMEULEN, L. A.; REINECKE, S. A. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance reponse. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 779-789, 2002. DOI: 10.1007/s00128-002-0023-8.

RIGHI, G. *Pontoscolex* (Oligochaeta, Glossoscolecidae), a new evaluation. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 19, p. 159-177, 1984.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological tests with enchytraeids: a review. **Pedobiologia**, v. 47, n. 5/6, p. 607-616, 2003. DOI: 10.1078/0031-4056-00235.

RÖMBKE, J.; COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M. Abundance, distribution and indicator potential of enchytraeid genera (Enchytraeidae, Clitellata) in secondary forests and pastures of the Mata Atlântica. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 31, p. 139-150, 2007.

RÖMBKE, J. Enchytraeidae of tropical soils: State of art: with special emphasis on Latin America. **Folia Facultatis Scientiarium Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis**, Biologia, v. 110, p. 157-181, 2007.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; DIDDEN, W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 249-265, 2005. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.027.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNASS, H. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails, and plants for the assessment of metals in natural soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 776-787, 2006a.

RÖMBKE, J.; KROG, K. A.; MOSER, T.; SCHEFFCZYK, A.; LIEBIG, M. Effects of the veterinary pharmaceutical Ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. **Archives Environmental Toxicology Chemistry**, v. 58, p. 332-340, 2010. DOI: 10.1007/s00244-009-9414-8.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organiation and results of an international ringtest. **Chemosphere**, v. 46, p. 1117-1140, 2002.

RÖMBKE, J.; NOTENBOOM, J.; POSTHUMA, L. The effects of zinc on enchytraeids. The Budel case study. **Natura Jutlandica Occasional Papers**, v. 2, p. 54-67, 2002.

RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. M; PELOSI, C. Effects of organic pesticides on enchytraeids (Oligochaeta) in agroecosystems: laboratory and higher-tier tests. **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 20, 2017. DOI: 10.3389/fenvs.2017.00020.

RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P.; SCHOUTEN, T.; RIEPERT, F. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S61–S64, 2006b. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.016.

SALANITRO, J. P.; DORN, P. B.; HUESEMAN, M. H.; MOORE, K. O.; RHODES, I. A.; JACKSON, L. M. R.; VIPOND, T. E.; WESTERN, M.; WISNIEWSKI, H. L. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 1769-1776, 1997. DOI: 10.1021/es960793i.

SCHMELZ, R. M.; COLLADO, R. *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). **Carolinea**, v. 57, p. 93-100, 1999.

SCHMELZ, R. M.; NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; COLLADO, R. Diversity of terrestrial Enchytraeidae (Oligochaeta) in Latin America: current knowledge and future research potential. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p.13-20, 2013.

SCORIZA, R. N.; CORREIA, M. E. F. Ecotoxicologia e mesofauna do solo em área com histórico de derramamento de óleo na Floresta Nacional Ipanema. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 13, n. 1, p. 5495, 2018. DOI: 10.5039/agraria.v13i1a5495.

SCORIZA, R. N.; SILVA, A. D. P.; CORREIA, M. E. F.; LELES, P. S. D. S.; RESENDE, A. S. D. Herbicide use in degraded forest areas in restoration: effects on soil invertebrate biota. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1576-1584, 2005. DOI: 10.1590/01000683rbcs20150096.

SCOTT-FORDSMAN, J. J.; KROGH, P. H.; SCHAEFER, M.; JOHANSEN, A. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. **Ecotoxicology & Environmental Safety**, v. 71, p. 616-619, 2008. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.04.011.

SEGAT, J. C. **Avaliação ecotoxicológica da aplicação de dejeto liquido de suínos em solos subtropicais**. 2016. Tese (Doutorado em Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

SEGAT, J. C. **Avaliação ecotoxicológica do uso de dejetos de suínos em solos de Santa Catarina**. 2012. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SEGAT, J. C.; ALVES, P. R.; BARETTA, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Ecotoxicological evaluation of swine manure disposal on tropical soils in Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 91-97, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.07.017.

SILVA, R. F.; AQUINO, A. M.; MERCANTE, F. M.; GUIMARÃES, M. F. Populações de oligoquetos (Annelida: Oligochaeta) em um Latossolo Vermelho submetido a sistemas de uso do solo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 673-677, 2006. DOI: 10.1590/S0103-84782006000200051.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R.; RIZZO, A. C. L.; MOREIRA, J. C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 137-140, 2006.

SISINNO, C. L. S.; RIZZO, A. C. L.; BULUS, M. R.; ROCHA, D. A.; SORIANO, A. U.; VITAL, R. L.; MOREIRA, J. C. Application of ecotoxicological tests in a preliminary evaluation of soils treated on bioreactor. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 157-161, 2007.

SOUSA, A. P. A.; ANDRÉA, M. M. Earthworm (*Eisenia andrei*) avoidance of soils treated with cypermethrin. **Sensors**, v. 11, p. 11056-11063, 2011. DOI: 10.3390/s111211056.

SOUSA, A. P. A. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia - Instituto Biológico, São Paulo.

SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M.; VAN GESTEL, C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 588-606, 2003. DOI: 10.1078/0031-4056-00234.

STOJANOVIĆ, M.; KARAMAN, S.; MILUTINOVIĆ, T. Herbicide and pesticide effects on the earthworm species *Eisenia foetida* (Savigny, 1826)(Oligochaeta, Lumbricidae). **Archives of Biological Sciences**, v. 59, n. 2, p. 25-26, 2007. DOI: 10.1590/S0100-06832010000100006.

VAMPRÉ, T. M.; FUCILLO, R.; ANDRÉA, M. M. Oligoqueta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 59-66, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000100006.

WESTHEIDE, W.; GRAEFE, U. Two new terrestrial *Enchytraeus species* (Oligochaeta, Annelida). **Journal of Natural History**, v. 26, p. 479-488, 1992. DOI: 10.1080/00222939200770311.

WILLUHN, J.; SCHMITT-WREDE, H. P.; OTTO, A.; WUNDERLICH, F. Cadmium-detoxification in the earthworm Enchytraeus: specific expression of a putative aldehyde dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, n. 1, p. 128-134, 1996. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1321.

ZIRBES, L.; MESCHER, M.; VRANCKEN, V.; WATHELET, J. -P.; VERHEGGEN, F. J.; THONART, P.; HAUBRUGE, E. Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-6, e21927, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021927.

Ecotoxicologia terrestre e os instrumentos normativos e regulamentadores no Brasil

3

Cristina Lúcia Silveira Sisinno
Klaus Dieter Sautter
Cintia Carla Niva

3.1 Legislação ambiental no Brasil e o controle da poluição do solo

Pode-se dizer que o grande marco regulatório da questão ambiental, dentro da legislação brasileira, se deu por meio da aprovação da Política Nacional do Meio Ambiente (Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981) que tem como objetivo, citado no seu Artigo 2º:

> [...] a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental propícia à vida, visando assegurar, no País, condições ao desenvolvimento sócio -econômico, aos interesses da segurança nacional e à proteção da dignidade da vida humana [...] (Brasil, 1981).

estabelecendo, dentro de seus princípios, a racionalização do uso do solo, do subsolo, da água e do ar.

Em 1988, foi promulgada a Constituição Brasileira onde, em seu Capítulo VI ("Do Meio Ambiente"), artigo 225, é colocado o princípio:

> Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações [...] (Brasil, 1988a).

Apesar da preocupação com a preservação do meio ambiente, refletida entre outros, pela racionalização do uso do solo e subsolo, pouco tem sido feito na legislação brasileira, em relação ao controle da poluição do solo no Brasil. Pode-se citar a Lei nº 6.766, de 19 de dezembro de 1979 – sobre o parcelamento do solo urbano (Brasil, 1979), que define as competências do Estado e do Município sobre a questão do parcelamento do solo. A lei não permite o parcelamento do solo em áreas poluídas, principalmente devido às conseqüências à saúde pública, porém não visando à preservação do ecossistema.

No âmbito do registro de agrotóxicos no país, a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (Brasil, 1989) exige que os rótulos dos agrotóxicos contenham texto redigido em português com várias informações técnicas sobre a substância em questão e, também, aquelas relativas aos possíveis perigos ao homem e ao meio ambiente. O registro e rótulo do agrotóxico deverão ser aprovados em três instâncias: pelo Ministério da Agricultura quanto à eficiência do produto, pela Anvisa, quanto à avaliação toxicológica ao ser humano, e pelo Ibama, quanto à

avaliação ambiental. Esta última inclui a avaliação e classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) e também a Avaliação de Risco Ambiental (ARA) de agrotóxicos, seus componentes e afins. Os requisitos, procedimentos e diretrizes gerais para as avaliações constam na Portaria Ibama nº 84, de 15 de outubro de 1996 (Ibama, 1996), e material orientador pode ser encontrado no site do Ibama. Para a avaliação do PPA, testes relacionados a parâmetros físico-químicos, comportamento no solo e toxicidade a organismos não-alvo do produto são requeridos. Dentre os organismos do solo, os testes com micro-organismos (ciclo do nitrogênio e carbono) e com as minhocas (efeito agudo) são os normalmente requeridos, e também o teste de fitotoxicidade para plantas em alguns casos. Testes com organismos aquáticos (algas, crustáceos e peixes) e outros terrestres (abelhas e aves) também são requeridos para classificação do grau de periculosidade ambiental. A substância avaliada se enquadrará em uma das quatro classes de periculosidade ambiental considerando-se todos os parâmetros, como segue: Classe I- produto altamente perigoso; Classe II- produto muito perigoso; Classe III- produto medianamente perigoso; Classe IV- produto pouco perigoso.

Testes com organismos de solo (e outros organismos) também são requeridos, em algumas normativas como: para o registro de produtos bioquímicos (minhocas e microorganismos) (Brasil, 2005), para o registro de produtos à base de agentes microbiológicos (vegetais e minhocas) (Brasil, 2006b), para o registro de produtos semioquímicos (minhoca e microorganismos) (Brasil, 2006a), e para alteração de formulação (microorganismos) (Brasil, 2013).

Em 1998, a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 (Brasil, 1998), na sua Seção IV, prevê penas de reclusão de até cinco anos para quem...

> Art. 54 – Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora. (Brasil, 1998).

Ainda dentro da mesma lei, a comercialização de substância tóxica, perigosa ou nociva à saúde humana e ao meio ambiente, sendo penalizável com pena de reclusão, de um a quatro anos, e multa, para quem...

> Art. 56 – Produzir, processar, embalar, importar, exportar, comercializar, fornecer, transportar, armazenar, guardar, ter em depósito ou usar produto ou substância tóxica, perigosa ou nociva à saúde humana e ao meio ambiente em desacordo com as exigências estabelecidas em leis e nos seus regulamentos. (Brasil, 1998)

Somente em dezembro de 2009, uma nova legislação, em nível federal foi promulgada, contendo a preocupação de proteção do solo e do seu ecossistema. É a Resolução nº 420, 28 de dezembro de 2009, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) (Brasil, 2009), que em seu Art. 1º, "Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas". Já em seu Art. 3º, está descrito que a proteção do solo deve ser realizada de

maneira preventiva, a fim de garantir a manutenção da sua funcionalidade ou, de maneira corretiva, visando restaurar sua qualidade ou recuperá-la de forma compatível com os usos previstos. Importante notar que, em Parágrafo único do Art. 3º, a Resolução coloca como função principal do solo servir como meio básico para a sustentação da vida e de habitat para pessoas, animais, plantas e outros organismos vivos.

Apesar disso, a resolução não exige ensaios ecotoxicológicos com organismos para avaliação da contaminação do solo, mas a importância dos mesmos na determinação de valores de prevenção ou intervenção é implícita. Cesar et al. (2014) discutem sobre a importância de aspectos geoquímicos em relação às Resoluções nº 420 (Brasil, 2009) e n° 454 (Brasil, 2012) para a ecotoxicologia do solo no Brasil.

3.2 Ecotoxicologia terrestre no Brasil: Normas Técnicas

O início da padronização dos ensaios ecotoxicológicos no Brasil ocorreu em 1975 por meio de um programa internacional para a padronização de ensaios de toxicidade, entre a International Organization for Standardization (ISO) e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), onde foram desenvolvidos protocolos para avaliar efeitos de substâncias químicas e misturas tóxicas sobre organismos aquáticos (Zagatto; Bertoletti, 2006).

Em 1988, a extinta Secretaria Especial do Meio Ambiente (Sema) publicou o Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos, com descrição de 41 ensaios para avaliação da toxicidade e ecotoxicidade de substâncias químicas, já incluindo ensaios com minhocas *Eisenia fetida* em sílica gel em pó (teste D.5.1), assim como ensaios de biodegradabilidade, mobilidade e adsorção/dessorção de agentes químicos em solos. Todos os ensaios foram estabelecidos para se fazer a avaliação do comportamento de substâncias químicas no ambiente, com grande ênfase no comportamento de agrotóxicos. Os resultados desses ensaios começaram a ser pré-requisitos para registro de compostos químicos, principalmente agrotóxicos, junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), que os analisava e deliberava com vistas à sua comercialização, mas com o cuidado na proteção da saúde e do meio ambiente (Brasil, 1988b).

Os ensaios descritos no Manual haviam sido selecionados, adaptados e revisados por especialistas de diversas instituições brasileiras, convidados pela Sema para este fim. Pretendia-se que a revisão dos ensaios fosse feita periodicamente, mas, a partir da Portaria nº 139 do Ibama, de 21 de dezembro de 1994 (revogada pela Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996) (Ibama, 1996), as autoridades brasileiras passaram a aceitar os resultados obtidos a partir de métodos já estabelecidos em diretrizes internacionais, isto é, a ISO, a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) e a

Environmental Protection Agency (EPA). Passou-se a aceitar também os resultados obtidos por laboratórios credenciados ou reconhecidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Entendendo-se por credenciados, os laboratórios nacionais (oficiais ou privados), e reconhecidos, quando se trata de laboratórios estrangeiros.

Logo a seguir, em 1996, o Ibama estabeleceu os procedimentos a serem adotados para a avaliação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) de agrotóxicos, seus componentes e afins, descritos na Portaria Normativa Ibama nº 84, de 15 de outubro de 1996 (Ibama, 1996). A mesma Portaria também definiu os tipos de solos naturais para serem usados nos testes ecotoxicológicos (Ibama, 1996). Esses solos foram escolhidos porque suas características físicas e químicas abrangem as principais causas das diferenças no comportamento de agrotóxicos no ambiente edáfico e têm sido usados nos testes de mobilidade, adsorção/dessorção e de biodegradabilidade de agrotóxicos. Contudo, é necessário atualizar essa normativa em relação à classificação mais recente dos solos brasileiros (Santos et al., 2018). A seguir são listados os três solos recomendados e a sua classificação atual de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (em parênteses):

1. Latossolo Vermelho Escuro, distrófico ou álico, A moderado textura média (Latossolo vermelho, distrófico ou álico, A moderado textura média).
2. Latossolo Roxo distrófico ou álico, A moderado, textura argilosa (Latossolo vermelho distroférrico, A moderado, textura argilosa).
3. Glei Húmico, Tb, A proeminente, textura média (Gleissolo melânico, Tb, A proeminente, textura média).

Até o momento, esses solos foram utilizados somente em pesquisas acadêmicas em ensaios de ecotoxicidade aguda de agrotóxicos em minhocas (Sousa; Andréa, 2011) (ver capítulo 2). É necessário uma revisão crítica da utilidade e adequabilidade desses solos como substratos em ensaios com diferentes organismos edáficos. Na verdade, a construção de uma biblioteca com os solos agrícolas mais representativos (pois é onde os agrotóxicos seriam mais utilizados) do Brasil seria um avanço para auxiliar na determinação de limites de tolerância das diferentes espécies teste e na seleção daquelas mais indicadas para cada tipo de solo (Niemeyer et al., 2017). O Brasil é um país continental com diferentes condições edafoclimáticas que não devem ser ignoradas nos estudos de avaliação de risco ambiental.

Atualmente o registro de agrotóxicos no Brasil exige pelo menos 56 relatórios de diferentes estudos para o que o Ibama denomina de avaliação ambiental, dos quais 15 são requeridos para a classificação do PPA (Ibama, 2009). Desde 2011, a avaliação de risco ambiental (ARA) tem sido requerida apenas para o registro de substâncias novas. As recomendações para avaliação de risco seguem o modelo norte-americano atualmente (Santos, 2012). Contudo, esse modelo não inclui dados com organismos do solo. O Ibama se baseia em dados de efeito agudo e de reprodução para a avaliação de risco com minhocas, mas

os métodos ainda não estão bem estabelecidos e devem ser discutidos com o meio científico.

Em abril de 2018, uma reunião técnica promovida pela FAO com a presença de representantes de países como a Alemanha, Portugal, China, África, Canadá e Brasil discutiu o uso de organismos de solo na avaliação de risco ambiental para o registro de agrotóxicos. O objetivo da reunião foi definir recomendações gerais de procedimentos para realizar a avaliação de risco em países em desenvolvimento, em grande parte de clima tropical, como parte do aplicativo da FAO denominado "Pesticide Registration Toolkit". Esse aplicativo servirá como ferramenta de apoio para autoridades registrantes de países do mundo todo e está parcialmente disponível (http://www.fao.org/pesticide-registration-toolkit/en/). O módulo sobre os organismos de solo será disponibilizado em breve.

Apesar da exigência da avaliação de risco ambiental estar respaldada legalmente para o caso dos agrotóxicos, ainda existem dificuldades em implementar um esquema de avaliação adequado às condições brasileiras, devido a lacunas no conhecimento e ausência da definição de objetivos de proteção claros, ou seja, qual função ecológica ou serviço ecossistêmico, ou ainda, qual espécie-chave deve ser protegida para um determinado tipo de uso da terra. Essa definição deverá ser fruto da discussão entre vários setores, incluindo o meio científico, órgãos governamentais, setor produtivo e outras partes interessadas.

Desde 2002, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), como representante oficial no Brasil da ISO, International Eletrotechnical Comission (IEC), e das entidades de normalização regional Comissão Panamericana de Normas Técnicas (Copant) e Associação Mercosul de Normalização (AMN), passou a traduzir várias normas internacionais. Entre elas, a Norma ABNT NBR 15.537, de 2007 (atualizada em 2014), já aceita pelo Inmetro, trata especificamente da avaliação de ecotoxicidade aguda em minhocas, para ser feita com solo artificial e com solos naturais (ABNT, 2014a).

Com o objetivo de auxiliar na divulgação das normas de qualidade de solo com organismos terrestres, em 2007 a Comissão de Análises Ecotoxicológicas da ABNT, grupo aberto para participação de profissionais da área e cujos integrantes são voluntários, começou a traduzir uma série de normas da ISO relacionadas com Ecotoxicologia Terrestre, que têm sido publicadas como normas ABNT/NBR ou ABNT/NBR/ISO (Niemeyer et al., 2017). Um breve panorama da regulamentação para o registro de agrotóxicos em relação aos organismos do solo enquanto organismos não alvo está descrito em Niva et al. (2016).

Até o momento as normas publicadas em português são as seguintes:

1. ABNT NBR 15537. Ecotoxicologia terrestre – Ecotoxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (ABNT, 2014a) (publicação da primeira versão em 2007).
2. ABNT NBR ISO 11269-2. Qualidade do solo – Determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre. Parte 2: Efeitos de substâncias químicas na

emergência e no crescimento de vegetais superiores (ABNT, 2014b) (publicação da primeira versão em 2009).

3. ABNT NBR ISO 17616. Qualidade do solo – Guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo (ABNT, 2010).
4. ABNT NBR ISO 17512-1. Qualidade do solo – Ensaio e fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*) (ABNT, 2011a).
5. ABNT NBR ISO 11267. Qualidade do solo – Inibição da reprodução de Collembola (*Folsomia candida*) por poluentes do solo (ABNT, 2011b).
6. ABNT NBR ISO 15799. Qualidade do solo – Guia para a caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo (ABNT, 2011c).
7. ABNT NBR ISO 16387. Qualidade do solo – Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. (ABNT, 2012).

Atualmente, uma norma de avaliação de risco ecológico está em discussão na ABNT.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2014a. 11 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 11267**: qualidade do solo: inibição da reprodução de Collembola (*Folsomia candida*) por poluentes do solo. Rio de Janeiro, 2011b. 18 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 11269-2**: qualidade do solo: determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre: parte 2: efeitos de substâncias químicas na emergência e no crescimento de vegetais superiores. Rio de Janeiro, 2014b. 12 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 15799**: qualidade do solo: guia para a caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo. Rio de Janeiro, 2011c. 42 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. 2012. 29 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 17512-1**: 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, 2011a. 26 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 17616**: qualidade do solo: guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo. Rio de Janeiro, 2010. 11 p.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil, de 5 de outubro de 1988**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm>. Acesso em: 9 ago. 2011.

BRASIL. **Lei 6.766, de 19 de dezembro de 1979**. Dispõe sobre o parcelamento do solo urbano e dá outras providências. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6766.htm>. Acesso em 9 de agosto de 2011.

BRASIL. **Lei 6.938, de 31 de agosto de 1981**. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938.htm>. Acesso em: 9 ago. 2011.

BRASIL. **Lei 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9605.htm>. Acesso em: 9 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa conjunta nº 1, de 23 de janeiro de 2006. Norma específica para fins de registro de produtos semioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa conjunta nº 1, de 18 de abril de 2013. Estabelecer critérios e procedimentos para alteração de formulação de agrotóxicos e afins registrados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa conjunta nº 3, de 10 de março de 2006. Norma específica para fins de registro de produtos microbiológicos que se caracterizem como produtos técnicos, agrotóxicos e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 mar. 2006b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa conjunta nº 32, de 26 de outubro de 2005. Norma específica para fins de registro de produtos bioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 nov. 2005.

BRASIL. Ministério do Interior. Secretaria Especial do Meio Ambiente. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF: IBAMA. 1988b. 351 p.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BRASIL. **Resolução CONAMA Nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BRASIL. Resolução CONAMA Nº 454 de 1 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 66, 8 nov. 2012.

CESAR, R. G.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E. D.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. **(Eco)toxicologia de metais em solos**: Conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental. Rio de Janeiro: CETEM, 2014. 100 p. (Série tecnologia ambiental, 1).

IBAMA. **Manual para requerimento de avaliação ambiental**: agrotóxico e afins. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/avaliacao/2017/2017-07-25-manual_de_procedimento_agrotoxicos_ibama_2009-11.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2011.

IBAMA. **Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em:<http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2011.

NIEMEYER, J. C.; CHELINHO, S.; SOUSA, J. P. Soil ecotoxicology in Latin America: current research and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1795-1810, 2017. DOI: 10.1002/etc.3792.

NIVA, C. C.; NIEMEYER, J. C.; JÚNIOR, F. M. R. D. S.; NUNES, M. E. T.; DE SOUSA, D. L.; ARAGÃO, C. W. S.; SAUTTER, K.D.; ESPINDOLA, E. G.; SOUSA, J. P.; RÖMBKE, J. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11363-11378, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6597-1.

SANTOS, H. G. DOS; JACOMINE, P. K. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

SANTOS, M. M. **Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos no Ibama**. 2012. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/avaliacao/2017/2017-07-25-avaliacao_risco_ambiental_agrotoxicos_ibama_2012-ARA.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2013.

SOUSA, A. P. A. D.; ANDRÉA, M. M. D. Earthworm (*Eisenia andrei*) avoidance of soils treated with cypermethrin. **Sensors**, v. 11, p. 11056-11063, 2011. DOI: 10.3390/s111211056.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 464 p.

Foto: Marie Luise Carolina Bartz

Parte 2

Métodos de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas

Criação e manutenção dos organismos

4

Gustavo Schiedeck
Amarildo Pasini
Paulo Roger Lopes Alves
Cintia Carla Niva
Katy Cantelli
Andressa Cristhy Buch
George Gardner Brown
Jorge Domínguez Martin

A criação de populações de minhocas para ensaios laboratoriais possui características diferenciadas das criações voltadas à produção de húmus. O objetivo maior é a obtenção constante e em quantidade de indivíduos saudáveis, com baixa variabilidade em idade, tamanho e biomassa.

Os principais protocolos internacionais para a realização de ensaios ecotoxicológicos com minhocas recomendam a utilização das espécies *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), *Eisenia andrei* Bouché, 1972 e *Lumbricus terretris* Linneaus, 1758 (OECD, 1984; ISO, 1993; 1998; Canada, 2004). Contudo, *L. terrestris* é encontrada somente em regiões de clima temperado, e nunca foi coletada no Brasil (Brown; James, 2007). Além disso, a espécie precisa ser criada a temperaturas de 15-20 °C, possui um ciclo de vida mais longo e produz menos casulos por indivíduo (150-240 dias, 3-6 casulos por indivíduo por mês; Butt et al., 1992, 1994; Butt, 2011) em cativeiro, comparada às espécies epigêicas *E. fetida* e *E. andrei* (Domínguez; Edwards, 2010), dificultando sua aplicabilidade em ensaios ecotoxicológicos na região tropical.

Outras espécies encontradas no Brasil e em regiões tropicais e sub-tropicais também já foram usadas em ensaios ecotoxicológicos, por exemplo: *Amynthas gracilis* (Kinberg, 1867), *Amynthas corticis* (Kinberg, 1867), *Metaphire californica* (Kinberg, 1867), *Polypheretima elongata* (Perrier, 1872), *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872), *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857), *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867) e *Dichogaster annae* (Horst, 1893) (Chang; Bruno, 1970; Morowati, 2000; Mostert, 2001; Mostert et al., 2002; Awaknavar; Karabhantanal, 2004, 2005; Koria; Thangaraj, 2011; Uma Maheswari et al., 2002; An, 2005; An; Lee, 2008; Gupta et al., 2006, 2010; Maboeta et al., 1999; Fourie et al., 2007; De Silva; van Gestel, 2009; De Silva et al. 2010; Jasmine et al., 2008; James; Guimarães, 2010; Cantelli, 2011; Buch et al., 2013, 2017; Khalil, 2013; Duarte et al., 2014; Khalil, 2015; Parelho et al., 2018). Contudo, considerando os resultados disponíveis na literatura, bem como a facilidade de criação em cativeiro, a presença e a facilidade de obtenção no Brasil, atualmente, entre todas estas espécies citadas, pode-se recomendar apenas *Eudrilus eugeniae*, *P. excavatus*, *P. corethrurus* e *A. gracilis* para ensaios ecotoxicológicos no Brasil.

Para ensaios ecotoxicológicos com enquitreídeos, as espécies mais comumente utilizadas são *Enchytraeus albidus* Henle, 1837 e *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992, mas outras espécies do gênero *Enchytraeus* também têm sido utilizadas em testes ecotoxicológicos no Brasil e no exterior (Römbke, 2003; Assis, 2015; Niva et al., 2016). As primeiras duas espécies não são encontradas naturalmente em solos brasileiros (Schmelz et al., 2013) e *E. albidus* está adaptada a temperaturas mais baixas de criação (15-20 °C), típicas de regiões de clima temperado (Römbke, 1995), sendo, portanto, menos viável sua criação e manutenção em cativeiro sob condições climáticas brasileiras. Entretanto, *E. crypticus* é mantida em laboratórios de diversas instituições no país para fins ecotoxicológicos (Niva et al., 2016). Os enquitreídeos estão amplamente presentes em solos brasileiros e é possível que existam outras espécies, tanto nativas quanto exóticas, com potencial para uso em ensaios ecotoxicológicos, porém esse grupo de organismos ainda é pouco conhecido no Brasil e, em geral, na América Latina carecendo de estudos (Schmelz et al., 2013).

A seguir, são detalhadas as características morfológicas que podem ser usadas para identificar tanto as espécies padrão quanto as demais espécies recomendadas de minhocas e enquitreídeos, bem como os métodos mais indicados de criação e manutenção em condições de laboratório para os ensaios ecotoxicológicos.

4.1 *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*

4.1.1 Características gerais e identificação

As espécies paleárticas *E. andrei* e *E. fetida* são minhocas supostamente originárias da Europa ou países do Noroeste Asiático (Blakemore, 2002, 2013), mas são comumente conhecidas como "vermelha da Califórnia". Estas são espécies pequenas, com 3 cm a 13 cm de comprimento e de 2 mm a 6 mm de diâmetro na idade adulta (Tabela 4.1). O prostômio é do tipo epilobo e o clitelo é em forma de sela, cobrindo entre 6 e 8 anéis, em geral entre o 25º e o 33º segmentos. Os poros masculinos são pareados no 15º segmento, entre a linha de cerdas b e c, apresentando uma pequena intumescência ovalada. Maiores detalhes para a identificação das espécies se encontram na Tabela 4.1.

A principal diferença morfológica entre as duas espécies é a presença de bandas ou listras amareladas entre os segmentos de *E. fetida*, correspondendo a uma área sem pigmentação (Figura 4.1A). Daí o nome comum às vezes de minhoca "tigrada". A despigmentação e as listras são mais evidentes dorsalmente. Essas listras estão ausentes em *E. andrei* que possui pigmentação avermelhada contínua (Figura 4.1B). Outra diferenciação prática entre as espécies está na mobilidade, uma vez que a *E. fetida* se desloca com maior rapidez à procura de um refúgio em comparação com a *E. andrei* quando é retirada

Tabela 4.1. Características externas e internas de minhocas das espécies *Eisenia andrei* e *E. fetida* (Blakemore, 2002).

Caracteres externos	***Eisenia andrei***	***Eisenia fetida***
Pigmentação	Avermelhada dorsalmente	Avermelhada dorsalmente, mas com bandas sem pigmentação (amareladas) nos intersegmentos
Comprimento	2,7-13 cm	
Diâmetro	2-6 mm	
Segmentos	65-131	
Prostômio	Epilóbico	
Cerdas	Organização tipo Lumbricina com 4 pares, estreitamente pareadas	
Clitelo	Em forma de sela, nos segmentos 24/27-31/34	
Traves pubertais	Presentes, geralmente nos segmentos 28-30	
Marcas genitais	Frequentemente nos segmentos 8-12; e 27-35	
Poros dorsais	Presentes e pequenos, iniciando em 3/4-5/6	
Poros espermatecais	Dois pares dorsais, em 9/10 e 10/11	
Poros femininos	No segmento 14	
Poros masculinos	Pareados, no segmento 15, em forma oval	
Caracteres internos		
Moela	No segmento 27	
Glândula calcífera	No segmento 11	
Cêgos intestinais	Ausentes	
Tiflosol	Início nos segmentos 20-23, final nos segmentos 60-109	
Nefrídeos	Vesículas em formato de salsicha, sem dutos definidos	
Corações	Nos segmentos 7-11	
Espermatecas	Nos segmentos 9 e 10	
Testículos	Nos segmentos 10 e 11	
Vesículas seminais	Nos segmentos 9-12	

Foto: Jörg Römbke

Foto: Jorge Domínguez

Figura 4.1. Aspectos morfológicos externos de *E. fetida* (A) e *E. andrei* (B). A coloração externa de ambas é parecida (avermelhada), porém diferem pelo fato de *E. fetida* possuir listras amareladas bastante evidentes nos espaços inter-segmentares enquanto *E. andrei* possui coloração avermelhada contínua.

do substrato onde se encontra, possivelmente devido a maior sensibilidade à luz (comunicação pessoal[1]). Finalmente, as espécies também podem ser separadas geneticamente, usando o código de barras do DNA (DNA barcode), uma região do gene Citocromo Oxidase I comumente utilizado para identificação de animais, incluindo as minhocas (Pérez-Lozada et al., 2005; Römbke et al., 2016). Contudo, existe ainda certa controvérsia taxonômica enquanto à validade da espécie *E. andrei* (Blakemore, 2013), já que existem diversas linhagens crípticas de *E. fetida* (Pérez-Lozada et al., 2005; Römbke et al., 2016). Para os fins dessa publicação, mantemos as espécies *E. andrei* e *E. fetida* como distintas com base em dados biológicos e genéticos (Domínguez et al., 2005), mas consideramos a forma de criação e manutenção das duas conjuntamente, já que os métodos para tal são similares.

[1] Comunicação pessoal fornecida por Afrânio Guimarães, junho de 2006.

Em pilhas de compostagem na Europa, essas duas espécies frequentemente ocorrem juntas e podem se cruzar, às vezes gerando descendentes férteis na primeira geração (F1) (Domínguez; Pérez-Lozada, 2010). Contudo, se esses descendentes se cruzarem novamente, os descendentes são estéreis (F2), e por isso foram consideradas por Domínguez et al. (2005) como espécies biológicas diferentes. No Brasil, *E. andrei* predomina em minhocários comerciais e não há constatação validada até o momento de minhocário comercial criando *E. fetida* no país. Sabe-se da existência de apenas um criadouro comercial (Minhobox) que mantém *E. fetida* estritamente para fins de pesquisa.

Ambas as espécies de minhocas toleram faixas amplas de temperatura e umidade, o que as tornam muito resistentes e fáceis de criar com sucesso em diversos ambientes e com diferentes alimentos. Com relação aos aspectos biológicos, Domínguez; Edwards (2010) apresentam uma relação abrangente de características das espécies. Mesmo sendo de clima temperado, a temperatura ótima de desenvolvimento é de 25 °C. Acima de 33,3 °C as minhocas podem apresentar alta mortalidade, enquanto abaixo de 10,3 °C a produção de casulos é suspensa, e a mortalidade pode ser alta a 0 °C. Apesar desse limite inferior, tem-se verificado a sobrevivência sem prejuízos aparentes de minhocários a céu aberto sujeitos à exposição de fortes geadas no Rio Grande do Sul (dados não publicados). Quanto à umidade do substrato, os limites inferior e superior estão entre 70% e 90%, sendo os valores ótimos entre 80% e 85%.

As minhocas dessas espécies têm uma expectativa de vida ao redor de 4,5 a 5 anos. O peso médio dos adultos de ambas as espécies é de aproximadamente 0,55 g, mas alguns indivíduos podem alcançar pesos de até 2,5 g dependendo do substrato e da densidade populacional (Siddique et al., 2005). Em condições ótimas de crescimento e desenvolvimento, o ciclo de vida das duas espécies, do momento em que é depositado o casulo até a produção de casulos pela geração seguinte, varia entre 48 a 65 dias (Figura 4.2). Contudo, a espécie *E. andrei* atinge a maturidade sexual entre os 21 e 28 dias, enquanto na *E. fetida* essa fase é atingida entre 28 e 30 dias (Domínguez; Gómez-Brandón, 2010).

A cópula ocorre próxima à superfície do alimento e a liberação do primeiro casulo se dá cerca de 48 horas após. Cada indivíduo produz entre 0,35 a 0,50 casulos por dia, sendo o tempo de incubação até o início da eclosão variável

entre 18 e 26 dias (Figura 4.2). Nas duas espécies a taxa de viabilidade de eclosão oscila entre 72% e 80%, sendo o número médio de descendentes estimado entre 2,5 e 3,8 por casulo, variando conforme a temperatura (Domínguez; Edwards, 2010).

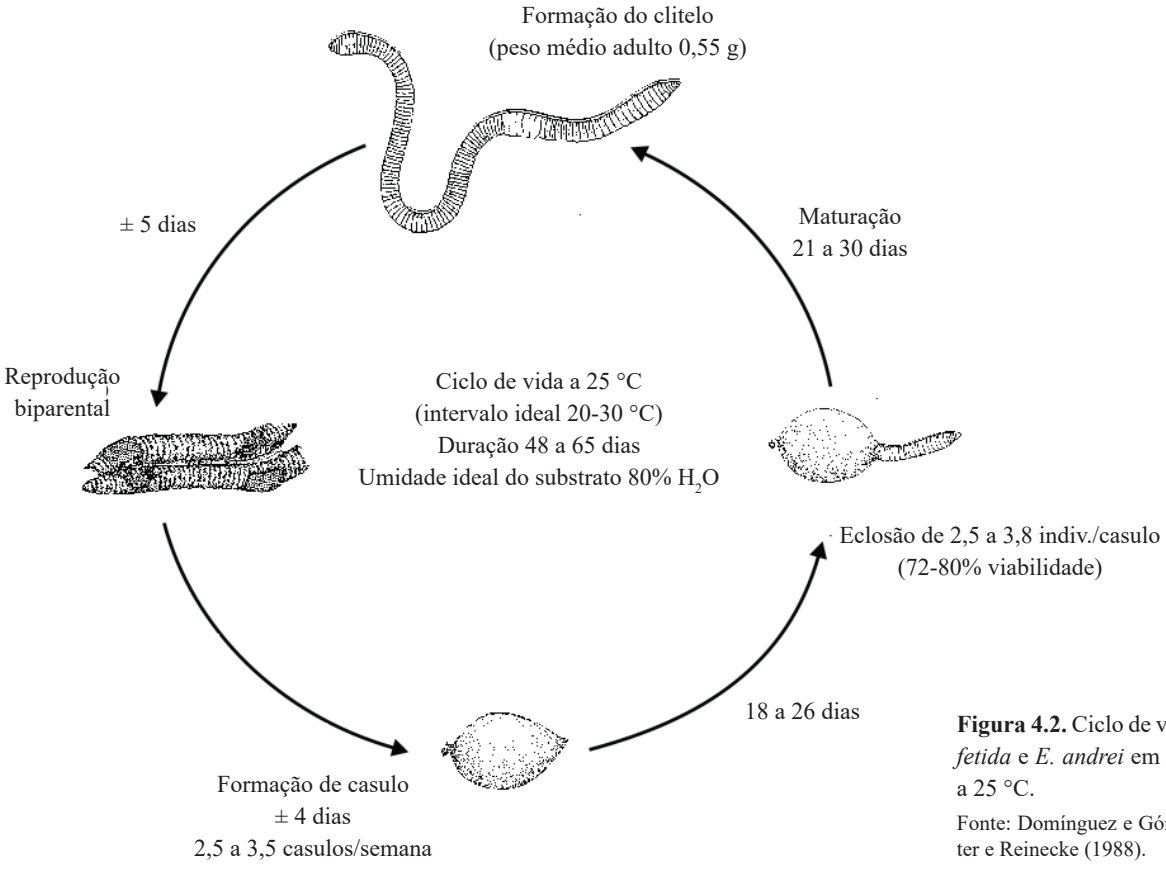


Figura 4.2. Ciclo de vida das espécies *Eisenia fetida* e *E. andrei* em esterco animal (bovino) a 25 °C.

Fonte: Domínguez e Gómez-Brandón (2010); Venter e Reinecke (1988).

4.1.2 Obtenção de matrizes, aclimatação e sincronização da população de *E. andrei* e *E. fetida*

As matrizes das minhocas que serão criadas para os ensaios ecotoxicológicos devem ser obtidas preferencialmente junto a institutos de pesquisa, laboratórios ou empresas capazes de garantir a confirmação da espécie. Também é importante que as minhocas sejam provenientes de uma mesma população, criadas sob as mesmas condições.

Algumas empresas, além de minhocas, comercializam também os casulos. Isso pode ser uma facilidade na hora de iniciar uma criação para ensaios ecotoxicológicos, porém é importante que os casulos sejam provenientes de uma mesma população de minhocas.

Ao receber as primeiras matrizes no laboratório, antes de colocá-las na caixa de criação, é necessário verificar sua aceitação ao novo alimento. Uma mudança mais brusca da fonte ou matéria-prima do alimento às vezes pode causar uma

Fotos: Gustavo Schiedeck

Figura 4.3. Introdução das minhocas no alimento (A) e formas de evitar dispersão ou fuga das minhocas do recipiente (B, C). Cobertura com TNT fixado com elástico (B) e Recipiente aberto em cima de um tijolo numa bandeja com água (C).

reação inicial nas minhocas, expressa na perda de biomassa ou tentativas de fuga de alguns indivíduos. Essa reação é normal, porém, em alguns casos, pode haver um fator desconhecido que ocasionará grande mortalidade da população, repercutindo em custos e atrasos nos testes.

Os alimentos mais utilizados na criação de minhocas para ensaios ecotoxicológicos são os estercos, tanto de bovinos quanto equinos. Os estercos variam muito sua composição, conforme idade, raça, espécie, sistema de criação, podendo ser mais ricos em algum nutriente, mais ácidos ou alcalinos, ou ainda possuírem alguma substância tóxica desconhecida. Assim, é conveniente verificar de forma rápida, por meio de um teste preliminar, a aceitação das minhocas ao alimento (Figura 4.3). Embora não seja cientificamente validado, esse teste tem sido proposto por diversos autores de manuais de Minhocultura pela sua praticidade e rapidez de resposta (Ferruzzi, 1989; Rodríguez et al., 2003; Morselli, 2009), e deve ser realizado sempre que houver alteração no fornecedor tradicional do alimento ou quando existir dúvida quanto às suas propriedades e composição.

Conforme procedimento descrito por Schiedeck et al. (2010), coloca-se uma amostra representativa de 300 g a 500 g do alimento a ser avaliado em um recipiente e, sobre sua superfície, um número conhecido de minhocas, entre 10 e 20 indivíduos adultos (Figura 4.3A). Devem-se deixar as minhocas entrarem espontaneamente no alimento e tapar o recipiente com um pedaço de Tecido Não Tramado (TNT) fixado com barbante ou elástico (Figura 4.3B), ou colocar o recipiente sobre um objeto maciço em uma bacia com lâmina água de 2 cm a 3 cm (Figura 4.3C). Esse procedimento facilita a aferição do método e evita que as minhocas, em caso de fuga, se dispersem pelo local.

Após 24 horas, o recipiente com o alimento deve ser virado sobre uma superfície e contado o número total de minhocas. A presença de todos os indivíduos no interior do alimento colocados no dia anterior indica, num primeiro momento, a aceitação por parte das minhocas do alimento. Contudo, se houver minhocas nas paredes do recipiente, tentando escapar pelo TNT ou mortas na água da bacia, possivelmente há algum problema no alimento e este não deve ser utilizado (Figura 4.4).

No entanto, apenas a presença das minhocas no alimento não basta para concluir sobre suas condições, pois em alguns casos as minhocas podem permanecer no alimento devido a uma intoxicação aguda que não lhes permitiu fugir. É muito difícil saber o real motivo que pode provocar uma intoxicação desse nível, mas resíduos de agrotóxicos, antibióticos ou vermífugos veterinários, substâncias ácidas ou metais pesados são algumas possibilidades. De acordo com Schiedeck et al. (2010), a observação do comportamento e aspecto das minhocas é tão importante quanto o próprio número de indivíduos contados, sendo que alguns critérios podem auxiliar nessa avaliação subjetiva:

- Lentidão ou ausência de movimentos.
- Minhocas agrupadas em um ponto específico do alimento.
- Minhocas mortas no interior ou na superfície do alimento.

Fotos: Gustavo Schiedeck

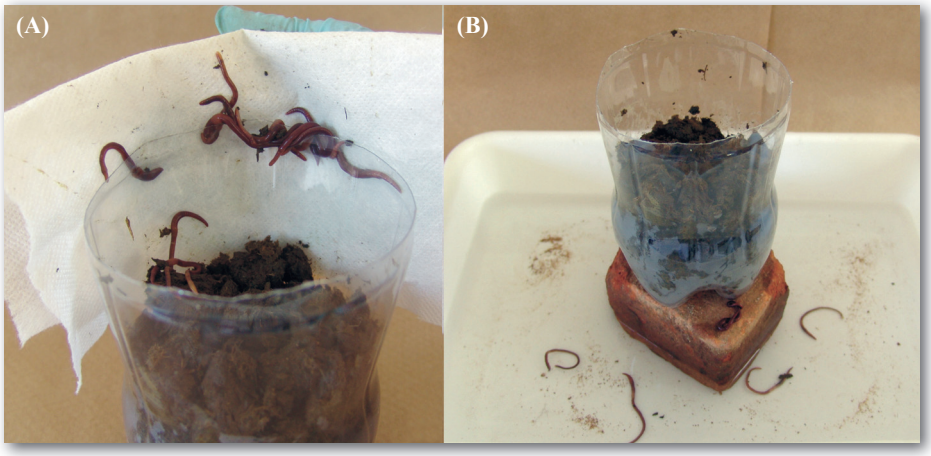


Figura 4.4. Fuga de minhocas do recipiente com alimento. (A) As minhocas tendem a ficar presas no Tecido Não Tramado (TNT), próximas à borda do recipiente; (B) Minhocas mortas na água da bandeja.

- Cheiro desagradável no alimento ou nas minhocas.
- Corpo amolecido além do normal.
- Regiões do corpo inchadas ou com aspecto sanguinolento.

Uma vez determinada a aceitação do alimento, as matrizes de minhocas adquiridas já podem ser separadas manualmente dos resíduos do alimento anterior. Neste momento podem ser colocadas sobre o novo alimento acondicionado em caixas plásticas do tipo "organizador", com tampa perfurada. Essa é uma etapa que precede a sincronização das populações de minhocas que serão utilizadas nos testes ecotoxicológicos.

A forma mais fácil de realizar a sincronização é através dos casulos produzidos. De acordo com os parâmetros reprodutivos e nas condições ótimas de criação, como citadas anteriormente, uma caixa com 100 indivíduos adultos (com clitelo aparente) deve produzir entre 520 e 750 casulos a cada 15 dias. Esse é o período limite de dias para a separação dos casulos da caixa das matrizes, uma vez que a eclosão ocorre entre 18 e 26 dias. As caixas com as matrizes devem ser vasculhadas e os casulos separados manualmente, com cuidado para não serem danificados. Esses casulos podem ser ainda classificados e agrupados conforme sua coloração, sendo os mais novos de coloração leitosa clara e opacos, os de coloração amarelo-ouro escura os mais antigos.

Após a separação, os casulos devem ser transferidos para as caixas de criação o quanto antes, para evitar sua desidratação. Os casulos devem ser acomodados na superfície do alimento e, sobre eles, colocada uma camada de um ou dois centímetros do alimento, que não deve ser compactada. Para uma estimativa de povoamento das caixas, a cada 100 casulos são esperados entre 250 e 380 indivíduos a cada 18 a 26 dias.

Alternativamente, pode-se colocar uma quantidade exata de minhocas adultas (ex. 100 ou 150) em um substrato novo, sem nenhuma minhoca. Após cerca de um mês, retiram-se todos os indivíduos adultos, aguarda-se que todos os casulos eclodam e os juvenis cresçam até idade adulta (o que deve acontecer

em aproximadamente 2 meses a 25 °C) para serem utilizados nos ensaios ecotoxicológicos.

O número total de caixas irá variar conforme a necessidade de indivíduos para a execução dos ensaios ecotoxicológicos e a capacidade de cada caixa. Em alguns laboratórios são mantidas até mais de 30 caixas durante os momentos de maior demanda de ensaios.

4.1.3 Aspectos gerais da criação de *Eisenia andrei* e *E. fetida*

4.1.3.1 Instalação e materiais

A criação das minhocas deve ser realizada, preferencialmente, em uma área isolada do laboratório para prevenir eventuais contaminações decorrentes da armazenagem, manipulação ou preparo de amostras e substâncias a serem utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos.

Os materiais utilizados na criação das minhocas como caixas, recipientes, borrifadores ou instrumentos de jardinagem devem sempre ser mantidos limpos e nunca serem utilizados para outra finalidade. É importante evitar a utilização de materiais metálicos na criação, como cobre, zinco, bronze, ou até mesmo borracha natural. Os objetos e instrumentos devem ser confeccionados de elementos não tóxicos como vidro, nylon, plástico, teflon e fibra de vidro (Canada, 2004).

Os recipientes de criação mais comumente usados nos laboratórios são caixas plásticas do tipo "organizador" (Figura 4.5). As caixas e tampas devem ser transparentes ou translúcidas para forçar a permanência das minhocas no alimento e desestimular fugas. As tampas devem ser perfuradas ou possuir orifícios que permitam a troca gasosa com o exterior. Esses orifícios devem ser fechados com tecidos tais como nylon, TNT ou voal para evitar fugas.

As caixas plásticas nas quais serão criadas as minhocas podem ter diversos formatos e tamanhos, no entanto deve-se pensar sempre em aspectos como praticidade de armazenagem, facilidade de manipulação e capacidade volumétrica. Os protocolos internacionais para a criação de minhocas recomendam caixas com capacidade que variam entre 10 L e 50 L (ISO, 1998; ASTM, 2004; OECD, 2004; Canada, 2004). Contudo, caixas com grande capacidade tornam-se pesadas de serem movidas e caixas muito largas são difíceis de serem acomodadas em prateleiras convencionais. As caixas também não devem ser muito profundas, pois isso provoca a compactação do alimento e dificulta a manipulação do alimento e de minhocas. De forma geral, caixas com capacidade entre 10 L e 15 L ou dimensões próximas a 35 cm de comprimento, 25 cm de largura e 15 cm de altura, parecem ser mais apropriadas à criação das minhocas no laboratório.

No entanto, essas dimensões devem ser decididas pela equipe do laboratório, levando em consideração suas particularidades e demandas de ensaios para realizar.

Fotos: Paulo Roger Lopes Alves

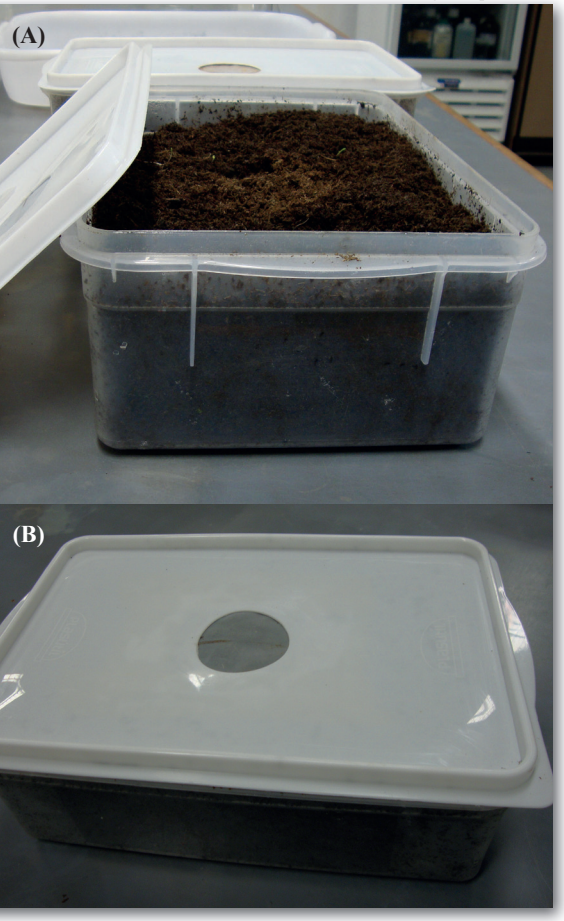


Figura 4.5. Modelo de caixa de plástico para criação de *Eisenia andrei* e *E. fetida*.

4.1.3.2 Ambiência: iluminação e temperatura

Com relação às condições ambientais de criação, a luz e a temperatura assumem uma importância mais destacada. A norma do ensaio agudo com minhocas atualizada da ABNT (ABNT, 2014) e a ISO 11268-2:2012 (ISO, 2012) recomendam que se utilize a temperatura de 25 °C ou 26-28 °C, respectivamente, que são mais próximas da realidade tropical e também mais próximas do ótimo para ambas as espécies de *Eisenia*.

Uma medida que pode auxiliar no monitoramento da temperatura é a colocação de termômetros nas caixas com alimento e um termômetro ambiental em local próximo às caixas de criação. O acompanhamento de ambas as leituras facilita a determinação de uma curva térmica do alimento na caixa em função da temperatura do ar, e, dessa forma, o manejo do climatizador de ar no laboratório.

As condições de iluminação na criação das minhocas não são indicadas em alguns protocolos. Contudo, a Environment Canada (Canada, 2004) recomenda um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, ou ainda 12 horas de luz e 12 horas de escuro. A iluminação deve ser realizada com uma intensidade luminosa de 400-800 lux, que pode ser alcançada com lâmpadas incandescentes ou fluorescentes. As lâmpadas não devem ficar muito próximas das caixas, pois podem provocar ressecamento ou aquecimento do alimento nas camadas superficiais, prejudicando o desenvolvimento e reprodução das minhocas. A adequação da luz no local de criação das minhocas pode ser verificada através de um luxímetro, que é um aparelho portátil relativamente simples e de baixo custo.

4.1.3.3 Alimentos e manejo da alimentação

As minhocas das espécies *E. fetida* e *E. andrei* se alimentam de praticamente qualquer resíduo orgânico, seja de origem domiciliar, agrícola ou industrial (Garg et al., 2006), estercos de animais (Garg et al., 2005), lodo de esgoto ou resíduos vegetais (Silva et al., 2002). Porém, em alguns casos, as características do alimento inviabilizam seu aproveitamento, como: a necessidade de compostagem prévia, a atração de insetos, sazonalidade de obtenção, a formação de odores desagradáveis ou a contaminação por substâncias tóxicas. Dessa forma, pode-se elencar algumas características importantes para a escolha do alimento que servirão de base para a criação das minhocas para os ensaios laboratoriais:

1. Usar material orgânico de fácil obtenção, de baixo custo e disponível ao longo de todo ano.
2. Apresentar uniformidade dentro e entre diferentes lotes adquiridos do material orgânico.
3. Poder ser armazenado sem perder as características.
4. Não gerar odores ou apresentar potencial de atrair insetos.
5. Ser isento de contaminações físicas, químicas ou biológicas capazes de comprometer a população de minhocas, interferir nos resultados dos ensaios ou colocar em risco a saúde dos técnicos que o manuseiam.

Como estas espécies de minhocas vivem na superfície de solos com grande quantidade de matéria orgânica, é natural que a criação ocorra em um ambiente rico em compostos orgânicos (Edwards, 2004). Há uma grande variedade de alimentos que podem ser utilizados para a criação das minhocas destinadas aos ensaios ecotoxicológicos, mas em geral, são recomendadas misturas de esterco equino ou bovino com turfa, na proporção de 1:1 (ISO, 1998; OECD, 2004). No Brasil, utiliza-se o mesmo pó da fibra da casca de coco utilizado no preparo do solo artificial. A Environment Canada (Canada, 2004) recomenda a preparação de um alimento à base de esterco, turfa, argila, esfagno e solo artificial, ou ainda a mistura de papel jornal ou papel toalha picados, não pintados e nem clareados, com solo artificial e húmus de minhoca.

Embora os estercos sejam os alimentos mais utilizados na criação de minhocas, outra possibilidade interessante é a borra de café. Em geral, as cafeterias localizadas nos centros urbanos produzem grandes quantidades desse resíduo, podendo em alguns casos ultrapassar 20 kg diários. Nesse caso, a logística para conseguir o material é muito mais fácil, além de ser um resíduo mais higiênico, de odor mais agradável para manter no ambiente laboratorial, com baixa carga biológica e de grande homogeneidade dentro e entre os lotes adquiridos. A utilização da borra de café como alimento em minhocários é relativamente usual em trabalhos científicos com os mais distintos objetivos (Huber et al., 2006; Castilhos et al., 2008; Adi; Noor, 2010). Contudo, ainda são necessários alguns estudos para confirmar a melhor forma de aproveitamento desse material nessa situação específica, pois existe a possibilidade da cafeína, ou outra substância presente na borra, influenciar o comportamento das minhocas e mascarar os resultados dos ensaios ecotoxicológicos.

Pela praticidade na aquisição e fácil aceitação das minhocas, no Brasil recomenda-se a utilização dos estercos, especialmente o equino. A principal recomendação com relação a essa fonte de alimento é que estes procedam preferencialmente de animais criados em sistemas orgânicos ou que não tenham sido tratados com promotores de crescimento, nematicidas ou produtos veterinários similares (OECD, 2004). Quanto a esse quesito, há uma dificuldade inerente no que diz respeito à identificação dos compostos químicos residuais que possam estar presentes no esterco. Além disso, a preferência por estercos de animais de sistemas orgânicos de criação pode restringir sobremaneira os fornecedores habilitados, uma vez que esses empreendimentos ainda são poucos especialmente nas grandes cidades.

Os estercos devem ser obtidos, pelo menos, de animais dos quais se conhece o histórico de criação e os tratos sanitários, com destaque para as datas das últimas aplicações de medicamentos. Estas precauções são importantes, para garantir que o esterco seja coletado, mantendo-se no mínimo 20 dias de carência do uso destes produtos.

Após a coleta, o esterco precisa passar por alguns tratamentos, antes de servir como alimento para as minhocas. O primeiro deles é o processo de secagem, que deve ser, preferencialmente, em estufa entre 60 °C e 65 °C, durante 48 horas. A secagem do esterco também facilita o próximo passo do preparo,

que é a fragmentação e peneiração, realizada em peneira com malha ao redor de 3,70 mm. Deste modo, o esterco está parcialmente pronto para o uso na criação, podendo continuar seu preparo ou ser acondicionado em sacos plásticos e armazenado em congelador para uso posterior.

Alguns laboratórios de ensaios ecotoxicológicos adicionam frações de outros materiais ao esterco que será utilizado na criação, como por exemplo, o pó da fibra da casca de coco e areia. A areia é utilizada para facilitar a digestão das minhocas (Edwards, 2004) e melhorar a textura do substrato. A fibra de coco também é utilizada como fração orgânica, na produção dos solos artificiais para testes ecotoxicológicos (Garcia, 2004).

No caso de adicionar estes materiais ao esterco, a mistura é feita quando todos estão secos. Sugerem-se duas partes de esterco para uma parte de pó de fibra de coco, acrescentado até 10% do peso em areia fina lavada. Após a mistura, é necessário proceder à defaunação conforme descrito na seção 7.6, para eliminação de possíveis organismos presentes no alimento. Ainda antes de disponibilizar o alimento às minhocas é necessário realizar a correção do pH. Para que o alimento esteja em condições ideais de sobrevivência e reprodução das minhocas, o pH deve estar entre 6,0 e 7,0 (ISO, 1998; OECD, 2004). Para medir o pH são necessárias pelo menos cinco amostras de 25 g do alimento, onde são adicionadas quantidades crescentes de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) (ver seção 7.5). Em seguida são adicionados 100 mL de água deionizada e deixa-se a amostra em repouso por 24 horas. Após este período, são retirados 10 mL de cada amostra, para a medição do pH realizada por um peagâmetro previamente calibrado.

Após a leitura dos valores de pH, pode ser calculada uma equação de regressão semelhante àquela utilizada para o ajuste de pH do solo (ver seção 7.5), para auxiliar no cálculo da quantidade necessária de $CaCO_3$ a ser acrescentado ao alimento para que atinja o valor desejado de pH. Ao fim desta série de etapas, aproximadamente 2.000 mL de água deionizada são adicionadas para cada 1.000 g de alimento seco. O umedecimento deve ser feito apenas no momento da utilização do alimento, de forma lenta até que o mesmo fique homogêneo, sem a existência de porções secas. Outros parâmetros do alimento também são citados pela OCDE (2004), como a condutividade iônica inferior a 6 mg ou 0,5% de concentração de sais, com umidade equilibrada e sem excesso de amônia ou urina de animais. Conforme Domínguez e Edwards (2010), em uma condição ótima de criação para minhocas *E. fetida* e *E. andrei*, o conteúdo de amônia deve ser inferior a 1 mg g^{-1}, o teor de sal abaixo de 0,5% e a umidade entre 80% e 85%.

A verificação da umidade do alimento deve ser realizada sempre que necessário, através de secagem de amostras em estufa ou por métodos empíricos de observação. Nesse sentido, Schiedeck et al. (2006) recomendam apertar uma quantidade do alimento na mão e observar as seguintes condições: se não escorrer água, o alimento está seco e requer mais umidade; se surgirem algumas gotas entre os dedos, a umidade está adequada; mas se houver escorrimento de grande quantidade de água pela mão e braço, então se deve suspender

Fotos: Gustavo Schiedeck

Figura 4.6. Medida prática da umidade no alimento: (A) muito úmido; (B) muito seco; (C) umidade adequada.

o umedecimeto do alimento até que a umidade retorne aos níveis indicados (Figura 4.6).

Em alguns laboratórios de ensaios ecotoxicológicos é comum efetuar realimentações ou alimentações suplementares. Essa prática pode servir a diferentes propósitos de acordo com o alimento usado, como para o enriquecimento do alimento principal, aumento da biomassa das minhocas, produção de casulos e/ou ainda para estender o prazo de permanência da população nas caixas.

A realimentação é realizada com o próprio alimento principal (ISO, 1998; OECD, 2004). A frequência de suplementação alimentar varia conforme a necessidade identificada no monitoramento semanal de cada caixa de criação das minhocas. A conversão do alimento em húmus pela minhoca é entre 60% e 70% do volume inicial (Schiedeck et al., 2006), o que pode auxiliar no cálculo da quantidade a ser reposta nas caixas. A realimentação pode ser efetuada colocando uma nova camada uniforme de alimento dentro da caixa, de forma que ocupe o mesmo volume de alimento que já foi consumido. A tendência é as minhocas se deslocarem para essa nova camada, facilitando inclusive sua retirada das caixas.

A alimentação suplementar, em geral, é feita à base de pellets de alfafa reidratados (ASTM, 2004) ou de uma mistura de aveia em flocos e água deionizada (Canada, 2004). Esta mistura, muito parecida com um mingau de aveia, é feita na proporção 1:1 ou 1:2 em relação ao volume e deve ser fornecida no intervalo de uma ou duas vezes por semana. O fornecimento pode ser feito preparando-se uma pequena depressão no alimento no centro da caixa e dispondo entre 5 mL e 10 mL do mingau de aveia no seu interior (Canada, 2004), cobrindo-o com uma fina camada do alimento, para evitar odores e proliferação de ácaros. Dessa forma, também se torna mais fácil acompanhar a necessidade periódica de reposição do alimento. A cada revisão nas caixas do alimento, deve-se remover com uma colher o mingau eventualmente não aproveitado pelas minhocas, bem como qualquer formação de bolor e ácaros surgidos na superfície.

Após um período entre 2 e 3 meses, é necessário substituir todo o alimento das caixas de criação independentemente da população de minhocas e da condição do alimento. Nesse momento são separados os casulos, que poderão ser usados para iniciar novas caixas de criação, e as minhocas, classificadas em adultas (com clitelo aparente) e juvenis. Dessa forma, podem-se manter populações de minhocas agrupadas em diferentes idades e estádios de desenvolvimento.

As medições de parâmetros biológicos como número de casulos e número e/ou biomassa de minhocas podem ser interessantes para aprimorar o processo de criação no que diz respeito à densidade populacional, previsão de disponibilidade de indivíduos para os ensaios e manejo da alimentação, além do próprio estado sanitário da população de minhocas.

Para realizar essa etapa, as minhocas e casulos devem ser separados manualmente, de forma a não provocar estresse ou ferimentos. Indivíduos feridos ou com aspecto ou comportamento em desacordo com os demais, devem ser

removidos e descartados. As minhocas adultas e juvenis devem ser lavadas em água deionizada e colocadas em caixas com alimento novo, prontas para recebê-las, conforme a seleção efetuada para manter a sincronia da população.

4.1.3.4 Manejo das minhocas e manutenção da criação

Uma questão importante para considerar na criação de *E. fetida* ou *E. andrei*, é o cuidado para não manter as duas espécies simultaneamente no mesmo laboratório, pois pode haver contaminação cruzada das culturas. Casulos e filhotes recém-nascidos de uma espécie podem grudar em luvas e utensílios, por exemplo, e serem eventualmente transferidos para substratos em que se mantém a outra espécie. Como mencionado anteriormente, o cruzamento entre as duas espécies gera netos estéreis que pode reduzir a eficiência reprodutiva da criação.

Outra questão importante na criação diz respeito à população de minhocas no alimento. Em geral, pouca atenção é dada a fatores como competição por espaço e restrição alimentar em minhocários. Porém, existe uma relação de dependência entre densidade populacional e competição por espaço e alimento que se manifesta mesmo quando as demais condições são ótimas (Domínguez; Edwards, 1997) e que pode provocar migrações (Turruela et al., 2002), decréscimo da produção de casulos e atraso na maturidade das minhocas (Klok, 2007).

A densidade populacional ideal para a criação de minhocas encontrada em artigos científicos mostra uma grande variação de valores, relacionada a aspectos como a espécie e a idade dos indivíduos testados, o tipo e a umidade do alimento, a duração e temperatura de desenvolvimento dos ensaios, e unidades de medição. Por exemplo, Domínguez; Edwards (1997), trabalhando com *E. andrei* alimentadas com esterco suíno, verificaram que a densidade de inoculação inicial de 8 minhocas juvenis para cada 43,6 g de peso em matéria seca de alimento era a mais indicada para a criação. Por sua vez, Garg et al. (2008) citam a densidade de 27 a 53 minhocas por kg de alimento à base de esterco bovino como a mais favorável para a criação de *E. fetida*. Naddafi et al. (2006) encontraram uma densidade ideal de 1,35 kg de minhocas m^{-2}, alimentando *E. fetida* com lodo de esgoto ativado. Já Ndegwa et al. (2000), verificaram que a densidade de 1,6 kg de minhocas por m^{-2} e a taxa de alimentação de 1,25 kg de alimento por kg de minhoca por dia resultaram na maior conversão de alimento em biomassa de *E. fetida*, enquanto que para a melhor transformação do alimento em húmus a taxa de 0,75 kg de alimento por kg de minhoca por dia, na mesma densidade, foi mais eficiente.

Os diferentes protocolos de criação de minhocas para os ensaios ecotoxicológicos sugerem alguns índices populacionais. A OECD (1984) indica uma relação de 1 kg de biomassa de minhocas para cada 20 kg de alimento. Por sua vez, a Environment Canada (Canada, 2004) e a ASTM (2004) recomendam uma densidade de minhocas de até 0,03 g de peso vivo para cada 1 cm^3 de alimento. Assim, para um alimento com densidade de 0,7 g cm^{-3}, seriam necessários 4,2 kg para preencher um volume de caixa de 6 L. Desconsiderando questões como qualidade do alimento, variações de temperatura, idade média da

população de minhocas, e adotando um consumo de 1 g de alimento por 1 g de biomassa de minhocas, poderiam ser mantidas 180 g de biomassa de minhocas nessa caixa (o equivalente a 360 minhocas com massa individual aproximada de 500 mg) por um período aproximado de 25 dias sem suplementação alimentar. Isso significa dizer que, para manter essa caixa com uma população saudável por cerca de 60 dias, é preciso pensar em algumas estratégias, como aumentar o estoque alimentar para 10,8 kg ou reduzir a população de minhocas para 140 indivíduos, com 70 g de biomassa viva, bem como fornecer alimentação suplementar (ex. aveia em flocos).

Portanto, para iniciar uma criação sugere-se, para uma caixa de 35 cm x 25 cm x 15 cm de profundidade, com 4,2 kg de esterco umedecido a 80-85% H_2O, inocular 150 casulos de *E. fetida* ou *E. andrei*, e incubar a 25 ± 2 °C por 60 dias, período após o qual os indivíduos estarão adultos e prontos para serem usados nos ensaios ecotoxicológicos.

Alternativamente, pode-se usar uma caixa com as dimensões de 38 cm x 25 cm x 14 cm (Figura 4.5), com 3,2 kg de substrato (esterco equino, pó de casca de coco e areia fina – 1:1:0,1, respectivamente) umedecido a 80-85% H_2O, inoculado com 100-150 minhocas adultas (com clitelo aparente) por um período médio de 30 dias. Após este período, todos os indivíduos adultos devem ser retirados do recipiente de criação, sendo mantidos apenas casulos e indivíduos recém-nascidos por um período adicional de aproximadamente 60 dias. Após este período, as minhocas já serão adultas e estarão aptas para serem utilizadas nos ensaios de toxicidade. As condições de temperatura e umidade da sala de criação devem ser as mesmas daquelas utilizadas nos ensaios, podendo a temperatura variar entre 20 ± 2 °C (regiões de clima temperado), 25 ± 2 °C (ABNT, 2014) e 28 ± 2 °C (regiões de clima tropical) (ISO, 2012). Durante todo o processo de sincronização, não é oferecida alimentação suplementar, sendo esta somente oferecida para as criações de manutenção. Após estes procedimentos, espera-se obter um número entre 300-400 minhocas adultas, com idades semelhantes, aptas para iniciar um ensaio de toxicidade.

Apresentamos anteriormente duas opções de sincronização de cultivo dessas espécies, que disponibilizarão números diferentes de adultos. Cabe a cada laboratório escolher o método que funcione melhor considerando as condições locais de recursos humanos e materiais disponíveis. O número de caixas de sincronização para cada método deve ser dimensionado segundo o número de adultos necessários para os ensaios ecotoxicológicos a serem realizados.

4.1.3.5 Registros de criação

Para melhor controle do processo, é importante que cada caixa de criação seja observada semanalmente e possua uma etiqueta de identificação constando os seguintes registros, de acordo com a Environment Canada (Canada, 2004):

1. Data de início da criação e número inicial de casulos/indivíduos.
2. Fonte de alimentação e regime de umedecimento, incluindo o volume adicionado a cada vez.

3. Data de renovação do alimento, quando realizado.
4. Medidas de atributos do alimento (pH, temperatura, teor de umidade, capacidade de retenção de água e outros).
5. Observações gerais da criação, como comportamento e aparência das minhocas, odor característico, localização das minhocas no alimento, alimentos não comidos pelas minhocas, etc.).

É importante salientar que a experiência de cada laboratório deve permitir a a realização de adaptações necessárias para tornar a criação mais eficiente e prática de ser conduzida. Embora alguns aspectos aqui mencionados sejam inegociáveis, como a correta identificação da espécie e ausência de substâncias tóxicas ou contaminantes no alimento, outros elementos podem ser perfeitamente adequados a cada realidade, como, por exemplo, a dimensão das caixas e o tempo para substituição do alimento, entre outros.

4.2 *Eudrilus eugeniae*

4.2.1 Características gerais e identificação

A *E. eugeniae*, conhecida popularmente como a "gigante Africana", é uma espécie de minhoca da família Eudrilidae originária do Oeste da África, mas que se encontra em solos naturais de diversos países tropicais (Blakemore, 2015). Não obstante, longe de seu local de origem, tende a ser encontrada mais comumente em minhocários comerciais do que no solo, devido à sua adaptação à criação com fontes de matéria orgânica (especialmente esterco), onde é usada frequentemente para geração de isca para a pesca (Domínguez et al., 2001; James; Guimarães, 2010).

Apresenta cor púrpura-avermelhada dorsalmente (Figura 4.7), mas sem pigmentação ventralmente, e possui poros prostáticos e masculinos combinados facilmente visíveis na região posterior do segmento 17 de onde frequentemente se estende parcialmente para fora o orgão reprodutor masculino, após fixação em álcool ou formol. O clitelo anelar é nos segmentos 14-18 (Tabela 4.2), sendo, portanto, bem mais anterior que nas espécies de *Eisenia* (segmentos 24-34) que possuem clitelo em forma de sela (não anelar). Outra característica marcante da

Foto: Gustavo Schiedeck

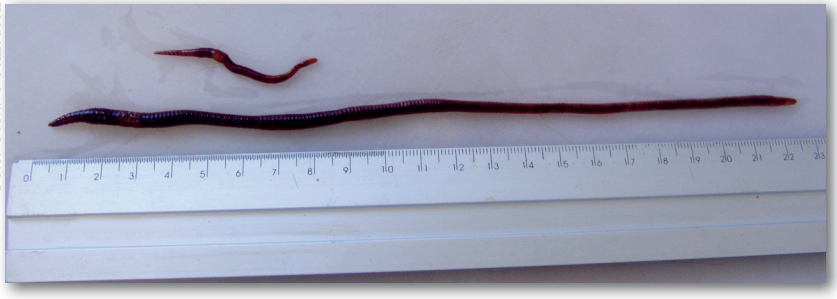


Figura 4.7. A minhoca "gigante Africana" *Eudrilus eugeniae* (abaixo) e a "vermelha da califórnia" *Eisenia andrei* (acima).

Tabela 4.2. Características morfológicas externas e internas da espécie *Eudrilus eugeniae* (Blakemore, 2015).

Caracteres externos	
Pigmentação	Cor púrpura-avermelhada dorsalmente, mas ausente ventralmente
Comprimento	32-185 mm
Diâmetro	5-8 mm
Segmentos	145-211
Prostômio	Epilóbico
Cerdas	Distribuição em forma lumbricina, estreitamente pareadas
Clitelo	Nos segmentos 13, 14-18 com forma anular, mais fina ventralmente, podendo parecer forma de sela
Traves pubertais	Ausentes
Marcas genitais	Ausentes
Poros dorsais	Ausentes
Poros espermatecais	Junto com os poros femininos
Poros femininos	Pareados, junto com os poros espermatecais no segmento 14
Poros masculinos	Poros prostáticos e masculinos combinados, grandes, na região posterior do segmento 17; grande câmara copulatória com pênis
Caracteres internos	
Moela	No segmento 5
Glândula calcífera	Sub-esofágica, nos segmentos 10-11; latero-dorsais no segmento 12
Cêgos intestinais	Ausentes; mas 8-42 pares de glândulas supra-intestinais presentes nos segmentos 52-132
Tiflosol	Ausente
Nefrídeos	Sistema holonefridial, em pares, a partir do segmento 4
Corações	Nos segmentos 8-11
Espermatecas	Ovisacos modificados no segmento 14
Ovários	Pareados no segmento 13; ovisacos modificados para formar espermatecas
Sacos testiculares	Grandes nos segmentos 10-11
Vesículas seminais	Nos segmentos 11-12
Próstatas	Presentes e grandes (até 8 mm); ductos curtos e musculares

espécie é a presença de grandes próstatas (até 0,8 cm), e um complexo sistema reprodutor, incomum em outras espécies de minhocas (Blakemore, 2015). A reprodução de *E. eugeniae* é biparental, e seu ciclo de vida se realiza em 58 a 67 dias (Figura 4.8), e sua expectativa de vida oscila entre 1 e 3 anos.

É uma espécie de tamanho avantajado em relação a *E. andrei* (Figura 4.7), podendo alcançar até 37 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro, com indivíduos adultos pesando em média 2,7 g a 3,5 g, podendo alcançar até 6,5 g em condições ótimas (Rodríguez et al., 1986; Blakemore, 2015). Apesar de ser normalmente considerada uma espécie epigêica, quando presente em solos naturais, *E. eugeniae* pode produzir grandes quantidades de coprólitos (Cook et al., 1980), com composição química diferenciada do solo não ingerido, e afetar significativamente o crescimento de plantas em vasos (Blakemore, 1997, 2008). Portanto, ao consumir tanto o solo, quanto restos vegetais ou animais, essa espécie possui uma plasticidade ecológica formidável e deve ser considerada epi-endogeica.

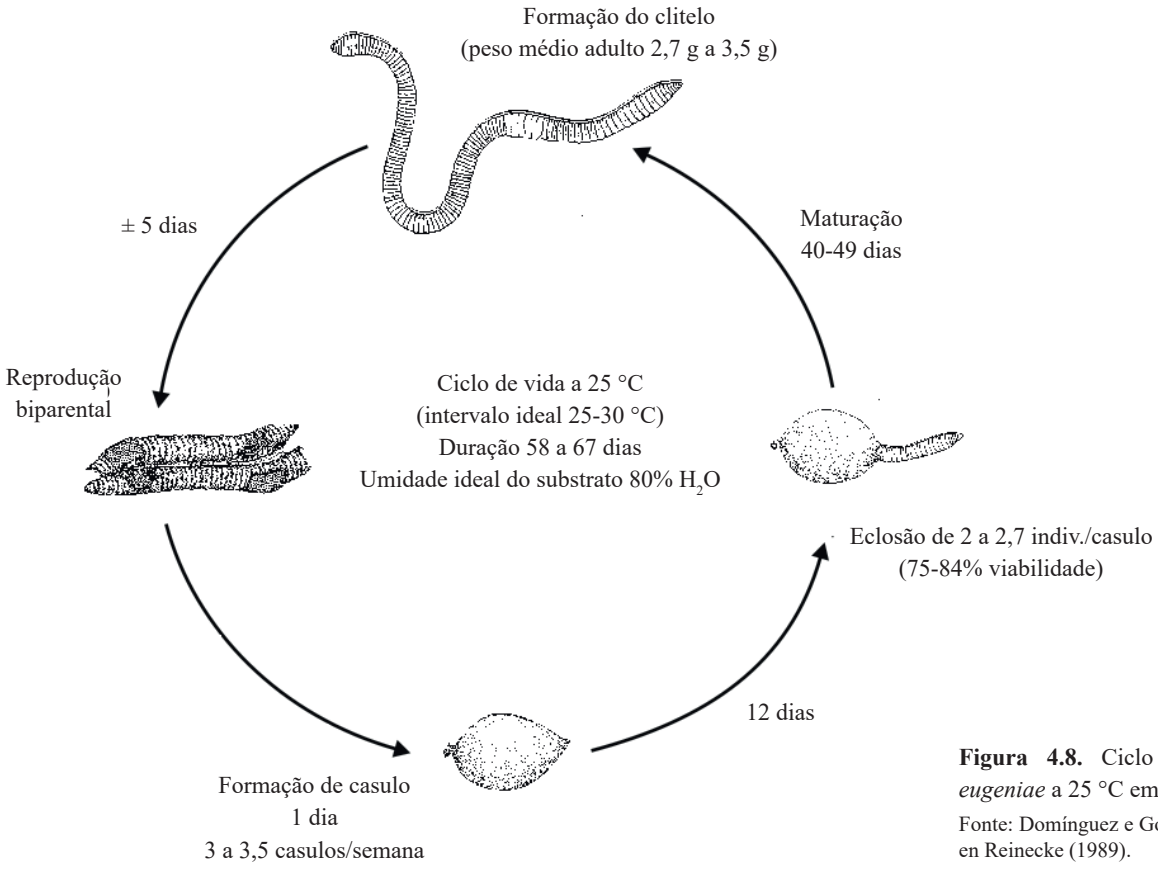


Figura 4.8. Ciclo de vida de *Eudrilus eugeniae* a 25 °C em esterco animal.

Fonte: Domínguez e Gómez-Brandón (2010); Viljo en Reinecke (1989).

E. eugeniae pode se alimentar de uma grande variedade de resíduos orgânicos agrícolas ou florestais, domésticos e industriais, incluindo restos de alimentos humanos, estercos de animais, lodo de esgoto, folhas de árvores, aguapés, ervas daninhas, celulose, cinzas, torta de filtro e bagaço de cana de açúcar (Neuhauser et al., 1979, 1988; Graff, 1981; Edwards, 1988; Bano; Kale, 1988; Gajalakshmi et al., 2001; Suthar; Singh, 2008; Ganesh et al., 2009; Khwairakpam; Bhargava, 2009a, 2009b; Coulibaly; Bi, 2010; Dharani et al., 2010; Alagesan; Vasuki, 2010, Neto et al., 2013). Além disso, possui uma alta taxa de crescimento e é bastante prolífica, produzindo 3 a 3,5 casulos por semana por indivíduo e 2 a 2,7 indivíduos por casulo, quando cultivada a 25 °C (Figura 4.8). Portanto, é considerada uma espécie ideal para produção de proteína para consumo animal (Edwards, 1988).

4.2.2 Criação e manutenção de *E. eugeniae*

A espécie *E. eugeniae* pode ser criada usando as mesmas recomendações especificadas para *E. fetida* e *E. andrei* no que diz respeito à obtenção de matrizes, aclimatação, sincronização (ver seção 4.1.2) e aspectos gerais da criação (seção 4.1.3). A espécie se desenvolve melhor a 25 °C do que a 20 °C, portanto a criação deve ser mantida na temperatura mais alta, visando melhor crescimento e produção de casulos. Além disso, como a sincronização e os

detalhes de criação dessa espécie ainda não foram otimizadas no laboratório, é importante que as informações para criação apresentadas a seguir sejam usadas com precaução e apenas como um indicativo de como desenvolvê-la nas condições particulares de cada laboratório. Ainda é necessária pesquisa específica visando adequar e otimizar a criação de *E. eugeniae* em pequenas caixas no laboratório para produção de matrizes (casulos) e de adultos para ensaios ecotoxicológicos.

Como a espécie possui maior taxa de crescimento e maior biomassa individual do que *E. fetida* e *E. andrei* quando adulta (Graff, 1982), especial atenção é necessária em relação ao número de indivíduos a serem colocados em cada caixa no início da criação. Para uma criação de 60 dias, visando obter adultos a partir de casulos, aproximadamente 25 casulos devem ser inoculados numa caixa com 4,2 kg de substrato, em comparação com 150 para *E. fetida* e *E. andrei* (seção 4.1.3.4.). Além disso, deve-se buscar adequar o tamanho e número das caixas, peso do substrato, número de indivíduos inoculados e o tempo de incubação a cada realidade, visando alcançar o número de indivíduos desejado para os ensaios ecotoxicológicos.

As principais desvantagens para a criação dessa espécie são a sua intolerância a baixas temperaturas ambientais e a estreita margem de temperatura ideal para criação (Domínguez et al., 2001). A espécie tende a fugir, caso encontre situações ambientais indesejáveis durante o processo de criação, por ser mais 'exigente' às condições de temperatura e umidade do substrato (temperatura e umidade) do que *E. fetida* e *E. andrei*. A espécie alcança produção máxima de biomassa entre 25 °C e 30 °C, mas sua reprodução é menor a 20 °C e 30 °C que a 25 °C, e a temperaturas menores que 20 °C apresenta taxa de crescimento e reprodução muito baixas (Loehr et al., 1985; Viljoen; Reinecke, 1992; Domínguez et al., 2001). Pode tolerar teores de umidade do substrato entre 70% e 85%, com um intervalo ótimo de 80-82%.

A 25 °C, *E. eugeniae* alcança o amadurecimento sexual em um período entre 40 e 49 dias, e a taxa de reprodução varia entre 0,42 e 0,51 casulos por minhoca por dia (Viljoen; Reinecke, 1989; Reinecke et al., 1992; Reinecke; Viljoen, 1993; Sivasankari et al., 2013). O período de crescimento dos exemplares juvenis e dos adultos pode durar de um mínimo de 56 a um máximo de 154 dias, dependendo da temperatura e do substrato usado na criação (Neuhauser et al., 1979; Rodríguez et al., 1986; Reinecke et al., 1992; Domínguez et al., 2001). O tempo de incubação dos casulos oscila entre 11 e 27 dias e o número de descendentes médio por casulo varia de 2 a 2,7 indivíduos, com uma viabilidade de eclosão de 51% e 84%, dependendo da temperatura de criação (Rodríguez et al., 1988; Viljoen; Reinecke, 1989, Reinecke et al., 1992, Reinecke; Viljoen, 1993; Parthasarathi, 2007). O crescimento e reprodução da espécie respondem negativamente a altas populações no substrato (Reinecke; Vijoen, 1993), portanto, deve-se tomar cuidado para não deixar a população nas caixas de criação ficar alta demais, ou aumentar o volume do substrato (quantidade de alimento), para garantir a qualidade das matrizes para produção de casulos para as criações.

4.3 *Perionyx excavatus*

4.3.1 Características gerais e identificação

A espécie *P. excavatus*, conhecida popularmente como "violeta do himalaia", é uma minhoca epigêica, pertencente à familia Megascolecidae e provavelmente originária da região do Himalaia (Gates, 1972). Pode ser encontrada desde o nível do mar até 3000 m de altitude, e Gates (1972) afirma que, entre todas as espécies conhecidas de minhocas, *P. excavatus* é a que possui a maior tolerância a diferentes tipos de clima. Apesar de ser encontrada mais comumente em substratos orgânicos (incluindo dentro ou abaixo de troncos podres, em plantas epifíticas, na base de bananeiras, na liteira e em acumulações de folhas, abaixo de musgos e pedras, em esterco), pode também sobreviver em solo, lama, e em terra preta (Gates, 1972).

Esta minhoca possui pigmentação dorsal vermelho violeta com iridescência azul (Figura 4.9), e o clitelo, de forma anelar e cor visivelmente diferente (frequentemente mais claro), se encontra nos segmentos 13 a 17 (Tabela 4.3), portanto, bem anterior à *Eisenia fetida* e *E. andrei*. É uma minhoca considerada pequena, com biomassa média de 0,5 g a 0,6 g nos indivíduos adultos, que podem medir 4-5 mm de diâmetro e apresentar comprimento médio de 5-7 cm, embora alguns possam alcançar 18 cm de comprimento (Tabela 4.3). *P. excavatus* possui múltiplas pequenas cerdas em cada segmento, variando em número de apenas algumas cerdas nos segmentos antes do clitelo até 54 cerdas após o clitelo. Não possui moela ou tiflosole, que condiz com sua alimentação principalmente de resíduos orgânicos. Uma de suas características comportamentais e morfológicas principais são a amputação posterior (autotomia) frequente, e uma capacidade impressionante de regeneração, tanto de segmentos posteriores, quanto de segmentos anteriores, podendo até regenerar segmentos cefálicos e órgãos reprodutores (Gates, 1960).

Foto: Jorge Domínguez

Figura 4.9. Indivíduo adulto da minhoca "violeta do himalaia", *Perionyx excavatus*.

Tabela 4.3. Características morfológicas internas e externas da espécie *P. excavatus* (Blakemore, 2002).

Caracteres externos	
Pigmentação	Dorso anterior vermelho violeta com iridescência azul; lado ventral creme pálido (espermatecas visíveis), especialmente nos segmentos 13-17; clitelo pode ser mais escuro ou mais claro
Comprimento	50-180 mm, corpo dorso-ventralmente achatado com cauda ligeiramente mais fina
Diâmetro	2.5-5 mm
Segmentos	115-178
Prostômio	Epilóbico aberto, pequena fossa na parte ventral do peristômio
Cerdas	Pequenas, pretas e várias por segmento, desde 2 a 44 no segmento 12 e 40-54 no segmento 20; espaçamento maior no dorso
Clitelo	Anular nos segmentos 13-17, mas às vezes pode se estender um pouco nos segmentos adjacentes
Marcas genitais	Ausentes
Poros dorsais	Presentes
Poros espermatecais	Dois pares nos intersegmentos 7/8 e 8/9 na margem anterior dos segmentos: Poros grandes e abertos com sulcos
Poros nefridiais	Vistos pouco frequentemente lateralmente, especialmente na região do clitelo
Poro feminino	Único, central e anterior ao arco setal no segmento 14 ou próximo ao intersegmento 13/14
Poros masculinos	No segmento 18, intimamente pareados com sulcos profundos em uma depressão de tecido entumescido; cerdas peniais presentes no interior de cada sulco
Caracteres internos	
Moela	Ausente ou rudimentar no segmento (5? ou) 6
Glândula calcífera	Presente nos segmentos 10-12; o esôfago é inchado e vascularizado, inclusive no segmento 13
Cêgos intestinais	Ausente
Tiflosol	Ausente
Nefrídeos	Holóico, com túbulos óbvios na região clitelar, mas menores na região anterior; vesículas ausentes
Corações	Latero-esofágicos ou supra-esofágicos nos segmentos 9-12,13
Espermatecas	Dois pares, nos segmentos 8 e 9 com âmpulas bilóbicas, divertículos irridiscentes; duto curto e grosso
Sacos testiculares	Funis testiculares pareados nos segmentos 10 e 11
Vesículas seminais	Nos segmentos 9-12
Próstatas	Grandes, esféricas e racemosas, no segmento 18

P. excavatus é frequentemente encontrada em minhocários, onde pode coexistir com outras espécies criadas (dados não publicados[2]). É uma espécie prolífica, com um ciclo de vida de apenas 46-60 dias quando cultivada a 25 °C, e produz de 8 a 10 casulos por indivíduo por semana, havendo normalmente apenas um indivíduo por casulo (Figura 4.10). Assim como *E. fetida*, *E. andrei* e *E. eugeniae*, pode ser criada usando uma ampla variedade de substratos orgânicos, incluindo resíduos agrícolas, domésticos e industriais (Edwards et al., 1998; Chaudhuri; Bhattacharjee, 2002; Khwairakpam; Bhargava, 2009a, 2009b). Esta minhoca é considerada uma espécie ideal para condições tropicais, tendo capacidade de resistir temperaturas mais variáveis de criação, em comparação com *E. fetida*, *E. andrei* e *E. eugeniae*.

[2] Dados não publicados produzidos por G. Brown no Laboratório de oligoquetas na Embrapa Florestas, Curitiba, PR em 2015.

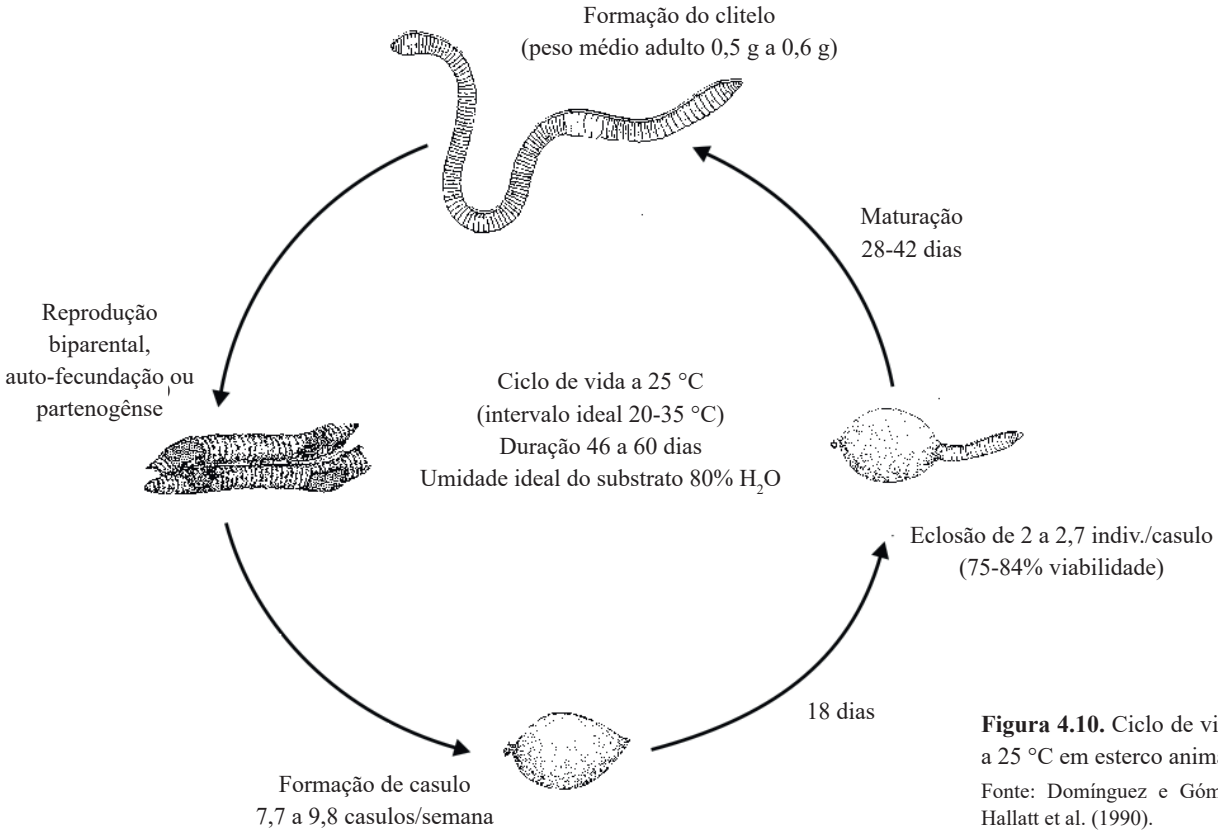


Figura 4.10. Ciclo de vida de *P. excavatus* a 25 °C em esterco animal.

Fonte: Domínguez e Gómez-Brandón (2010); Hallatt et al. (1990).

4.3.2 Criação e manutenção de *P. excavatus*

A espécie *P. excavatus* pode ser criada usando as mesmas recomendações especificadas para *E. fetida* e *E. andrei* no que diz respeito à obtenção de matrizes, aclimatação, sincronização (ver seção 4.1.2) e aspectos gerais da criação (seção 4.1.3). Contudo, como a sincronização e os detalhes de criação dessa espécie ainda não foram aprimoradas em laboratório, é importante que as seguintes informações para criação sejam usadas com precaução e apenas como um indicativo de como desenvolvê-la nas condições particulares de cada laboratório. Ainda é necessária pesquisa específica visando adequar e aperfeiçoar a criação de *P. excavatus* em pequenas caixas no laboratório, visando produção de matrizes (casulos) e de adultos para ensaios ecotoxicológicos.

Para uma criação de 60 dias, visando obter adultos a partir de casulos, aproximadamente 100 casulos devem ser inoculados numa caixa com 4,2 kg de substrato, seguindo as mesmas recomendações usadas para a criação de *E. fetida* e *E. andrei* (seção 4.1.3.4). Além disso, deve-se adequar o tamanho e número das caixas, peso do substrato, número de indivíduos inoculados e o tempo de incubação a cada realidade, visando alcançar o número de indivíduos desejado para os ensaios ecotoxicológicos.

A espécie alcança produção máxima de biomassa entre 20 °C e 30 °C, sendo a sua reprodução menor a 15 °C do que a 20 °C e 25 °C (Edwards et al.,

1998). Portanto, temperaturas menores que 20 °C devem ser evitadas para reduzir efeitos negativos na taxa de crescimento e reprodução. *P. excavatus* pode sobreviver a baixas temperaturas (4 °C), sendo menos susceptível que *E. eugeniae*, *E. fetida* e *E. andrei* a temperaturas elevadas (> 30 °C). Pode tolerar teores de umidade do substrato entre 70% e 85%, com um intervalo ótimo de 80-82% (Halllatt et al., 1992; Singh et al., 2004).

A 25 °C, *P. excavatus* pode alcançar amadurecimento sexual em apenas 20 a 28 dias após eclosão do casulo, mas a taxa de reprodução varia entre 0,12 e 3,5 casulos por minhoca por dia, dependendo do substrato e da temperatura (Kale et al., 1982; Reinecke et al., 1992; Edwards et al., 1998; Hallatt et al., 1990, Bhattacharjee; Chaudhuri, 2002; Joshi; Dabral, 2008). O tempo de incubação dos casulos é de 15-21 dias e o número de descendentes por casulo varia de 1 a 1,3 indivíduos, com uma viabilidade de eclosão de 48% a 90%, dependendo da temperatura de criação (Reinecke et al., 1992; Edwards et al., 1998; Bhattacharjee; Chaudhuri, 2002; Birundha et al., 2013). O crescimento e reprodução da espécie respondem negativamente a altas populações no substrato (Reinecke; Reinecke, 1994). Assim, deve-se tomar cuidado para não deixar a população nas caixas de criação aumentar demais, ou então deve-se adicionar volume extra do substrato (quantidade de alimento) para garantir a qualidade das matrizes para produção de casulos para as criações.

Foto: Marie Luise Carolina Bartz

Figura 4.11. Vista geral externa da espécie *P. corethrurus*.

4.4 *Pontoscolex corethrurus*

4.4.1 Características gerais e identificação

Foto: Andressa Cristhy Buch

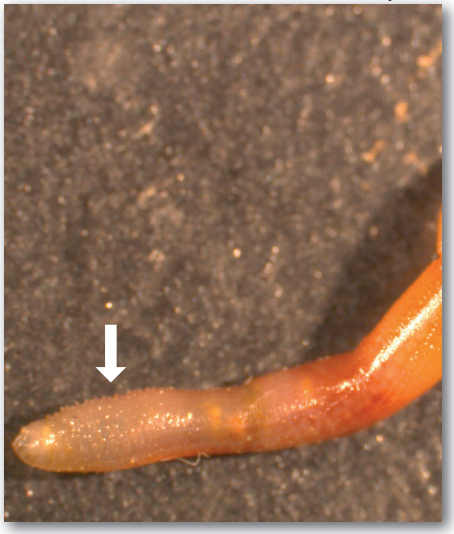


Figura 4.12. Aparência e distribuição quincôncio das cerdas posteriores (seta branca) de um indivíduo juvenil (recém-nascido) de *P. corethrurus*.

A espécie *P. corethrurus* (Figura 4.11) pertence à família Rhinodrilidae (James, 2012). Esta espécie é conhecida regionalmente como “minhoca-mansa”, mas também foi chamada de “minhoca de rabo-de-escova” pelo Dr. Fritz Müller, naturalista alemão residente em Blumenau, SC, que descreveu a espécie (Müller, 1857), devido ao tamanho e à disposição de cerdas na região posterior do corpo (Figura 4.12).

Vive em regiões tropicais, sendo provavelmente nativa do Planalto Guianense (Righi, 1984), mas atualmente possui ampla distribuição na região sub-tropical e tropical, sendo ubiquista, adaptando-se bem a diferentes condições ambientais (Lavelle et al., 1987; Garcia; Fragoso, 2002; Brown et al., 2006). É amplamente tolerante a variações nas propriedades físico-químicas do solo, e a diferentes temperaturas e umidades do solo (Lavelle et al., 1987). Pode ser encontrada nos mais variados tipos de solos; desde solos arenosos a solos argilosos e pesados de terra vermelha ou preta, bem como em lugares muito úmidos tais como pântanos, ou em solos secos como aqueles encontrados em topos de morros (Vannucci, 1953).

Esta espécie é endogêica e geófaga, vivendo principalmente no solo superficial até 30 cm de profundidade, mas em casos excepcionais (solos arenosos) pode

ser encontrada até 1 m de profundidade (Steffen et al., 2018). Consegue assimilar facilmente a matéria orgânica do solo, mesmo em solos muito pobres, possuindo grande habilidade para colonizar diferentes habitats (Lavelle et al., 1987; Marichal et al., 2010). Também já foi encontrada em bromélias e em acumulações de matéria orgânica em árvores nas ilhas Caribenhas (Buch et al., 2011). É facilmente encontrada em locais com grande quantidade de matéria orgânica e locais úmidos, porém há dificuldades em se coletar em meses mais frios ou secos, quando a espécie entra em estivação, enrolando-se em um nó, às vezes em uma câmara de diapausa, para conservar umidade (Vanucci, 1953).

A *P. corethrurus* é abundante em ecossistemas perturbados como agroecossistemas e florestas secundárias, sendo encontrada em densidades maiores que 400 indivíduos m^{-2} em pastagens (Nunes et al., 2006). Possui reconhecida importância para os processos no solo (Taheri et al., 2018a), alterando suas propriedades físicas (por ex.: agregação, porosidade), concentrando nutrientes nos coprólitos (Bernardes; Kiehl, 1995; Barois et al., 1999; Bartz et al., 2010; Hernández-Castellanos, 2010), e favorecendo o crescimento vegetal e a produção agrícola (Brown et al., 1999).

Externamente *P. corethrurus* apresenta quatro aberturas no corpo (Tabela 4.4): nefridióporos, ou seja, os poros excretores do tipo holonefridial (um par de nefrídeos por segmento); os poros masculinos (cuja posição varia geralmente entre famílias), na porção final do vaso deferente, macroscópicos e pré-clitelares; os poros femininos, localizados no segmento 14 (Righi, 1984); e os poros prostáticos, os quais nem sempre estão presentes na família Rhinodrilidae. O clitelo, formação glandular da epiderme, associado à produção de casulos está situado nos segmentos 15-23 (=9 segmentos), apresentando forma de sela. A espécie tem reprodução assexuada, por meio de partenogênese, ou seja, uma minhoca consegue produzir casulos sem nunca haver copulado com outra (Gates, 1973). Apresenta o corpo despigmentado com 90-220 segmentos, e o comprimento varia entre 4,6 cm e 12 cm, o diâmetro entre 3 mm a 6 mm e a biomassa de um adulto pode estar entre 0,36 g e 3,5 g (Blakemore, 2002; Buch et al., 2011). Uma das características morfológicas mais marcantes da espécie é a presença de cerdas em distribuição alternada na região posterior do corpo, numa forma chamada de quincôncio (Figura 4.12).

Os casulos, de tamanho e forma parecida às pérolas, são brancos ou translúcidos quando depositados e com o tempo de incubação vão se tornando cada vez mais rosados, ficando totalmente rosados com o embrião completamente formado, sendo este visível dentro do casulo justo antes de nascer (Buch et al., 2011). O tempo de incubação dos casulos comumente varia entre 25-35 dias, mas pode durar de 21 até 52 dias, dependendo principalmente da umidade e temperatura do solo (Lavelle et al., 1987; Zhang et al., 2008; Buch et al., 2011). O peso dos casulos varia entre 20-78 mg e depende do tamanho do adulto que o depositou (Buch et al., 2011). Cada casulo normalmente contém apenas um embrião (muito excepcionalmente >1; Bhattachararjee; Chaudhuri, 2002), e ao nascerem, os juvenis possuem entre 60-90 segmentos (Nair et al., 2009). O

Tabela 4.4. Características morfológicas externas e internas da espécie *P. corethrurus* (Righi, 1990; Blakemore, 2002).

Caracteres externos	
Pigmentação	Ausente
Comprimento	46-120 mm
Diâmetro	3-6 mm
Segmentos	90-222; último segmento às vezes retraído dentro do corpo
Prostômio	Tentacular (como probóscide)
Cerdas	Anteriormente em organização lumbricina; os pares se distanciam em segmentos alternados posteriormente, eventualmente alcançando uma organização quincunx, na qual apresentam uma forma alternada (Figura 4.12); as cerdas na região posterior são bastante grandes, em forma de dentes finos
Clitelo	Nos segmentos 15-23, em forma de sela
Traves pubertais	Bandas pareadas, longitudinais nos segmentos 29-32
Marcas genitais	Nos segmentos 14 e 28-32
Poros dorsais	Ausentes
Poros espermatecais	Nos segmentos 6/7, 7/8, 8/9, pequenos, de visualização difícil
Poros nefridiais	Visíveis e evidentes, iniciando nos segmentos 2-4
Poros femininos	No segmento 14
Poros masculinos	Ausentes ou pequenos, no segmento 20/21
Caracteres internos	
Moela	No segmento 6
Glândula calcífera	Três pares, nos segmentos 7-9, em forma de folha achatada
Cêgos intestinais	Ausentes
Tiflosol	Início nos segmentos 21-25 com forma lamelar simples; fim nos segmentos 107-138
Nefrídeos	Vesiculares, com bexigas em forma ovóide
Corações	Nos segmentos 10 e 11 vazios, em 11 cobertos pelos sacos testiculares
Espermatecas	Três pares, nos segmentos 7-9
Sacos testiculares	Longitudinais no segmento 11
Vesículas seminais	Ausentes ou pareados no segmento 12, estendendo posteriormente até os segmentos 20-22

crescimento do juvenil é rápido, o qual pode chegar a ingerir 3 a 5,5 vezes seu peso diário, mas ao alcançar maturidade sexual, sua taxa de ingestão diminui para aproximadamente 1,5 a 3 vezes o peso dia^{-1} (Lavelle et al., 1987).

P. corethrurus possui uma região caudal com leve engrossamento de até 10 segmentos, cuja função ainda não está bem definida (Righi, 1990), mas acredita-se que possa estar envolvida nos processos de regeneração (Eisen, 1896; Gates, 1973; Righi, 1990). De fato, durante o processo de desenvolvimento da espécie, pode haver adição de segmentos (Nair et al., 2009), especialmente após momentos de diapausa (Hamoui, 1991b). Em coletas no campo, também são frequentes as visualizações de indivíduos apresentando regeneração de segmentos posteriores (Blakemore, 2002).

Assim como *E. andrei*, *P. corethrurus* apresenta diversidade críptica (Cunha et al., 2014; Taheri et al., 2018b), por isto, é importante que seja feita uma boa identificação morfológica (Tabela 4.4), concomitante com uma avaliação genética dos exemplares que serão usados para criação, ou aqueles coletados

no campo para testes ecotoxicológicos. A avaliação genética pode ser feita usando o código de barras do DNA (DNA barcode), sequenciando uma parte do gene Citocromo Oxidase I, usando primers específicos disponíveis na literatura (Folmer et al., 1994), e para serem considerados como a espécie *P. corethrurus* os indivíduos analisados devem pertencer ao agrupamento da linhagem L1 descrita em Taheri et al. (2018b) e James et al. (2019). Deve-se preferivelmente usar uma população clonal (geneticamente homogênea) para os testes ecotoxicológicos, visando minimizar potenciais diferenças entre clones ou linhagens genéticas da espécie (Lowe; Butt, 2007).

4.4.2 Criação e manutenção de *P. corethrurus*

P. corethrurus pode ser criada em diversos tipos de substratos, inclusive em solo natural com ou sem adição de matéria orgânica (Vanucci, 1953; Guerra; Bezerra, 1989; Hamoui, 1991a; Bernardes; Kiehl, 1993, 1994, 1997; Bernardes et al., 1998; Senapati et al., 1999; Bhattachararjee; Chaudhuri, 2002; García; Fragoso, 2003; Pashanasi, 2007; Chaudhuri; Bhattachararjee, 2011; Nath; Chaudhuri, 2014; Ayala; Barois, 2016) e em solo artificial (por exemplo, SAT; Buch et al., 2011). O ciclo de vida desta espécie pode ser completado em cerca de três a quatro meses (Figura 4.13), mas pode demorar até mais de 12 meses, dependendo do substrato, da umidade e temperatura. A 20 °C o ciclo de vida é muito mais longo (12 meses; Hamoui, 1991a; Buch et al., 2011) de que a 27 °C (3 a 4 meses; Lavelle et al., 1987), portanto, essa temperatura maior

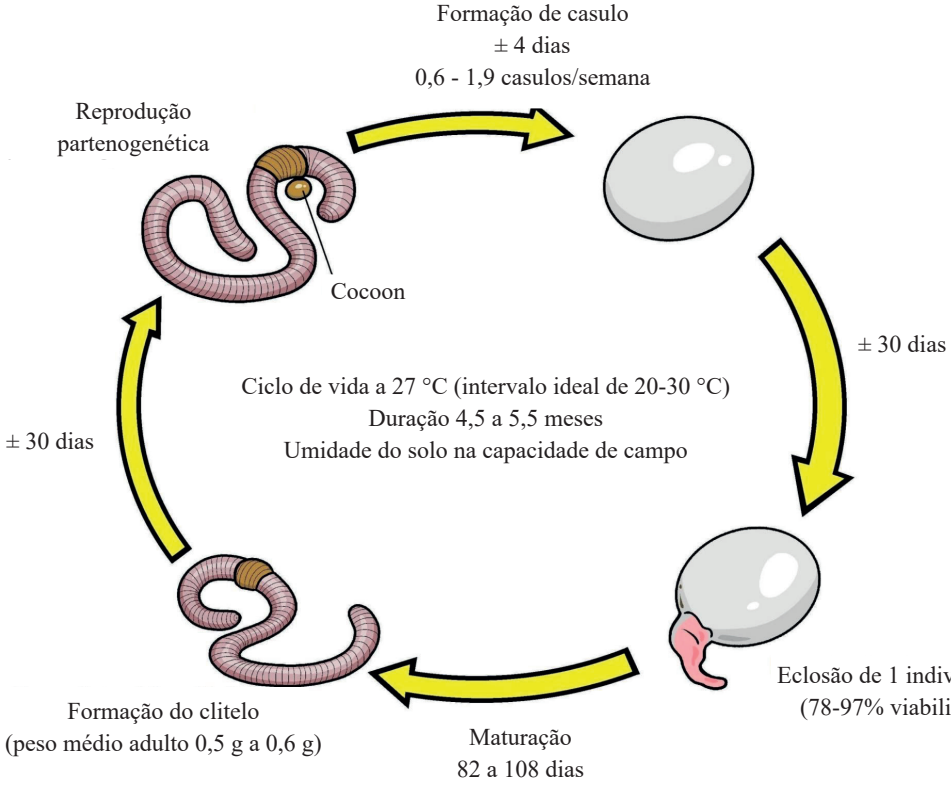


Figura 4.13. Ciclo de vida da espécie de minhoca *P. corethrurus* a 27 °C (Lavelle et al., 1987). Modificado de Buch (2010).

deve ser preferida para a criação. A espécie é de fácil manutenção e criação no laboratório, e os indivíduos nascidos podem ser mantidos e criados em solo natural por 3 anos ou mais em incubadoras no laboratório (dados não publicados[3]). Para manutenção de indivíduos em longo prazo, o procedimento mais importante consiste em manter o substrato com suficiente alimento e renovar o substrato periodicamente.

[3] Dados não publicados produzidos por G. Brown no Laboratório de entomologia na Embrapa Soja, Londrina, PR em 2002-2005.

Como a espécie é partenogenética, sua reprodução independe de cópula entre indivíduos. Cada indivíduo pode produzir entre 0,6 e 1,9 casulos por semana a 27 °C (Figura 4.13), dependendo da umidade e da qualidade do solo/substrato de criação (Lavelle et al., 1987). Contudo, outros autores constataram que um indivíduo pode gerar um total de 118 a 247 casulos por ano, ou seja, entre 2,25 e 4,75 casulos por semana (Arunachalam, 1978; Baskaran et al., 1986; Bhattachararjee; Chaudhuri, 2002).

A reprodução e o crescimento das minhocas são mais altos na presença de matéria orgânica adicional no substrato (Bernardes; Kiehl, 1997), mas a proporção de matéria orgânica não deve ultrapassar 50% (em volume) (Senapati et al., 1999; Ayala; Barois, 2016). Quando esterco bovino é usado como alimento para a criação de *P. corethrurus*, a proporção a ser adicionada não deve superar 20-25%, pois maiores proporções podem levar à mortalidade dos indivíduos inoculados (Baskaran et al., 1986). Contudo, Guerra; Bezerra (1989) observaram um grande aumento na população e baixa mortalidade (5-13%) de *P. corethrurus* criado em esterco de ave puro. Na mistura de solo:esterco bovino, em proporção 1:1, também houve grande aumento na população, e mortalidade um pouco maior (17-23%). Em temperaturas de 24-27 ºC, a reprodução e o crescimento das minhocas são mais altos que em temperaturas menores ou maiores (Lavelle et al., 1987; Zhang et al., 2008). Do mesmo modo, a espécie parece preferir teores de umidade do substrato no nível ou acima da capacidade de campo (Lavelle et al., 1987), nas quais tanto o crescimento quanto a reprodução são maiores.

Por exemplo, observou-se um aumento de 13 vezes no número de indivíduos de *P. corethrurus* após 60 dias de incubação em uma mistura de 75% solo de floresta secundária e 25% de serragem compostada (proporção em volume), quando mantidas a capacidade de campo e temperaturas entre 24 °C e 29 °C (Senapati et al., 1999). Já, Bernardes e Kiehl (1993, 1997) observaram um aumento menor (5 vezes) ou equivalente (13 vezes) no número de indivíduos inoculados em suas culturas no laboratório, após 90 dias de incubação em dois solos (Latossolo Vermelho Amarelo e Latossolo Vermelho Escuro) com adição de 1,8% a 2,7% de esterco (proporção em massa), mantidos a 60% da capacidade de campo e 25 °C. Contudo, os indivíduos produzidos nesse período de tempo são juvenis e precisam de 2-3 meses adicionais para se tornarem adultos (Senapati et al., 1999). Portanto, criações massais de *P. corethrurus* para ensaios ecotoxicológicos são possíveis, mas produzirão menos indivíduos e demandam mais tempo e mão de obra do que criações de espécies epigêicas como *E. andrei*, *E. eugeniae* ou *P. excavatus*.

Apesar de não ser efetivamente comprovada a reprodutibilidade dos seguintes resultados, detalha-se, a seguir, um método simples de criação dessa espécie proposto por Senapati et al. (1999) e Pashanasi (2007), com algumas modificações. Esse método deve ser considerado apenas como um indicativo de como realizar uma criação desta espécie, e adaptações poderão serão necessárias dependendo das condições ambientais e laboratoriais presentes em cada local. Para maiores detalhes e descrição de como criar essa espécie, favor referir-se as publicações de Senapati et al. (1999), Pashanasi (2007) e Nath (2009).

Em caixas com dimensões de 60 cm x 40 cm (ou de 50 cm x 50 cm) e 15 cm a 20 cm de altura, colocar até uma altura de 10 cm uma mistura de solo natural e esterco bovino ou equino curtido ou serragem pré-compostada, na proporção de 3:1 (em volume), respectivamente. O solo deve ser preferencialmente de um local onde a espécie já é encontrada naturalmente, e depois de coletada a camada superior (0-10 cm), o solo deve ser peneirado e seco ao ar, para remover as minhocas e casulos presentes.

O esterco deve ser preferivelmente de animais criados em sistema orgânico de produção e/ou não conter resíduos de nematicidas, acaricidas ou hormônios (seguir recomendações da seção 4.1.3.3). O material orgânico deve estar livre de urina e/ou ser pré-curtido com compostagem usando métodos tradicionais (regado com água abundante e virado pelo menos 3 vezes por semana) por pelo menos 3 semanas. Após esse período o esterco deve ser seco a 40 °C, moído (<2 mm), e re-umedecido, pois esse processo aumentará a palatabilidade do material para as minhocas (Lowe; Butt, 2007).

A serragem deve ser também pré-compostada por um tempo mínimo de 30 dias, para que não fermente e gere demasiado calor, o que pode matar as minhocas. No caso da serragem usada por Pashanasi (2007), o material era proveniente de árvores serradas da floresta amazônica peruana, e havia sido depositada em pilhas ao ar livre por pelo menos 6 meses.

Determinar a capacidade de retenção de água do substrato (veja seção 7.4), para poder calcular a quantidade de água necessária a adicionar nas caixas de criação.

Coletar o número de minhocas suficiente para iniciar a criação (esse número deve ser calculado prevendo o número de caixas desejadas), preferivelmente em um lugar aonde sejam abundantes. É importante que também sejam todas do mesmo local, preferivelmente de uma área pequena (menor que 10 m^2), para diminuir a possibilidade de coletar exemplares de linhagens distintas de *P. corethrurus*, que às vezes podem ocorrer no mesmo local (comunicação pessoal[4]). Deve-se cultivar em laboratório um único clone ou linhagem dessa espécie, pois não se sabe ao certo ainda se existem diferenças comportamentais e biológicas entre as linhagens de *P. corethrurus*, que poderiam afetar os resultados dos testes ecotoxicológicos. Ao coletar as minhocas no campo, colocá-las em potes de plástico de 2 L com o substrato que será utilizado para a criação, para que estas comecem a se adaptar a esse substrato e, assim, esvaziem o solo do local de coleta de seus intestinos. Vinte indivíduos adultos podem ser

[4] Notícia fornecida por Luís Cunha no Laboratório de genética da Embrapa Florestas em Curitiba, em fevereiro de 2017.

colocados em aproximadamente 1 kg desse solo por até 2 semanas, enquanto se preparam as caixas de criação (ver seção 5.1). Não se recomenda esperar mais do que 3 semanas para iniciar a criação após a coleta das minhocas (Fründ et al., 2010).

Inocular 40 indivíduos adultos (equivalente a uma biomassa de aproximadamente 20 g) em cada caixa com o substrato. Usar apenas minhocas que não estiverem machucadas e que não demonstram aspecto comportamental ou morfológico anormal (ver seção 4.1.2) (Fründ et al., 2010).

Adicionar água à mistura até alcançar a umidade correspondente à capacidade de campo do substrato (medida anteriormente). Tampar a caixa (após fazer pequenos furos na tampa) e colocar em ambiente com temperatura controlada (por exemplo incubadora) a 26 ± 2 °C. Periodicamente, verificar a umidade do solo na caixa para evitar que se seque demais (especialmente se estiver dentro de uma incubadora).

Após 5 meses, retirar o solo e os adultos, que devem ter atingido o número de pelo menos 400 a 500 indivíduos (Senapati et al., 1999), o suficiente para fazer 40-50 réplicas num ensaio ecotoxicológico. Portanto, é necessário dimensionar o número de caixas de incubação com *P. corethrurus* de acordo ao número de indivíduos necessários para o ensaio ecotoxicológico, e começar a incubação com 5 meses de antecedência ao início do ensaio.

4.5 *Amynthas gracilis*

4.5.1 Características gerais e identificação

Apesar de ter sido descrita por Kinberg (1867), a partir de espécimes coletados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, a espécie *A. gracilis* é uma minhoca exótica no Brasil, sendo originária da Ásia, provavelmente da China (Gates, 1972). Pertence à família Megascolecidae, na qual não há espécies nativas no Brasil (Righi, 1997).

Amynthas gracilis tem sido frequentemente chamada por seus sinônimos júniores *A. hawayanus* ou *Pheretima hawayana*, vulgarmente conhecida como a minhoca 'saltadora', 'puladeira' ou 'louca' (Vanucci, 1953). Pode ser confundida com *A. corticis*, mas esta última possui quatro pares de espermatecas e cor mais esverdeada dorsalmente quando viva, enquanto *A. gracilis* tem três pares de espermatecas e tende a ter tom marrom escuro com reflexos violetas, dorsalmente quando viva (Figura 4.14, Tabela 4.5). Na região ventral, ambas as espécies possuem cor branca leitosa. Outras características morfológicas externas marcantes são o clitelo anelar bastante evidente nos segmentos 14-16, o poro feminino único no segmento 14, e as cerdas com distribuição periquitina, dando a volta completa em cada anel do corpo, chegando até 56 cerdas por segmento. Internamente, uma das características usadas para distinguir

Foto: George Gardner Brown

Figura 4.14. Exemplar de *A. gracilis* num tronco podre em floresta atlântica secundária, Londrina, PR.

Tabela 4.5. Características morfológicas externas e internas da espécie *A. gracilis* (Blakemore, 2002).

Caracteres externos	
Pigmentação	Presente, com iridescência metálica
Comprimento	56-156 mm
Diâmetro	3-6 mm
Segmentos	70-101
Prostômio	Epilóbico
Cerdas	Com distribuição tipo periquitina, dando toda a volta no corpo em cada segmento (até 56 cerdas por segmento), mas ausentes no clitelo
Clitelo	Anular, nos segmentos 14-16
Traves pubertais	Ausentes
Marcas genitais	Geralmente presentes, como pequenos discos pareados, nos segmentos 6-9 e 18
Poros dorsais	Presentes, começando nos segmentos 10-11
Poros espermatecais	Três pares, nos segmentos 5/6 a 7/8, pequenos
Poro feminino	Único, no meio do segmento 14 (ventral)
Poros masculinos	Pareados, pequenos no segmento 18
Caracteres internos	
Moela	Nos segmentos 8-9
Glândula calcífera	Ausente
Cêgo intestinal	Começa no segmento 28 e estende para a frente até o segmento 24; forma simples, às vezes com lóbulos dorsais ou ventrais
Tiflosol	Rudimentar ou ausente até o segmento 41 e de 41-64 mais largo, mas com interrupções
Nefrídeos	Do tipo micronefrídeo, com muitos por segmento, ora desembocando para o exterior, ora para o interior, no intestino
Corações	Nos segmentos 8-13, podendo ser laterais e latero-esofágicos
Espermatecas	Três pares de tamanho médio a grande, nos segmentos 6-8; ducto fino, mais curto que a âmpula e divertículo presente
Sacos testiculares	Nos segmentos 10-11, não pareados e ventrais
Testículos	Nos segmentos 11-12, tamanho médio a grande
Próstatas	Nos segmentos 16-24, com dutos musculares, 3-5 mm de comprimento

A. gracilis de outras espécies do gênero, ou de outros gêneros, é a localização das espermatecas (nos segmentos 6-8 em *A. gracilis*) e a forma e localização dos cegos intestinais. Para maiores informações, existem dois excelentes trabalhos que, apesar de relativamente antigos, estão escritos em português, sobre a morfologia de *A. gracilis* (Araújo, 1962; Righi, 1966). Um manual ilustrado, com chave de identificação de espécies exóticas comuns da família Megascolecidae, incluindo *A. gracilis*, foi publicado recentemente por Chang et al. (2016).

É uma espécie de tamanho intermediário, alcançando até 15 cm de comprimento (Tabela 4.5), em locais com bastante matéria orgânica. O diâmetro varia de 3-6 mm e sua biomassa individual pode chegar a >2,5 g (Senapati, 1992), sendo consideradas excelentes iscas para a pesca (James; Guimarães, 2010). Os nefrídeos, aparelhos excretores da minhoca, são muito pequenos e numerosos em *A. gracilis*, sendo que alguns abrem para o exterior e outros para o tubo digestivo (Righi, 1966). A descarga da excreta, especialmente em forma de amônia, para dentro do tubo digestivo é interpretada como uma forma de conservação de água na minhoca (Bahl, 1947). Esta pode contribuir significativamente para o aumento do pH e a concentração de nutrientes nos coprólitos e no solo com atividade dessa espécie (Peixoto; Marochi, 1996; Bartz et al., 2010b).

Na região Sul do Brasil, pode ser encontrada no solo e se reproduz o ano todo (Chang, 1997). Apesar de ser uma espécie amplamente distribuída no mundo (Gates, 1972; Blakemore, 2002), sua biologia é pouco conhecida, não havendo muitos trabalhos publicados sobre o tema. A espécie tem reprodução sexuada e os casulos são muito pequenos (Gates, 1972), normalmente contendo um indivíduo por casulo (Senapati, 1992), mas pode ser encontrado maior número (Selden et al., 2005). Supõe-se que os casulos eclodem em 15-30 dias e que o tempo para alcançar a maturidade sexual seja de 30-95 dias (Selden et al., 2005; Senapati, 1992).

É ubiquista, sendo encontrada frequentemente em ecossistemas perturbados como agroecossistemas, solos urbanos e florestas secundárias (Brown et al., 2006; Ressetti, 2006). Na região de São Paulo, há mais de 80 anos atrás, já era considerada a espécie mais abundante na zona urbana, supostamente substituindo a *P. corethrurus*, à medida que avançava a urbanização (Vanucci, 1953). Não obstante, pode também ser abundante em lavouras de plantio direto e mata secundária, alcançando densidades populacionais superiores a 100 indivíduos m^{-2} (Tanck et al., 2000; Brown et al., 2003; Azevedo et al., 2010). A espécie possui ampla tolerância a diferentes temperaturas e umidade do solo, podendo estar ativas no solo de 10 °C até 40 °C, e em baixas condições de umidade nas quais outras espécies (por ex., *P. corethrurus*) estão em quiescência ou diapausa (dados não publicados[5]).

A espécie é vista frequentemente na superfície do solo, tanto de dia (dados não publicados[6]), quanto de noite (Chuang et al., 2004). Devido a esse comportamento, é frequentemente coletada em armadilhas de queda (pitfall traps; Fernandes et al., 2010; comunicação pessoal[7]). Também responde bem a pulsa-

[5] Dados não publicados produzidos por G. Brown na Embrapa Soja, Londrina, PR em 2002-2005.

[6] Dados não publicados produzidos por G. Brown na Embrapa Soja, Londrina, PR em 2005, e na Embrapa Florestas, Colombo, PR, em 2008, 2009, 2013 e 2016.

[7] Notícia fornecida por Ricardo Ott, no Curso de Taxonomia de Oligoquetas, em Curitiba, PR, em março de 2014.

ções elétricas no solo e a soluções irritantes, subindo rapidamente à superfície do solo com aplicações de formol diluído, solução de mostarda, detergente e extrato de cebola (Ressetti et al., 2008; Azevedo et al., 2010; Steffen et al., 2013).

Alguns autores consideram a espécie como anécica (Herrera; Mischis, 2007b), endogêica (Kaplan et al., 1980b), epigêica (Barois, 1992) ou epi-endogêica, mas por seu hábito alimentar, pigmentação e distribuição no solo, deve ser considerada epi-endogêica (Brown; James, 2007; Falco; Momo, 2010). Normalmente é encontrada nos primeiros 10 cm superficiais do solo, mas também pode ser encontrada em camadas mais profundas, dependendo da época do ano, que determina as condições hídricas e temperatura do solo. Em condição de solo mais seco, pode ser encontrada em maior profundidade (por ex., 20-30 cm). Esta espécie prefere ambientes com maiores teores de matéria orgânica e menores teores de areia (Vanucci, 1953), e se alimenta de materiais mais frescos, em estágio inicial de decomposição, que podem ser usados na criação da espécie em cativeiro. Em vários lugares da Argentina e do Brasil, tem sido observada em troncos podres (Figura 4.14), em baixo de pedras, na serapilheira, debaixo de musgos, margens de cursos d'água e na margem de brejos (dados não publicados[8]; Herrera; Mischis, 2007b). O conteúdo intestinal normalmente é uma mistura de solo com abundantes fragmentos de matéria orgânica de fina granulometria, fibras e pedaços de vegetais.

[8] Dados não publicados produzidos por G. Brown na Embrapa Soja, Londrina, PR em 2003 a 2005 e na Embrapa Florestas, Colombo, PR, em 2006 a 2015.

A atividade bioturbadora de *A. gracilis* no solo pode aumentar a estabilidade de agregados, a macroporosidade do solo (Falco; Coviella, 2016), além da infiltração de água no solo, a condutividade hidráulica e a capacidade de retenção de água no perfil do solo (Kobiyama, 1994; Peixoto; Marochi, 1996), contribuindo, assim, para o crescimento de espécies florestais (Kobiyama et al., 1995; Maschio, 2012) e a produtividade agrícola de lavouras sob sistema de plantio direto (Peixoto; Marochi, 1996).

4.5.2 Criação e manutenção de *A. gracilis*

A. gracilis sobrevive bem a baixas ou altas temperaturas (5 °C a 33 °C), mas o cultivo deve ser realizado preferivelmente de 25-29 °C, onde o crescimento é mais rápido (Hartenstein et al., 1980; Kaplan et al., 1980b). Assim, como *P. corethrurus*, a espécie *A. gracilis* pode ser criada em laboratório usando uma mistura de solo e resíduos vegetais e/ou animais. Contudo, ao contrário da espécie anterior, deve haver separação entre o solo e o alimento (James; Guimarães, 2010), já que essa espécie sobe à superfície do solo para se alimentar (Kaplan et al., 1980a). Para o cultivo desta espécie deve-se considerar, portanto, duas camadas separadas, uma de solo e outra de alimento, que pode ser folhas em decomposição (Falco; Momo, 2010), restos de criações de animais de laboratório (coelhos, ratos; Chang, 1997), uma mistura de esterco animal e material vegetal pré-compostado (James; Guimarães, 2010), ou esterco curtido, tanto de equino quanto de bovino, mas preferivelmente deste último (Hartenstein et al., 1980; Chang, 1997).

O método de criação dessa espécie, descrito brevemente abaixo, foi desenvolvido por Afrânio Guimarães (comunicação pessoal[9]), e foi retirado de James e Guimarães (2010). Porém, como os detalhes do método não estão disponíveis, as recomendações abaixo devem ser consideradas apenas como um indicativo de como realizar uma criação desta espécie, e adaptações serão necessárias dependendo das condições ambientais e laboratoriais existentes em cada local.

A criação dessa espécie consiste em três etapas. A primeira é de reprodução das matrizes (produção de casulos), a segunda é de incubação dos casulos, e a terceira de desenvolvimento dos juvenis até a fase adulta. Para tal, é necessário ter várias caixas com dimensão aproximada de 60 cm x 40 cm e 15 cm ou 20 cm de altura, sendo duas delas com fundo e uma delas com o fundo plástico substituído por uma malha de 5 mm de espessura. A primeira caixa deve ser preenchida até uma altura de 15 cm a 20 cm com solo natural, preferivelmente, da camada superior (0-10 cm) de um local onde a espécie já se encontra naturalmente, peneirado e seco ao ar, para remover as minhocas e casulos presentes. Uma vez na caixa, umedecer o solo a 70% da capacidade de campo, previamente calculada (ver seção 7.4). Essa camada é a "casa" da minhoca, onde esta realizará o acasalamento e a construção de túneis e galerias. Logo acima desta caixa, colocar a caixa vazada, com a tela de 5 mm de espessura como fundo, e adicionar uma camada de 5 cm a 10 cm de altura de uma mistura de esterco animal e restos vegetais pré-compostados. Essa camada deve estar em contato com o solo da caixa de baixo, e representa a camada de reprodução das minhocas, onde estas depositarão os casulos. Na caixa de baixo, colocar 200 indivíduos adultos. Ao final de quatro semanas, a camada superior, onde se encontram os casulos deve ser removida e substituída por outra caixa vazada com tela, com uma nova camada com alimento e para a reprodução. A camada contendo os casulos deve ser retirada da caixa e colocada diretamente em cima de uma nova caixa com uma camada de 15 cm de solo natural, sem minhocas, onde os casulos poderão eclodir e os juvenis se desenvolverem. Em cima dessa caixa, deve ser colocada outra caixa vazada com tela e alimento para as minhocas. Essas caixas deverão ser incubadas durante 45 dias, ou até a maioria dos animais alcançar o estágio adulto. Uma vez alcançado essa fase, os adultos podem ser usados para os ensaios ecotoxicológicos, ou como matrizes para a produção de mais casulos ao longo das próximas semanas. Dessa forma, se poderá gerar repetidamente uma população de adultos e casulos, que podem ser usados para ensaios ecotoxicológicos e para começar novos cultivos de juvenis.

[9] Notícia fornecida por Afrânio Guimarães no 4º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas, em Curitiba, em outubro de 2010.

4.6 Enquitreídeos

As normas NBR-ISO 16387 (ABNT, 2012), ISO 16387 (ISO, 2014) e OCDE 220 (OCDE, 2004) recomendam a utilização de espécies do gênero *Enchytraeus*, particularmente a espécie *E. albidus*, além de *E. crypticus* e outras espécies, como organismos-teste para os ensaios ecotoxicológicos de

letalidade e reprodução (no capítulo 2, as vantagens e desvantagens do uso dessas espécies no Brasil são discutidas). A seguir, descrevemos o método de criação e manuseio para enquitreídeos enfocando as espécies *E. crypticus* e *E. albidus*, que são as mais utilizadas em ensaios ecotoxicológicos de laboratório atualmente.

4.6.1 *Enchytraeus crypticus*

A espécie *E. crypticus* (Figuras 2.2 e 4.15) foi descrita por Westheide & Graefe (1992), tendo como característica principal a espermateca alongada com âmpula não inflada e sem alargamentos do lúmen. O comprimento do adulto varia de 3 mm a 12 mm e apresenta um ciclo de vida de aproximadamente 20 dias e sobrevive 85 dias a 21±2 °C em substrato de ágar, sendo que a maturação, ou seja, o período entre a eclosão e o aparecimento de oócitos vitelogênicos (esferas brancas na região clitelar) ocorre em 8,3 dias. O número médio de ovos por casulo observado por esses autores foi de 7,6, variando de 1 a 35, sendo de 4,6 o número médio de ovos produzidos por dia por indivíduo. O tempo entre a oviposição até a eclosão para *E. crypticus* é de 9,1 dias. Essa espécie é prolífica, Achazi (1997) relatou o número de 104 juvenis produzidos por adulto em 28 dias em solo natural padrão LUFA 2.2 a 20 °C, enquanto Kuperman et al. (2006) relata a produção de cerca de 48 juvenis em solo artificial OCDE. Apesar do seu tamanho pequeno, seu uso em ensaios ecotoxicológicos tem se popularizado devido ao ciclo de vida curto e maior tolerância a temperaturas altas.

Fotos: Cintia Carla Niva

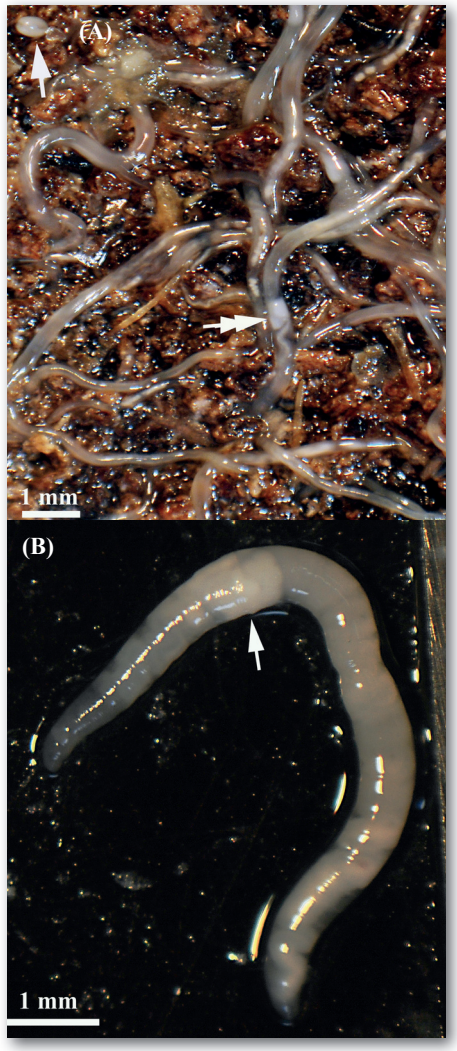


Figura 4.15. (in vivo). Criação de *E. crypticus* sobre solo artificial tropical (SAT) úmido (A). Seta indica um casulo e seta dupla indica clitelo de indivíduo adulto. *E. crypticus* adulto com oócitos maduros visíveis na região do clitelo indicado por seta (B).

4.6.2 *Enchytraeus albidus*

E. albidus (ver Figura 1.1f) é a espécie classicamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos, sendo também utilizada como alimento vivo para peixes ornamentais. *E. albidus*, também chamado de "white worm", tem um tamanho avantajado em relação a outras espécies do mesmo gênero, variando o comprimento entre 15 mm a 40 mm, o que facilita o seu manuseio nos ensaios ecotoxicológicos (ABNT, 2012). Pode ser reconhecido pela presença de 4 cerdas por feixe ventralmente, e um ducto seminal longo na região do clitelo (Bell, 1958). Quando criados a 18 °C e 12 °C, o ciclo da espécie é de 33 e 74 dias, o desenvolvimento embrionário é de 12 e 18 dias, a maturidade é alcançada em 21 e 56 dias após eclosão e cada casulo apresenta entre 10 e 7 ovos, respectivamente (ABNT, 2012; Römbke, 1995).

4.6.3 Enquitreídeos fragmentadores

Algumas espécies de enquitreídeos podem se reproduzir por fragmentação de seu corpo seguida da regeneração das porções perdidas. Essas espécies dificilmente desenvolvem clitelo e são capazes de atingir comprimentos maiores

que 10 mm, em aproximadamente 10 dias, antes de se fragmentarem em vários pedaços que regenerarão a porção anterior e posterior em 4-5 dias (Myohara et al., 1999; Niva et al., 2012). As espécies mais estudadas são *Cognettia sphagnetorum*, devido à sua abundância e importância ecológica em florestas na Europa (Lundkvist, 1982; Augustsson; Rundgren, 1998). Entretanto, as espécies *Enchytraeus bigeminus* e *Enchytraeus japonensis* são mais utilizadas em estudos sobre o mecanismo de regeneração (Christensen, 1994; Myohara et al., 2006).

Apesar do modo de reprodução diferente das espécies recomendadas na norma padronizada (ABNT, 2012), estes organismos também são interessantes para o uso em ensaios ecotoxilógicos, devido à relevância ecológica e facilidade de criação em massa. Tanto *C. sphagnetorum* como *E. bigeminus* foram apresentadas como tendo bom potencial como organismos teste em ensaios ecotoxicológicos (Augustsson; Rundgren, 1998; Bandow et al., 2013). As espécies fragmentadoras do gênero *Enchytraeus* parecem ser comuns em solos de áreas com grau de perturbação maior no Brasil, possivelmente devido à facilidade de adaptação a mudanças do ambiente (Römbke et al., 2007; Schmelz et al., 2013). No Brasil, foram registradas as ocorrências das espécies *E. bigeminus* e *Enchytraeus dudichi* (Niva et al., 2012; Schmelz et al., 2013). Utilizando-se o mesmo meio de cultura e alimento, essas espécies são tão prolíficas como as espécies que se reproduzem por casulo. Em SAT por 40 dias, por exemplo, cinco indivíduos de *E. dudichi* produziram mais de 400 indivíduos, incluindo fragmentos em regeneração e indivíduos intactos (Niva et al., 2012).

Há alguns relatos de que culturas de espécies que se reproduzem por casulo (*E. crypticus* e *E. albidus*) foram contaminadas por espécies fragmentadoras. Quando isso acontece, as fragmentadoras tendem a dominar sobre as outras podendo levar à extinção da espécie não fragmentadora. A detecção desse tipo de contaminação é possível observando-se a redução dos casulos presentes nas culturas concomitante ao aumento de indivíduos ainda não clitelados maiores que *E. crypticus* (geralmente > 7 mm). Para os menos observadores, a presença de pequenos fragmentos pode ser confundida com os casulos devido ao tamanho ás vezes semelhante, mas sob uma lupa a diferença é facilmente percebida. O casulo apresenta a forma de um limão minúsculo (> 1 mm) transparente cujos ovos esféricos esbranquiçados em seu interior ficam visíveis (Figura 4.16). Ao longo do desenvolvimento dos ovos, os embriões se tornam alongados preenchendo o casulo (Figura 4.16B). Já os fragmentos podem ter comprimentos variados e possuem uma aparência esbranquiçada homogênea internamente que corresponde ao remanescente do tubo digestório com o tecido cloragógeno ao redor (Figura 4.16C). Essa contaminação pode ocorrer quando o solo/ substrato utilizado para a criação não estiver defaunado, ou pela introdução acidental de solo natural não defaunado nas culturas, ou pelo uso de instrumentos contaminados com pequenos enquitreídeos fragmentadores.

Fotos: Cintia Carla Niva

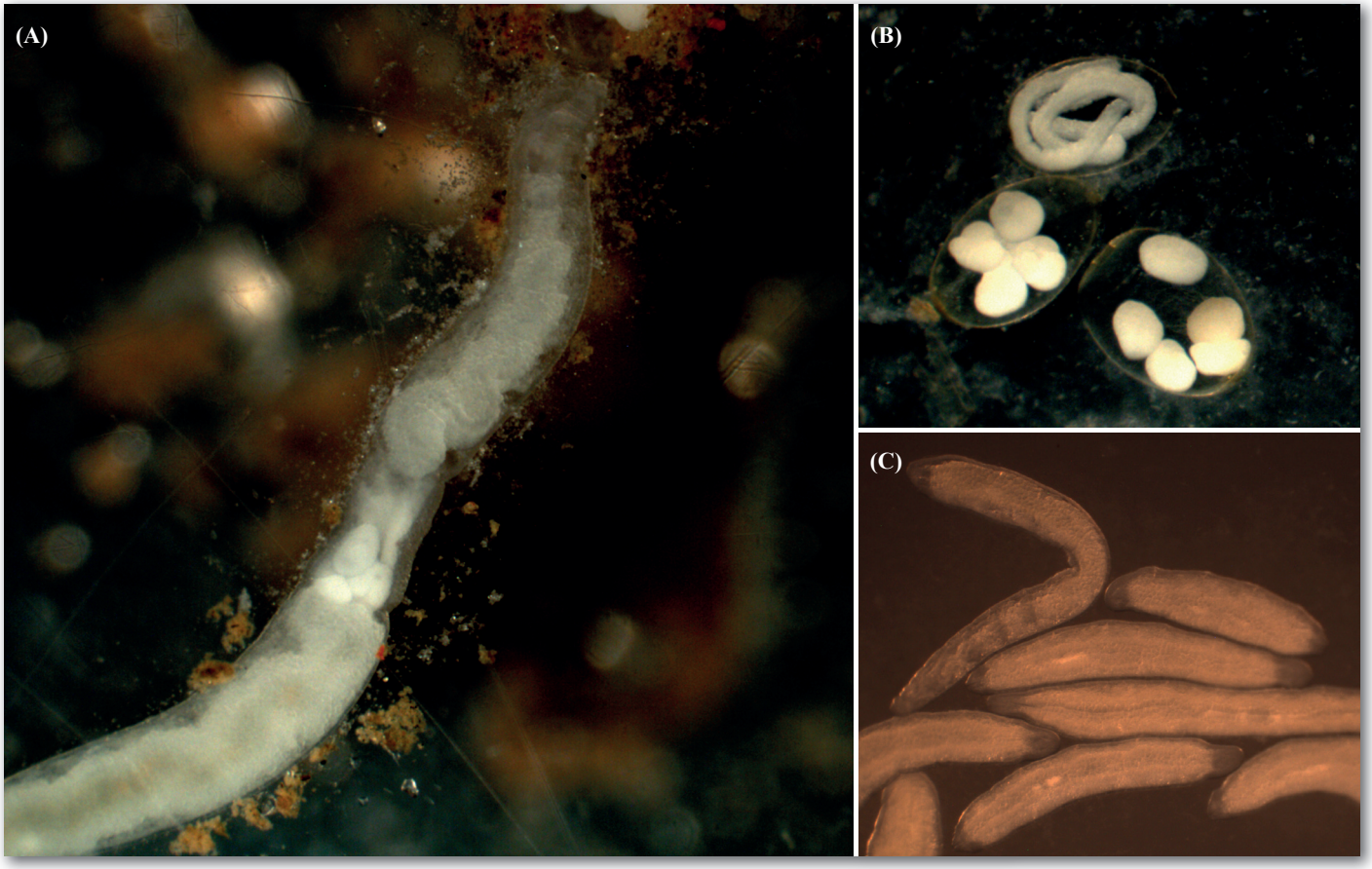


Figura 4.16. Enquitreídeos em vários estádios de desenvolvimento. (A) Vista da porção anterior de enquitreídeo de *Enchytraeus* sp. adulto sexualmente maduro com clitelo e, logo acima, casulo ovipositado contendo cinco ovos e circundados de partículas de solo dentro do substrato de ágar. Seta indica a posição do clitelo. (B) Três casulos de *Enchytraeus* sp. com ≥ 1 mm de diâmetro, dois apresentando embriões alongados em estádio mais adiantado de desenvolvimento e outro em estádio mais inicial. (C) Fragmentos de *Enchytraeus* sp. em regeneração nas extremidades. O fragmento no plano superior da foto à esquerda apresenta a porção cefálica intacta.

4.6.4 Métodos de criação

Para criação de enquitreídeos em larga escala, a norma ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda a utilização de caixas de plástico grandes com cerca de 10 cm profundidade (o tamanho pode variar dependendo do tamanho do ambiente onde serão mantidos), preenchidas com uma mistura de solo natural não contaminado defaunado (ABNT, 2012; Kuperman et al., 2006) e solo artificial (ver seção 7.1). Qualquer que seja o solo, a sua adequabilidade deve ser testada previamente. Recomenda-se que o pH do substrato esteja entre 5,5 e 6.5 e a temperatura entre 15 °C e 20 °C (evitar temperatura maior do que 23 °C) para *E. albidus*, e 20-25 °C para *E. crypticus*. O recipiente não deve ser vedado, pois a falta de oxigenação pode levar à extinção da cultura. Para tanto, recomenda-se o uso de tampas com pequenos orifícios ou apenas frouxamente fechadas de modo que permita a troca de gases. A aeração do substrato pode ser promovida revolvendo-o cuidadosamente uma vez a cada uma ou duas semanas,

e também para evitar a compactação. Não é necessária iluminação para manutenção das culturas.

Para os enquitreídeos, a aveia é o principal alimento utilizado para criação em massa e também nos ensaios ecotoxicológicos. A aveia em flocos finos deve ser usada preferencialmente, caso contrário, deve ser moída para o uso e, opcionalmente, pode ainda ser peneirada em malha fina para facilitar a alimentação. A aveia deve ser previamente submetida a um tratamento de desinfecção para reduzir a ocorrência de ácaros, nematoides ou outros organismos nas culturas. Isso poderá ser realizado por autoclavagem. A aveia deve ser acondicionada em frascos de vidro temperado tampados frouxamente e levados à autoclave por 20 minutos a aproximadamente 120 °C. Depois de autoclavados, os frascos com a aveia devem ser tampados e armazenados em local fresco. Caso o uso da autoclave não seja viável, a esterilização da aveia poderá ser feita por aquecimento, preparando-se um tipo de mingau com a aveia e água. Mesmo sem a esterilização, a criação em massa é totalmente viável, porém a contaminação pode aumentar consideravelmente e a manutenção tornar-se mais trabalhosa.

A alimentação recomendada pela norma NBR-ISO 16387 (ABNT, 2012) consiste de uma quantidade de flocos de aveia espalhados na superfície ou cuidadosamente misturados ao substrato uma ou duas vezes por semana. A quantidade de alimento não deve ser excessiva, pois isso poderá promover uma maior incidência de fungos crescendo sobre estes organismos ou sua fermentação e prejudicar a criação. Caso isso ocorra, o alimento contaminado deve ser removido e substituído por uma nova quantidade de aveia. Se as culturas se enfraquecerem (redução da biomassa e reprodução) a complementação nutricional pode ser feita com leite, óleo de fígado de bacalhau ou ração para peixes (ABNT, 2012). Qualquer que seja o substrato ou alimento, estes devem estar defaunados e livres de qualquer tipo de substância tóxica.

O monitoramento das culturas com o auxílio de um microscópio estereoscópio para verificar possíveis danos causados por outros organismos, ou pela alimentação excessiva, é importante para a manutenção de culturas saudáveis. Conforme a norma NBR-ISO 16387 (ABNT, 2012), as condições de cultivo podem ser consideradas adequadas se os enquitreídeos apresentam coloração esbranquiçada e superfície corporal brilhante sem partículas de solo aderidas (Figura 4.15), se não tentam deixar o substrato (fugir do recipiente de criação), se juvenis, adultos e casulos estão presentes, se há movimentação rápida dentro do substrato e, obviamente, se estão se reproduzindo constantemente. Os enquitreídeos devem ser transferidos para um substrato de cultivo novo a cada três meses aproximadamente, ou quando houver necessidade.

Os enquitreídeos também podem ser criados em substrato de ágar em outra sala ou incubadora como uma garantia no caso da cultura estoque ser perdida. Existem várias versões do meio de cultura à base de ágar na literatura, cuja aceitação da espécie deve ser testada previamente. A mais simples é composta por ágar em pó em água deionizada a 0.6-1% (por exemplo, Myohara et al., 1999), aquecendo-se a mistura em banho-maria ou microondas até completa dissolução. Esta é utilizada especialmente para enquitreídeos fragmentadores

do gênero *Enchytraeus*. Outra versão é composta por 1g l^{-1} $Ca(NO_3)_2$, 0.25 g l^{-1} $MgSO_4$, 0.25 g l^{-1} KNO_3 e 0.25 g l^{-1} KH_2PO_4 em água destilada a 1.5% de ágar (Westheide; Bethke-Beilfuss, 1991), utilizada para espécies de *Enchytraeus*. Niva (dados não publicados[10]) constatou que *E. crypticus* não se reproduz satisfatoriamente em ágar preparado com água deionizada e obteve sucesso na criação de *Enchytraeus* de várias espécies em ágar (0,8%-1%) preparado com água mineral. As placas de Petri (10 cm diâmetro) devem ser preenchidas até cerca da metade de sua capacidade com a mistura de ágar ainda quente. Os enquitreídeos podem ser acomodados sobre essa mistura assim que estiver solidificada e fria. Orifícios ou ranhuras feitas sobre a superfície do ágar facilitam a colonização A alimentação e adição de água para umedecer a superfície do ágar devem ser realizadas, semanalmente. O substrato deve ser renovado mensalmente, ou quando se apresentar liquefeito.

[10] Dados não publicados produzidos por C. Niva no Laboratório de Oligoquetas na Embrapa Florestas, Colombo, PR, em 2013.

A ocorrência de ácaros nas culturas de enquitreídeos é bastante frequente, especialmente quando o SAT é utilizado como substrato, mas parece não causar grandes problemas além da competição pelo alimento e dificultar o manuseio dos enquitreídeos para os ensaios. Alguns ácaros, no entanto, são predadores e podem causar algum incômodo aos juvenis, por serem presas mais fáceis. Caso a sua densidade tenha aumentado demasiadamente, o substrato pode ser levado à secagem por alguns dias (por exemplo, não repondo a água e deixando a tampa mais aberta), o que induz os enquitreídeos a migrarem para as camadas mais profundas. Em seguida, a camada mais superficial onde os ácaros ficam alojados pode ser removida (ABNT, 2012). Essa medida reduz o número de ácaros temporariamente, mas não os extermina. Outro método consiste em inundar o recipiente de criação com água e recolher os enquitreídeos sobre a superfície do substrato com uma pinça, pincel ou pipeta cuidadosamente. Eventualmente, outros organismos como colêmbolos, nematóides e larvas de Diptera também podem ocorrer, especialmente nas culturas mais velhas, mas, em geral, estes parecem não apresentar grande perigo aos enquitreídeos além da competição por alimento. Por precaução, caso a contaminação seja excessiva, recomenda-se que uma pequena parte dos enquitreídeos saudáveis seja transferida para um novo meio de cultivo e que o restante seja descartado. Os enquitreídeos transferidos devem estar limpos, livres de ácaros ou qualquer outro material que possa ser fonte de infestação.

A limpeza e seleção de enquitreídeos podem ser conduzidas da seguinte forma. Com uma pinça de ponta fina e lisa, uma porção de enquitreídeos da criação massal deve ser cuidadosamente transferida para uma placa de Petri com água, para que as impurezas e animais indesejados sejam removidos. Esse procedimento pode ser feito sob microscópio estereoscópio e sucção por meio de uma pipeta tipo Pasteur de plástico. A água deionizada ou a água mineral podem ser utilizadas nesse processo, mas a água ultrapura e de torneira devem ser evitadas, a primeira por causa da falta de sais na água, e a segunda, devido à possível presença de contaminantes.

Deve-se ter cuidado na manutenção de culturas de diferentes espécies em um mesmo ambiente para que não haja contaminação com indivíduos de outras

espécies. Não é raro que culturas mantidas em ágar "transbordem" enquitreídeos quando a densidade é excessivamente alta, ou seja, uma grande massa de enquitreídeos migra para fora do meio de cultura deslizando pelo espaço entre a tampa e a borda do recipiente. Isso parece ocorrer com mais frequência quando quantidade excessiva de alimento entra em processo de fermentação dentro do recipiente, podendo comprometer a cultura com grande mortalidade causada pela falta de oxigênio (Niva et al., 2010b). Por isso, recomenda-se cuidar com o excesso de alimento oferecido e que os recipientes de criação de diferentes espécies não permaneçam empilhados ou encostados, para evitar que indivíduos escapem de um recipiente e migrem para outro. Deve-se evitar utilizar os mesmos instrumentos na manipulação de indivíduos de diferentes culturas sem antes lavá-los e secá-los bem. Isto porque um juvenil pode estar aderido ao pincel ou pinça ou estar escondido entre os grânulos do solo e ser causa de contaminação.

Os restos de culturas ou resíduos com enquitreídeos vivos devem ser devidamente descartados (ver capítulo 16).

Ainda são poucas as espécies de outros gêneros encontrados no solo que tenham se reproduzido em laboratório além de *C. sphagnetorum*, espécie fragmentadora abundante em florestas coníferas na Europa, e que também apresenta potencial para estudos ecotoxicológicos (Augustsson; Rundgren, 1998). Springett (1970) obteve sucesso na criação de espécies dos gêneros *Marionina*, *Cognettia*, *Cernosvitoviella*, *Achaeta* e *Enchytraeus* em substrato de ágar com solo natural. Além disso, Didden (1997) relatou ter criado *Fridericia*, *Buchholzia*, *Henlea* e *Marionina* sem revelar detalhes do método. An e Yang (2009) relataram apenas a manutenção de *F. peregrinabunda* em laboratório para seu uso em ensaios de letalidade. No Brasil, algumas espécies de *Enchytraeus* com potencial para o uso em ensaios ecotoxicológicos estão sendo criadas e utilizadas com sucesso na Embrapa (Assis, 2015; Niva et al., 2016 , Niva et al., 2010b).

A identificação da espécie de enquitreídeos é feita com organismos ainda vivos preferencialmente e necessita de um treinamento específico (Schmelz; Collado, 2010; Niva et al., 2010a). Portanto, no caso de se utilizar organismos-teste de culturas provenientes de enquitreídeos coletados na área de interesse, é aconselhável que se mantenha uma cultura reserva de cada espécie para que um taxonomista possa confirmar a identidade quando houver necessidade. Outra opção é fixar alguns exemplares em solução Bouin ou, em último caso, diretamente em etanol 70%, mas nesses casos, especialmente no último, a identificação se torna muito mais difícil (Schmelz; Collado, 2010; Niva et al., 2010a).

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro, 2014. 13 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012. 29 p.

ACHAZI, R. K. Einfluss von anthropogenen Schadstoffen (PAK und PCB) auf terrestrische invertebraten urbaner Ökosysteme. In: KRATZ, W.; BROSE, A. (Ed.). **Bodenökologische untersuchungen zur wirkung und verteilung vonorganischen stoffgruppen (PAK, PCB) in ballungsraumtypischen Ökosystemen**. München: Abschlussbericht für das BMBF, 1997. p. 109-120

ADI, A. J.; NOOR, Z. M. Effects of vermicomposting duration to macronutrient elements and heavy metals concentrations in vermicompost. **Sains Malaysiana**, n. 39, v. 5, p. 711-715, 2010.

AN, Y.-J. Assessing soil ecotoxicology of methyl tert-butyl ether using earthworm bioassay; closed soil microcosm test for volatile organic compounds. **Environmental Pollution**, v. 134, p. 181-186, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.08.012.

AN, Y.-J.; LEE, W.-M. Comparative and combined toxicities of toluene and methyl tert-butyl ether to an Asian earthworm *Perionyx excavatus*. **Chemosphere**, v. 71, p. 407-411, 2008. DOI: 0.1016/j.chemosphere.2007.11.010.

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.

ALAGESAN, P.; VASUKI, B. Management of organic wastes by earthworms: dual benefit for environment and society. **International Journal of Global Environmental Issues**, v. 10, p. 327-338, 2010. DOI: 10.1504/IJGENVI.2010.037274.

ARAÚJO, M. X. **Contribuição ao estudo de *Pheretima hawayana***. Rio de Janeiro: Olímpica, 1962.

ARUNACHALAM, S. Some aspects of the biology of a tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (O.F. Müller). **Journal of the Bombay Natural History Society**, v. 75, p. 4-110, 1978.

ASSIS, O. **Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como indicadores do manejo do solo e em ensaios ecotoxicológicos**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus***. Philadelphia, 2004. (ASTM Guideline, E 1676-97).

ALAGESAN, P.; VASUKI, B. Management of organic wastes by earthworms: dual benefit for environment and society. **International Journal of Global Environmental Issues**, v. 10, p. 327-338, 2010.

AUGUSTSSON, A. K.; RUNDGREN, S. The Enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* in risk assessment: advantages and disadvantages. **Ambio**, v. 27, p. 62-69, 1998.

AWAKNAVAR, J. S.; KARABHANTANAL, S. S. Effects of agro-chemicals on growth and development of earthworm, *Pentoscolex corethrurus*. **Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring**, v. 15, p. 179-187, 2005.

AWAKNAVAR, J. S.; KARABHANTANAL, S. S. Toxicity of pesticides to earthworm, *Polypheritima elongate* (Michaelsen). **Journal of Entomological Research**, v. 28, p. 63-72, 2004.

AYALA, L. P.; BAROIS, I. Development of the earthworm *Pontoscolex corethrurus* in soils amended with a peat-based plant growing medium. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 131-137, 2016. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.10.005.

AZEVEDO, P. T. M.; BROWN, G. G.; BARETTA, D.; PASINI, A.; NUNES, D. H. Populações de minhocas amostradas por diferentes métodos de coleta (elétrico, químico e manual) em ecossistemas da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 79-93, 2010.

BAHL, K. N. Excretion in the Oligochaeta. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 22, p. 109-147, 1947. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1947.tb00325.x.

BANDOW, C.; COORS, A.; RÖMBKE, J. *Enchytraeus bigeminus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a new candidate for ecotoxicological laboratory tests. **Soil Organisms**, v. 85, p. 103-112, 2013.

BANO, K.; KALE, R. D. Reproductive potential and existence of endogenous rhythm in the reproduction of the earthworm *Eudrilus eugeniae*. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 38, p. 9-14, 1988.

BAROIS, I.; LAVELLE, P.; BROSSARD, M.; TONDOH, J.; MARTÍNEZ, M.; ROSSI, J. P.; SENAPATI, B. K.; ANGELES, A.; FRAGOSO, C.; JIMÉNEZ, J. J.; DECAËNS, T.; LATTAUD, C.; KANYONYO, J.; BLANCHART, E.; CHAPUIS, L.; BROWN, G. G.; MORENO, A. Ecology of earthworm species with large environmental tolerance and/or extended distributions. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CAB International, 1999. p. 57-85.

BAROIS, I. Mucus production and microbial activity in the gut of two species of *Amynthas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 1507-1510, 1992.

BARTZ, M. L.; COSTA, A. C. S.; SOUZA JUNIOR, I. G.; BROWN, G. G. Micronutrientes e óxidos de ferro em coprólitos de minhocas produzidos em um Latossolo Vermelho distroférrico (Acrudox) sob diferentes sistemas de manejo. **Acta Zoológica Mexicana (nueva série)**, v. 26, p. 281-294, 2010.

BARTZ, M. L.; COSTA, A. C. S.; SOUZA JUNIOR, I. G.; BROWN, G. G. Sobrevivência, produção e atributos químicos de coprólitos de duas espécies de minhocas (*Pontoscolex corethrurus*: Glossoscolecidae e *Amynthas gracilis*: Megascolecidae) em solos sob diferentes sistemas de manejo. **Acta Zoológica Mexicana (nueva série)**, v. 26, p. 261-280, 2010.

BASKARAN, P.; PALANICHAMY, S.; ARUNACHALAM, S.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Effects of cowdung on survival and cocoon production in tropical earthworms *Pontoscolex corethrurus*. **Environmental Ecology**, v. 4, p. 215-217, 1986.

BELL, A. W. The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. **American Museum Novitates**, v. 1902, p. 1-13, 1958.

BERNARDES, F. F.; KIEHL, J. C. Alteração no crescimento e na atividade de minhoca do gênero *Pontoscolex* pela adição de matéria orgânica e carbonato de cálcio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24., 1993, Goiânia. **Cerrados**: fronteira agrícola no século XXI: Resumos. Goiânia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993. p. 257-258, 1993.

BERNARDES, F. F.; KIEHL, J. C. Comportamento da minhoca *Pontoscolex corethrurus* sob diferentes condições de temperatura e umidade do solo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE

FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 21., 1994, Petrolina. **Fertilizantes**: insumo básico para agricultura e combate à fome: anais. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1994. p. 245-246.

BERNARDES, F. F.; KIEHL, J. C. Interações entre a *Pontoscolex corethrurus* e as propriedades químicas do solo. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 3., São Carlos, SP. **Resumos**... São Carlos: USPEESC, 1995b. v. 1. p. 386.

BERNARDES, F. F.; KIEHL, J. C. Reprodução da minhoca *Pontoscolex corethrurus* em dois solos e sob dois níveis de matéria orgânica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Informação de solo na globalização do conhecimento sobre o uso das terras**: resumos. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Embrapa-CNPS, 1997. CD-ROM.

BERNARDES, F. F.; RIBEIRO, C. M.; KLEIN, S. I. On the interaction of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and the microbiology of tropical soils. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 16., 1998, Montpellier. **Proceedings**… Montpellier: ISSS/AFES, 1998. CD-ROM.

BHATTACHARJEE, G.; CHAUDHURI, P. S. Cocoon production, morphology, hatching pattern and fecundity in seven tropical earthworm species: a laboratory-based investigation. **Journal of Bioscience**, v. 3, p. 283-294, 2002.

BIRUNDHA, M.; PAUL, J. A. J.; MARIAPPAN, P. Growth and reproduction of *Perionyx excavatus* in different organic wastes. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 28-35, 2013. DOI: 10.1007/s003740050414.

BLAKEMORE, R. J. **A series of searchable texts on earthworm ecology and taxonomy**. Yokohama: Vermicology. 2008.

BLAKEMORE, R. J. **Eeathworms of South East Queensland and their agronomic potential in brigalow soils**. 1994. Thesis (Ph.D. of Zoology) – University of Queensland, Queensland.

BLAKEMORE, R. J. Agronomic potential of earthworms in brigalow soils of south-east Queensland. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, v. 3/4, p. 603-608, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00186-1.

BLAKEMORE, R. J. **Cosmopolitan earthworms**: an eco-taxonomic guide to the peregrine species o f the World. Kippax: VermEcology, 2002.

BLAKEMORE, R. J. Earthworms newly from Mongolia (Oligochaeta, Lumbricidae, *Eisenia*). **Zookeys**, v. 285, p. 1-21, 2013. DOI: 10.3897/zookeys.285.4502.

BLAKEMORE, R. J. Eco-taxonomic profile of an iconic vermicomposter: the 'African Nightcrawler' earthworm, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867). **African Invertebrates**, v. 56, n. 3, p. 527-548, 2015. DOI: 10.5733/afin.056.0302.

BROWN, G. G.; BENITO, N. P.; PASINI, A.; SAUTTER, K. D.; GUIMARÃES, M. D. F.; TORRES, E. No-tillage greatly increases earthworm populations in Paraná state, Brazil. **Pedobiologia**, v. 47, p. 764-771, 2003.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: BROWN, G. G., FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 297-381.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W.; PASINI, A.; NUNES, D. H.; BENITO, 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, p. 339-358, 2006.

BROWN, G. G.; PASHANASI, B.; VILLENAVE, C.; PATRON, J. C.; SENAPATI, B. K.; GIRI, S.; BAROIS, I.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; BLAKEMORE, R. J.; SPAIN, A. V.; BOYER, J. Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX P. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CABI, 1999. p. 87-147.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. **Pedobiologia**, v. 54S, p. S19-S25, 2011. DOI: 10.1016/j.pedobi.2011.07.007.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; SOUZA, J. P. F. A. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 32-38, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.011.

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, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.150.

BUTT, K. R. Food quality affects production of *Lumbricus terrestris* (L.) under controlled environmental conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 2169-2175, 2011. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.06.021.

BUTT, K. R.; FREDERICKSON, J.; MORRIS, R. M. The intensive production of *Lumbricus terrestris* L. for soil amelioration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, 1321-1327, 1992.

BUTT, K. R.; FREDERICKSON, J.; MORRIS, R. M. The life cycle of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae) in culture. **European Journal of Soil Biology**, v. 30, p. 49-54, 1994.

CANADA. Environment Canada. Environmental Technology Centre. **Biological test method**: tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Ottawa, 2004. 184 p. (EPS 1/RM/43).

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.

CASTILHOS, R. M. V.; DICK, D. P.; CASTILHOS, D. D.; MORSELLI, T. B. A. G.; COSTA, P. F. P. da; CASAGRANDE, W. B.; ROSA, C. M. da. Distribuição e caracterização de substâncias húmicas em vermicomposto de origem animal e vegetal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2669-2675, 2008. DOI: 10.1590/S0100-06832008000700009.

CHANG, Y.-C. Minireview: natural history of *Amynthas hawayanus* (Rosa, 1891). **Acta Biologica Paranaense**, v. 26, p. 39-50, 1997.

CHANG, Y. C.; BRUNO, Z. The effect of Piperazine on toad and earthworm muscle membrane potentials. **Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 143-151, 1970. DOI: 10.1159/000136131.

CHANG. C.-H.; SNYDER, B. A.; SZLAVECZ, K. Asian Pheretimoid earthworms in North America north of Mexico: an illustrated key to the genera *Amynthas*, *Metaphire*, *Pithemera*, and *Polypheretima* (Clitellata: Megascolecidae). **Zootaxa**, v. 4179, n. 3, p. 495-529, 2016.

CHAUDHURI, P. S.; BHATTACHARJEE, S. Capacity of various experimental diets to support biomass and reproduction of *Perionyx excavatus*. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 147-150, 2002. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00169-9.

CHAUDHURI, P. S.; BHATTACHARJEE, S. Reproductive biology of eight tropical earthworm species of rubber plantations in Tripura, India. **Tropical Ecology**, v. 52, p. 49-60, 2011.

CHRISTENSEN, B. Annelida: Clitellata. In: ADIYODI, K. G.; ADIYODI, R. G. (Ed.). **Reproductive biology of invertebrates**: vol. VI part B. Asexual propagation and reproductive strategies. New Delhi: Oxford & IBH Publishing, 1994. p. 1-23.

CHUANG, S. C.; LEE, H.; CHEN, J. H. Diurnal rhythm and effect of temperature on oxygen consumption in earthworms, *Amynthas gracilis* and *Pontoscolex corethrurus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 301A, p.737-744, 2004. DOI: 10.1002/jez.a.96.

COOK, A. G.; CRITCHLEY, B. R.; CRITCHLEY, U.; PERFECT, T. J.; YEADON, R. Effects of cultivation and DDT on earthworm activity in a forest soil in the sub-humid tropics. **Journal of Applied Ecology**, v. 17, 21-29, 1980. DOI: 10.2307/2402960.

COULIBALY, S. S.; BI, I. A. Z. Influence of animal wastes on growth and reproduction of the African earthworm species *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p. 225-229, 2010. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.03.004.

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.

DE SILVA, P. M. C. S.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C. A. M. Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, macozeb and their formulations to the tropical earthworm, *Perionyx excavatus*. **Applied Soil Ecology**, v. 44, p. 5660, 2010. DOI: 10.1016/j.apsoil.2009.09.005.

DHARANI, S.; MANIMEGALA, G.; GUNASEKARAN, G; ANANTHAKRISHNASWAMY, S.; SAROJINI, S. Vermicomposting of flyash: A potential hazardous waste converted into nutritive compost by earthworms (*Eudrilus eugeniae*). **International Journal of Global Environmental Issues**, v. 10, p. 384-397, 2010.

DIDDEN, W. A. M.; FRUEND, H. L.; GRAEFE, U. Enchytraeids. In: BENCKISER, G. (Ed.). **Fauna in soil ecosystems**: recycling processes, nutrient fluxes and agricultural production. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 135-172.

DOMÍNGUEZ, J. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In: EDWARDS, C. A. (Ed.). **Earthworm ecology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 401-424.

DOMÍNGUEZ, J.; EDWARDS, C. A.; ASHBY, J. The biology and ecology of *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) (Oligochaeta) bred in cattle waste. **Pedobiologia**, v. 45, p. 341-353, 2001.

DOMÍNGUEZ, J.; EDWARDS, C. A. Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In: EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; SHERMAN, R. (Ed.). **Vermiculture technology**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 27-40.

DOMÍNGUEZ, J.; EDWARDS, C. A. Effects of stocking rate and moisture content on the growth and maturation of *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in pig manure. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, p. 743-746, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00276-3.

DOMÍNGUEZ, J.; FERREIRO, A.; VELANDO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? **Pedobiologia**, v. 49, p. 81-87, 2005. DOI: 10.1016/j.pedobi.2004.08.005.

DOMÍNGUEZ, J.; GÓMEZ-BRANDÓN, M. G. Ciclos de vida de las lombrices de tierra aptas para el vermicompostaje. **Acta Zoológica Mexicana** (nueva série), v. 26, p. 309-320, 2010.

DOMÍNGUEZ, J.; PÉREZ-LOZADA, M. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 321-331, 2010.

DUARTE, A. P.; MELO, V. F.; BROWN, G. G.; PAULETTI, V. Earthworm (*Pontoscolex corethrurus*) survival and impacts on properties of soils from a lead mining site in Southern Brazil. **Biology & Fertility of Soils**, v. 50, p. 51-60, 2014. DOI: 10.1007/s00374-014-0906-y.

EDWARDS, C. A.; DOMINGUEZ, J.; NEUHAUSER, E. F. Growth and reproduction of *Perionyx excavatus* (Perr.) (Megascolecidae) as factors in organic waste management. **Biology &. Fertility of Soils**, v. 27, p. 155-161, 1998. DOI: 10.1007/s003740050414.

EDWARDS, C. A. **Earthworm Ecology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2004. 438 p. v. 3.

EISEN, G. Pacific Coast Oligochaeta II. **Memoirs of the California Academy of Sciences**, v. 2, n. 5, p. 123-198, 1896.

FALCO, L. B.; MOMO, F. Selección de hábitat: efecto de la cobertura y tipo de suelo en lombrices de tierra. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 179-187, 2010.

FALCO, L.; COVIELLA, C. Contribution of *Amynthas gracilis* (Megascolecidae) and *Octolasion cyaneum* (Lumbricidae) to soil physical stability: a mesocosm experiment. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo**, v. 48, p. 115-127, 2016.

FERNANDES, J. O.; UEHARA-PRADO, M.; BROWN, G. G. Minhocas exóticas como indicadoras de perturbação antrópica em áreas de Floresta Atlântica. **Acta Zoologica Mexicana**, v. 26, p. 211-217, 2010.

FERRUZZI, C. **Manual de minhocultura**. Lisboa: Litexa, c1989. 165 p.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology,** v. 3, p. 294-299, 1994.

FOURIE, F.; REIECKE, S. A.; REINECKE, A. J. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 361-368, 2007. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.10.005.

FRÜND, H.-C.; BUTT, K.; CAPOWIEZ, Y.; EISENHAUER, 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.

GAJALAKSHMI, S.; RAMASAMY, E. V.; ABBASI, S. A. Potential of two epigeic and two anecic earthworm species in vermicomposting of water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 177-181, 2001.

GANESH, P. S.; GAJALAKSHMI, S.; ABBASI, S. A. Vermicomposting of the leaf litter of acacia (*Acacia auriculiformis*): possible roles of reactor geometry, polyphenols and lignin. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1819-1827, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.09.051.

GARCÍA, J. A.; FRAGOSO, C. Growth, reproduction and activity of earthworms in degraded and amended tropical open minded soils: laboratory assays. **Applied Soil Ecology**, v. 20, p. 43-56, 2002.

GARCÍA, J.; FRAGOSO, C. Influence of different food substrates on growth and reproduction of two tropical earthworm species (*Pontoscolex corethrurus* and *Amynthas corticis*). **Pedobiologia**, v. 47, p. 754-763, 2003. DOI: 10.1078/0031-4056-00255.

GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283 f. Theis (Ph.D.) - University of Bonn, Bonn.

GARG, P.; GUPTA, A.; SATYA, S. Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: a comparative study. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 391-395, 2006. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.03.009.

GARG, V. K.; CHAND, S.; CHHILLAR, A.; YADAV, A. Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in various animal wastes during vermicomposting. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 51-59, 2005.

GARG, V. K.; KAUSHIK, P.; YADAV, Y. K. Effect of stocking density and food quality on the growth and fecundity of an epigeic earthworm (*Eisenia fetida*) during vermicomposting. **Environmentalist**, v. 28, p. 483-488, 2008. DOI: 10.1007/s10669-008-9173-5.

GATES, G. E. Burmese earthworms: an introduction to the systematics and biology of megadrile oligochaetes with special reference to Southeast Asia. **Transactions of the American Philosophical Society**, New Series, v. 62, n. 7, p. 1-326, 1972. DOI: 10.2307/1006214.

GATES, G. E. Contributions to North American earthworms (Annelida). Nº 6: contributions to a revision of the earthworm family Glossoscolecidae. I. *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857). **Bulletin of the Tall Timbers Research Station**, v. 14, p. 1-12, 1973.

GATES, G. E. On Burmese earthworms of the family megascolecidae. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 123, p. 203-282, 1960.

GIRADDI, R. S. Effect of stocking rate of *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) on vermicompost production. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 21, p. 49-51, 2008.

GRAFF, O. Preliminary experiments on vermicomposting of different waste materials using *Eudrilus eugeniae* Kinberg. In: APPELHOF, M. (Ed.). **Workshop on the role of earthworms in the stabilization of organic residues**. Kalamazoo: Beech Leaf Press, 1981. p. 178-191.

GRAFF, O. Vergleich der Regenwurmarten *Eisenia foetida* und *Eudrilus eugeniae* hinsichtlich ihrer Eignung zur Proteingewinnung aus Abfallstoffen. **Pedobiologia**, v. 23, p. 277-282, 1982.

GUERRA, T. R.; BEZERRA, D. R. B. Comportamento de *Pontoscolex corethrurus* Müller, 1857 (Oligochaeta, Glossoscolecidae) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, p. 1057-1064, 1989.

GUPTA, R.; CHAKRAVORTY, P. P.; KAVIRAJ, A. Studies on the relative toxicities of six insecticides on epigeic earthworm, *Perionyx excavatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, p. 83-86, 2010. DOI: 10.1007/s00128-010-0038-5.

GUPTA, S. K.; SRIVASTAVA, R.; MATHUR, N.; SAXENA, P. N. The comparative effects of metals on the hatching of earthworm cocoons. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 34, p. 491-498, 2006.

HALLATT, L.; REINECKE, A. J.; VILJOEN, S. A. The life cycle of the oriental compost worm *Perionyx excavatus* (Oligochaeta). **South African Journal of Zoology**, v. 25, p. 41-45, 1990.

HALLATT, L.; VILJOEN S. A.; REINECKE, A. J. Moisture requirements in the life cycle of *Perionyx excavatus* (Oligochaeta). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 1333-1340, 1992. 10.1016/0038-0717(92)90114-D.

HAMOUI, V. Life-cycle and growth of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligoqueta, Glossoscolecidae) in the laboratory. **Revue d'Écologie et de Biologie du Sol**, v. 28, p. 469-478, 1991a.

HAMOUI, V. Efeito de ferimentos no crescimento de *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae). **Acta Biológica Paranaense**, v. 20, p. 135-143, 1991b.

HARTENSTEIN, D. L.; HARTENSTEIN, R.; MALECKI, M. R.; NEUHAUSER, E. F. Role of the pheretimoid worms, *Amynthas hawayana* and *A. rodericensis* in soils and recycling. **Revue d´Écologie et de Biologie du Sol**, v. 17, n. 2, p. 165-171, 1980.

HERNÁNDEZ, B.; BAROIS, I.; BROWN, G. G.; GARCÍA, J. A. P. Modificaciones químicas en suelos de Veracruz México, inducidas por dos especies de lombrices geófagas. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 295-308, 2010.

HERRERA, J. A. D.; MISCHIS, C. C. Lombrices de tierra de las Yungas: taxonomía, biogeografía y ecología en áreas de selva subtropical (Provincia de Jujuy, Argentina). In:

BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007a. p. 261-270.

HERRERA, J. A. D.; MISCHIS, C. C. Diversidad, abundancia y distribución de lombrices de tierra en áreas protegidas de Selva Subtropical de Montaña: La Reserva Fiscal Parque la Florida (Tucumán, Argentina). In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007b. p. 271-279.

HUBER, A. C. K.; MORSELLI, T. G. B. A.; KROLOW, I. R. C. Estudo da mesofauna (ácaros e colêmbolos) e macrofauna (minhocas) no processo da vermicompostagem: I – mesofauna. **Revista Brasileira de Agroecologia**, n. 1, v. 1, p. 1215-1219, 2006.

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

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneva, 2012.

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO 11268-2**: soil quality- efects of pollutants on earthworms (*Eienia fetida*). Part 2: determination of effects on reproduction. Geneva, 1998.

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO 16387**: soil quality effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO 16397**: Soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). determination of effects on reproduction. Geneva, 2004.

JAMES, S. W. Re-erection of Rhinodrilidae Benham, 1890, a senior synonym of Pontoscolecidae James, 2012 (Annelida: Clitellata). **Zootaxa**, v. 3540, p. 67-68, 2012.

JAMES, S. W.; GUIMARÃES, A. A. Discovery and development of new species for vermiculture. In: EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; SHERMAN, R. L. (Ed.). **Vermiculture technology**: earthworms, organic wastes and environmental management. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 41-52.

JAMES, S. W.; BARTZ, M. L. C.; STANTON, D. W. G.; CONRADO, A. C.; DUPONT, L.; TAHERI, S.; SILVA, E.; CUNHA, L.; BROWN, G. G. A neotype for *Pontoscolex corethrurus* (Clitellata). **Zootaxa**, v. 4545, n. 1, 2019.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**, v. 13, p. 51-83, 2005.

JASMINE, R. S.; KUTTALAM, S.; STANLEY, J. Acute toxicity of abamectin to earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) and *Perionyx excavatus* (Perrier). **Resistant Pest Management Newsletter**, v. 17, p. 27-30, 2008. DOI: 10.1007/s11356-017-9236-6.

JOSHI, N.; DABRAL, M. Life cycle of earthworms *Drawida nepalensis*, *Metaphire houletti* and *Perionyx excavatus* under laboratory controlled conditions. **Life Science Journal**, v. 5, p. 83-86, 2008.

KALE, R. D.; BANO, K.; KRISHNAMOORTHY, R. W. Potential of *Perionyx excavatus* for utilizing organic wastes. **Pedobiologia**, v. 23, p. 419-426, 1982.

KAPLAN, D. L.; HARTENSTEIN, R.; NEUHAUSER, E. F. Coprophagic relations among the earthworms *Eisenia foetida*, *Eudrilus eugeniae* and *Amynthas* spp. **Pedobiologia**, v. 20, p. 74-84, 1980a.

KAPLAN, D. L.; HARTENSTEIN, R.; MALECKI, M. R.; NEUHAUSER, E. F. Role of Pheretimoid worms, *Amynthas hawayana* and *A. rodericensis* in soils and recycling. **Révue d'Écologie et Biologie du Sol**, v. 17, p. 165-171, 1980b.

KHALIL, A. M. Ecotoxicological bioassays of the earthworms *Allolobophora caliginosa* Savigny and *Pheretima hawayana* Rosa treated with arsenate under laboratory conditions. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 3, n. 2, p. B261-B268, 2013.

KHALIL, A. M. Neurotoxicity and biochemical responses in the earthworm *Pheretima hawayana* exposed to TiO2 NPs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 455-461, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.010.

KHWAIRAKPAM, M.; BHARGAVA, R. Vermitechnology for sewage sludge recycling. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 948-954, 2009a.

KHWAIRAKPAM, M.; BHARGAVA, R. Bioconversion of filter mud using vermicomposting employing two exotic and one local earthworm species. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5846-5852, 2009b. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.038.

KLOK, C. Effects of earthworm density on growth, development and reproduction in *Lumbricus rubellus* (Hffm.) and possible consequences for the intrinsic rate of population increase. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2401-2407, 2007.

KOBIYAMA, M. **Influência da minhoca louca (*Amynthas* spp. Rosa, 1891) sobre o movimento da agua no solo, relacionado ao crescimento da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. 1994. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KOBIYAMA, M.; BARCIK, C.; SANTOS, H. R. Influência da minhoca (*Amynthas hawayanus*) sobre a produção de matéria seca de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v. 13, p. 199-203, 1995.

KORIA, L.; THANGARAJ, T. Toxicity assessment of *Annona squamosa* oil cake using earthworm bioassay. **Nature Enviroment and Pollution Technology**, v. 10, p. 91-93, 2011.

KUPERMAN, R. G.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; LANNO, R.; CHECKAI, R. T.; DODARD, S. G.; SUNAHARA, G. I.; SCHEFFCZYK, A. Adaptation of the enchytraeid toxicity test for use with natural soil types. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S234-S243, 2006. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.028.

LAVELLE, P.; BAROIS, I.; CRUZ, I.; FRAGOSO, C.; HERNANDEZ, A.; PINEDA, A.; RANGEL, P. Adaptive estrategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolicidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. **Biology and Fertility of Soils**, v. 5, p. 188-194, 1987. DOI: 10.1007/BF00256899.

LOEHR, R. C.; NEUHAUSER, E. F.; MALECKI, M. R. Factors affecting the vermistabilization process: temperature, moisture content and polyculture. **Water Research**, v. 19, p. 1311-1317, 1985. DOI: 10.1016/0043-1354(85)90187-3.

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.

LUNDKVIST, H. Population dynamics of *Cognettia sphagnetorum* (Enchytraeidae) in Scots pine forest soils in central Sweden. **Pedobiologia**, v. 23, p. 21-24, 1982.

MABOETA, M. S.; REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A. Effects of low levels of lead on growth and reproduction of the Asian earthworm *Perionyx excavatus* (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 236-240, 1999. DOI: 10.1006/eesa.1999.1797.

MARICHAL, R.; MARTINEZ, A. F.; PRAXEDES, C.; RUIZ, D.; CARVAJAL, A. F.; OSZWALD, J.; DEL PILAR HURTADO, M.; BROWN, G. G.; GRIMALDI, M.; DESJARDINS, T.; SARRAZIN, M.; DECAËNS, T.; VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation arc. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 443-449, 2010. DOI: 10.1016/j.apsoil.2010.09.001.

MASCHIO, W. **Populações de minhocas em plantios de *Eucalyptus* spp. e efeitos de *P. corethrurus* (Glossoscolecidae) e *Amynthas gracilis* (Megascolecidae) sobre o crescimento de mudas de *Eucalyptus* spp. em casa de vegetação**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MOROWATI, M. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. **The Environmentalist**, v. 20, p. 105-111, 2000. DOI: 10.1023/A:1006704009184.

MORSELLI, T. B. G. A. **Minhocultura**. Pelotas: Ed Universitária. 2009. 116 p.

MOSTERT, M. A. **The ecotoxicity of five insecticides to the *Pheretima group* (Oligochaeta) occurring on golf courses in the Pretoria region (South Africa)**. 2001. 112 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – University of Pretoria, Pretoria.

MOSTERT, M. A.; SCHOEMAN, A. S.; VAN DER MEWE, M. The relative toxicities of insecticides to earthworms of the *Pheretima group* (Oligochaeta). **Pest Management Science**, v. 58, p. 446-450, 2002. DOI: 10.1002/ps.473.

MÜLLER, F. *Lumbricus corethrurus*, Burstenschwanz. **Archiv fur Naturgattung**, v. 23, p. 6-113, 1857.

MYOHARA, M.; NIVA, C. C.; LEE, J. M. Molecular approach to annelid regeneration: cDNA subtraction cloning reveals various novel genes that are upregulated during the large-scale regeneration of the oligochaete, *Enchytraeus japonensis*. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 8, p. 2051-2070, 2006. DOI: 10.1002/dvdy.20849.

MYOHARA, M.; YOSHIDA-NORO, C.; KOBARI, F.; TOCHINAI, S. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. **Development, Growth and Differentiation**, v. 41, p. 549-555, 1999.

MYOHARA, M.; YOSHIDA-NORO, C.; KOBARI, F.; TOCHINAI, S. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. **Development, Growth & Differentiation**, v. 41, p. 549-555, 1999.

NADDAFI, K.; ZAMANZADEH, M.; OMRANI, G. A.; MESDAGHINIA, A. R.; AZIMI, A. A.; MOBEDI, E. Effect of stocking density on vermistabilization of waste activated sludge. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 119-122, 2006.

NAIR, K. V.; MANAZHY, J.; MANAZHY, A.; REYNOLDS, J. W. Biology of cocoons of five species of earthworms (Annelida: Oligochaeta) from Kerala, India. **Megadrilogica**, v. 13, p. 1-8, 2009.

NATH, S. **Earthworm resources in rubber plantations of Tripura with special reference to their ecological characteristics**. 2009. 138 f. Thesis (Zoology) - Tripura University, Tripura.

NATH, S.; CHAUDHURI, P. S. Growth and reproduction of *Pontoscolex corethrurus* (Muller) with different experimental diets. **Tropical Ecology**, v. 55, p. 305-312, 2014.

NDEGWA, P. M.; THOMPSON, S. A.; DAS, K. C. Effects of stocking density and feeding rate on vermicomposting of biosolids. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 5-12, 2000. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00055-3.

NEUHAUSER, E. F.; LOEHR, R. C.; MALECKI, M. R. The potential of earthworms for managing sewage sludge. In: EDWARDS, C. A.; NEUHAUSER, E. F. (Ed.). **Earthworms in waste and environmental management**. The Hague: SPB Academic Publishing, 1988. p. 9-20.

NEUHAUSER, E. F.; KAPLAN, D. L.; HARTENSTEIN, R. Life story of the earthworm *Eudrilus eugeniae*. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, v. 16, p. 525-534, 1979.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ , R. ; BROWN, G. G. Enquitreídeos (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, 2010a.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; SCHMELZ, R. M.; BROWN, G. G. Estabelecimento de coleção de culturas de enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ECOLOGIA E TAXONOMIA DE OLIGOQUETAS, 4., 2010, Curitiba. **Minhocas como bioindicadoras ambientais**: princípios e práticas: anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2010b.

NIVA, C. C.; NIEMEYER, J. C.; JÚNIOR, F. M. R. D. S.; NUNES, M. E. T.; DE SOUSA, D. L.; ARAGÃO, C. W. S.; SAUTTER, K. D.; ESPINDOLA, E. G.; SOUSA, J. P.; RÖMBKE, J. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11363-11378, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6597-1.

NIVA, C. C.; SCHMELZ, R. M.; BROWN, G. G. Notes on the reproduction, fragmentation and regeneration of *Enchytraeus dudichi* Dózsa-Farkas, 1995 sensu lato (Enchytraeidae, Oligochaeta) found in Paraná State, Brazil. **Landbauforschung**, nesp. 357, p. 13-19, 2012. (Newsletter on Enchytraeidae, n. 12).

NUNES, D. H.; PASINI, A.; BENITO, N. P.; BROWN, G. G. Earthworm diversity in four land use systems in the region of Jaguapitã, Parana State, Brazil. **Caribbean Journal of Science**, v. 42, p. 331-338, 2006.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)**. Paris, 2004. (OECD. Guideline for the testing of chemicals, 222).

PARELHO, C.; RODRIGUES, A. S.; BERNARDO, F.; BARRETO, M. C.; CUNHA, L.; POETA, P.; GARCIA, P. Biological endpoints in earthworms (*Amynthas gracilis*) as tools for the ecotoxicity assessment of soils from livestock production systems. **Ecological Indicators**, v. 95, p. 984-990, 2018.

PARTHASARATHI, K. Life cycle of *Lampito mauritii* (Kinberg) in comparison with *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) cultured on different substrates. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 4, p. 803-812, 2007.

PASHANASI, B. Producción masiva de lombrices de tierra (*Pontoscolex corethrurus*) en la Amazonía Peruana. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 519-523.

PEIXOTO, R. T. G.; MAROCHI, A. I. A influência da minhoca *Pheretima* sp. nas propriedades de um Latossolo vermelho escuro álico e no desenvolvimento de culturas em sistema de plantio direto, em Arapoti - PR. **Revista Plantio Direto**, set./out., p. 23-25, 1996.

PÉREZ-LOZADA, M.; EIROA, J.; MATO, S.; DOMÍNGUEZ, J. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Pedobiologia**, v. 49, p. 317-324, 2005.

REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A. Influence of worm density on growth and cocoon production of the aisatic earthworm *Perionyx excavatus* (Oligochaeta, Megascolecidae). **European Journal of Soil Biology**, v. 30, p. 29-33, 1994.

REINECKE, A. J.; VILJOEN, S. A. Effects of worm density on growth and cocoon production of the African Nightcrawler *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). **European Journal of Soil Biology**, v. 29, p. 29-34, 1993.

REINECKE, A. J.; VILJOEN, S. A.; SAAYMAN, R. J. The suitability of *Eudrilus eugeniae*, *Perionyx excavatus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta) for vermicomposting in Southern Africa in terms of their temperature requirements. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 1295-1307, 1992.

RESSETTI, R. Densidade populacional, biomassa e espécies de minhocas em ecossistemas de áreas urbanas. **Scientia Agraria**, v. 7, p. 61-66, 2006. DOI: 10.5380/rsa.v7i1.7273.

RESSETTI, R. R.; DIONÍSIO, J. A.; MOTTA, A. C. V. Comparação entre doses de alil isotiocianato e a solução de formaldeído na extração de minhocas. **Bragantia**, v. 67, p. 25-33, 2008. DOI: 10.1590/S0006-87052008000100003.

RIGHI, G. Minhocas da América Latina: diversidade, função e valor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Informação, globalização, uso do solo**: Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997. CD-ROM.

RIGHI, G. **Invertebrados**: a minhoca. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Educação, Ciência e Cultura, 1966.

RIGHI G. **Minhocas de Mato Grosso e Rondônia**. Brasília, DF: SCT/PR–CNPq, 1990a. (Programa do Trópico Úmido, Programa Polonoroeste, Relatório de pesquisa, 12).

RIGHI, G. *Pontoscolex* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) a new evaluation. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 19, p. 159-177, 1984. 10.1080/01650528409360653.

RODRÍGUEZ, C.; BRITO, S.; SIERRA, A. Estudio de los estados inmaduros de *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta: Eudrilidae) a dos temperaturas. **Revista Biologia (Cuba)**, v. 11, p. 45-54, 1988.

RODRÍGUEZ, C.; CANETTI, M. E.; REINES, M.; SIERRA, A. Ciclo de vida de *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta: Eudrilidae) a 30ºC. **Poeyana**, n. 326, p. 1-13, 1986.

RODRÍGUEZ, F. M.; MARTÍN, B. J. C.; VARGAS-MACHUCA, R. N.; ROVESTI, L. **Lombricultura**: manual práctico. La Habana: Instituto de Suelos, 2003. 99 p.

RÖMBKE, J. Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator. **Zeitschrift Umweltchemikalien & Schadstoff-Forschung**, v. 7, p. 246-249, 1995.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological tests with enchytraeids: a review. **Pedobiologia**, v. 47, n. 5/6, p. 607-616, 2003.

RÖMBKE, J.; AIRA, M.; BACKELJAU, T.; BREUGELMANS, K.; DOMÍNGUEZ, J.; FUNKE, E.; GRAF, N.; HAJIBABAEI, M.; PÉREZ-LOSADA, M.; PORTO, P. G.; SCHMELZ, R. M.; VIERNA, J.; VIZCAÍNO, A.; PFENNINGER, M. DNA barcoding of earthworms (*Eisenia fetida*/*andrei* complex) from 28 ecotoxicological test laboratories. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 3-11, 2016. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.02.010.

RÖMBKE, J.; COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M. Abundance, distribution, and indicator potential of enchytraeid genera (Enchytraeidae, Clitellata) in secondary forests and pastures of the Mata Atlântica (Paraná, Brazil). **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 31, p. 139-150, 2007.

SCHIEDECK, G.; MEDEIROS, M. G. de; SCHWENGBER, J. E. **Minhocultura e produção de húmus para agricultura familiar**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 12 p. (Circular técnica, 57).

SCHIEDECK, G.; STRASSBURGER, K. F. dos S.; SILVEIRA, E. F. da; HOLZ, F. P. **Alimentação de minhocas**: teste de aceitação do alimento. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 8 p. (Comunicado técnico, 236).

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

SCHMELZ, R. M.; NIVA, C.C.; RÖMBKE, J.; COLLADO, R. Diversity of terrestrial Enchytraeidae (Oligochaeta) in South America: current knowledge and their potential for future research. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 13-20, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.012.

SELDEN, P.; DUPONTE, M.; SIPES, B.; DINGES, K. Composting worms for Hawaii. **Home Garden**, v. 46, 2005.

SENAPATI, B. K. Vermitechnology: an option for recycling of cellulosic waste in India. In: SUBBA RAO, N.S.; BALAGOPALAM, C.; RAMKRISHNA, S.V. (Ed.). **New trends in biotechnology**. New Delhi: Oxford and IBH, 1992. p. 347-358.

SENAPATI, B. K.; LAVELLE, P.; GIRI, S.; PASHANASI, B.; ALEGRE, J.; DECAËNS, T.; JIMÉNEZ, J. J.; ALBRECHT, A.; BLANCHART, E.; MAHIEUX, M.; ROUSSEAUX, L.; THOMAS, R.; PANIGRAHI, P. K.; VENKATACHALAM, M. In-soil earthworm technologies for tropical agroecosystems. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CAB International, 1999. p. 199-237.

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, n. 3, p. 211-214, 2005.

SILVA, C. D.; COSTA, L. M.; MATOS, A. T.; CECON, P. R.; SILVA, D. D. Vermicompostagem de lodo de esgoto urbano e bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 487-491, 2002. DOI: 10.1590/S1415-43662002000300018.

SINGH, N. B.; KHARE, A. K.; BHARGAVA, D. S.; BHATTACHARYA, S. Optimum moisture requirement during vermicomposting using *Perionyx excavatus*. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 2, n. 1, p. 53-62, 2004.

SIVASANKARI, B.; INDUMATHI, S.; ANANDHARAJ, M. A study on life cycle of earth worm *Eudrilus eugeniae*. **International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences**, v. 1, n. 2, p. 64-67, 2013.

SPRINGETT, J. A. A method for culturing Enchytraeidae. **Oikos**, v. 15, n. 1, p. 175-177, 1964. DOI: 10.2307/3564754.

SPRINGETT, J. A. The distribution and life histories of some moorland Enchytraeidae (Oligochaeta). **The Journal of Animal Ecology**, v. 39, n. 3, p. 725-737, 1970. DOI: 10.2307/2863.

STEFFEN, G. P. K.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, R. B.; JACQUES, R. J. S.; DOS SANTOS, M. L. Earthworm extraction with onion solution. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 28-31, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.013.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; BARTZ, M. L. C.; JAMES, S. W.; JACQUES, R. J. S.; BROWN, G. G.; ANTONIOLLI, Z. I. Earthworm diversity in Rio Grande do Sul, Brazil. **Zootaxa**, v. 4496, p. 562-575, 2018.

SUTHAR, S.; RAM, S. Does substrate quality affect earthworm growth and reproduction patterns in vermicomposting systems? A study using three popular composting earthworms. **International Journal of Environment and Waste Management**, v. 2, p. 584-600, 2008.

SUTHAR, S.; SINGH, S. Vermicomposting of domestic waste by using two epigeic earthworms (*Perionyx excavatus* and *Perionyx sansibaricus*). **International Journal of Environmental Science and Technology**. v. 5, n. 1, p. 99-106, 2008. DOI: 10.1007/BF03326002.

TAHERI, S.; PELOSI, C.; DUPONT, L. Harmful or useful? A case study of the exotic peregrine earthworm morphospecies *Pontoscolex corethrurus*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 116, p. 277-289, 2018a. DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.10.030.

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, 2018b. DOI: 10.1016/j.ympev.2018.02.021.

TANCK, B. C. B.; SANTOS, H. R.; DIONÍSIO, J. A. Influência de diferentes sistemas de uso e manejo do solo sobre a flutuação populacional do oligochaeta edáfico *Amynthas* SPP. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 24, p. 409-415, 2000. DOI: 10.1590/S0100-06832000000200017.

TURRUELA, E. P.; RAMÍREZ, M. C.; MARTÍNEZ, F.; NODALS, A. R.; CONCEPCIÓN, N. C. **Manual para la producción de abonos orgánicos en la agricultura urbana**. La Habana: INIFAT, 2002. 106 p.

UMA MAHESWARI, S.; GOBI, M.; VIJAYALAKSHMI, G. S. Ecotoxicological evaluation using an earthworm species. **Pollution Research**, v. 21, p. 329-332, 2002. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.

VANNUCCI, M. Biological notes. I. On the Glossoscolecid earthworm *Pontoscolex corethrurus*. **Dusenia**, v. 4, p. 287-300, 1953.

VENTER, J. M.; REINECKE, A. J. The life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **South African Journal of Zoology**, v. 23, n. 3, p. 161-165, 1988.

VILJOEN, S. A.; REINECKE, A. J. The life-cycle of the African Nightcrawler *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). **South African Journal of Zooogy**, v. 24, p. 27-32, 1989.

VILJOEN, S. A.; REINECKE, A. The temperature requirements of the epigeic earthworm species *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta): a laboratory study **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 1345-1350, 1992.

WESTHEIDE, W.; BETHGE BEILFUSS, D. The sublethal enchytraeid test system: guideline and some results. In: ESSER, G.; OVERDIECK, D. (Ed.). **Modern ecology**: basic and applied aspects. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 497-508.

WESTHEIDE, W.; GRAEFE, U. Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). **Journal of Natural History**, v. 26, n. 3, p. 479-488, 1992. DOI: 10.1080/00222939200770311.

ZHANG, H.; YANG, X.-D.; DU, J.; WU, Y.-X. Influence of soil temperature and moisture on the cocoon production and hatching of the exotic earthworm *Pontosoclex corethrurus*. **Zoological Research**, v. 29, p. 305-312, 2008.

Coleta de oligoquetas no campo e seu preparo para ensaios ecotoxicológicos

5

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 *Amynthas* 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 *Amynthas* 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 *Amynthas* 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 aclimatação. 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 Emilio 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 °C, para análise posterior de DNA (por ex., código de barras), para avaliação genética da espécie utilizada. Alternativamente, um pedaço pequeno (0,5 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 °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 conlcuiu 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 40-50 °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. Exemplares 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.; EISENHAUER, 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. Enquitreídeos (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.

Ensaio de adaptação das minhocas aos solos naturais ou ao SAT

6

George Gardner Brown
Jörg Römbke
Katy Boniza Cantelli

Quando as espécies padrão *E. andrei* e *E. fetida* são avaliadas em testes ecotoxicológicos usando solo natural, faz-se necessário realizar um ensaio preliminar para certificar a aceitação do solo pela espécie alvo, devido à baixa mortalidade máxima (10%) permitida, e a reprodução mínima exigida (40 indivíduos juvenis) no tratamento controle (solo não contaminado) nos ensaios ecotoxicológicos (ver seção 11.2.8). Se o ensaio for realizado em solo contaminado, deve-se verificar a sobrevivência e reprodução das minhocas em um solo-referência não contaminado, com características químicas e físicas semelhantes ao contaminado. Da mesma forma, ensaios preliminares também devem ser realizados quando as avaliações incluírem outras espécies de minhocas em SAT ou em solo natural. Por exemplo, no caso de *A. gracilis*, ensaios preliminares indicaram que essas minhocas não se adaptaram ao SAT, tendo mortalidade ≥ 20% após 2 semanas (Cantelli, 2011), com e sem adição de alimento (esterco bovino). Nesse mesmo estudo (Cantelli, 2011), outra espécie, *Dichogaster annae*, comumente encontrada em minhocários no Brasil (James; Guimarães, 2010), não se adaptou ao solo natural (Latossolo vermelho), também apresentando mortalidade de 18% a 30%, acima do tolerado (10%) pela norma.

As espécies *E. fetida* e *E. andrei* já foram testadas usando uma ampla gama de solos naturais, especialmente na Europa (Jänsch et al., 2005; Römbke et al., 2006; Chelinho et al., 2011), mas também no Brasil (Tabela 2.1). Elas podem sobreviver e reproduzir dentro dos limites estabelecidos para os ensaios ecotoxicológicos padrão em solos com características físicas e químicas altamente variáveis (Tabela 6.1), e dentro de uma amplo espectro de condições edafo-climáticas e de alimentação, mostrando sua grande plasticidade fenotípica.

Tabela 6.1. Preferências e amplitude de condições edafo-climáticas no substrato teste, nas quais as espécies *E. andrei* ou *E. fetida* podem sobreviver e reproduzir, dentro dos limites estabelecidos para os ensaios ecotoxicológicos padrão da ISO (modificado de Jänsch et al., 2005).

Propriedade do solo	Preferência	Intervalo
Temperatura	20-25 ºC	0-35 °C
Umidade	40-60% da capacidade de campo	25-70% da capacidade de campo
pH	5-7	3,8-9,0
Textura do solo	Desconhecida, mas não crescem tão bem em solos muito arenosos ou muito argilosos	6 a >50% de argila
%C (mg kg^{-1})	3-20%	1,3 a >20%

Caso se deseje apenas realizar ensaios de fuga ou mortalidade com solo natural ou SAT, recomendamos seguir os passos detalhados na seção 6.1 e/ou 6.2, usando solo ou SAT não contaminados. Caso se deseje realizar ensaios de fuga, mortalidade e de reprodução com solo natural ou SAT, recomendamos realizar um ensaio de reprodução com SAT ou solo não contaminado, seguindo os passos detalhados na seção 4.9.2.

6.1 Ensaio rápido de aceitação ou rejeição de solo natural ou SAT

Para avaliar de modo rápido, a possível rejeição das minhocas a um determinado solo natural ou SAT, coloca-se 10 minhocas da espécie em questão em um recipiente-teste com 500 g de SAT ou do solo teste por 48 horas, seguindo procedimento parecido àquele explicado na seção 4.1.2. Caso se observe comportamento anormal ou rejeição do SAT ou do solo durante esse período (ver seção 4.1.2), é provável que haja restrições no mesmo para as minhocas, e recomenda-se procurar outro solo para o teste, ou outra espécie de minhoca. Caso as minhocas demonstrem aceitação ao SAT ou ao solo durante esse período de 48 horas, realizar o ensaio descrito na seção 6.2, a seguir.

6.2 Ensaio de aceitação ou rejeição de SAT ou solo natural

No caso do ensaio de adaptação das minhocas ao SAT ou solo natural deve-se:

1. Seguir os mesmos procedimentos para o SAT ou o solo, como aqueles especificados para o preparo de substrato teste no capítulo 7 (e seus sub-itens).
2. Usar o mesmo número (n=10 indivíduos) e biomassa de minhocas especificado na seção 11.2.1.
3. Usar o mesmo recipiente recomendado para o ensaio de letalidade (ver seção 11.2.2).
4. Usar a quantidade de SAT ou solo recomendada para a espécie a ser utilizada (ver seção 11.2.2).

Se o solo tiver <2% Carbono orgânico total, 5 g de alimento (esterco, preferivelmente de cavalo) para cada 500 g de solo devem ser adicionados na superfície do solo no início do ensaio, para as espécies de *Eudrilus*, *Perionyx* e *Eisenia*. Devem ser preparadas pelo menos cinco replicatas do solo natural ou SAT com as minhocas, e aos 7 e aos 14 dias (duração do ensaio de letalidade) as minhocas devem ser retiradas do SAT/solo, contadas, pesadas e a percentagem de mortalidade calculada. Se a mortalidade média for >10% aos 7 dias, o ensaio pode ser finalizado, não sendo necessário seguir até os 14

dias. Os casulos no SAT ou solo (confirmação de reprodução) também devem ser removidos e o comportamento e morfologia externa das minhocas devem ser observados para verificar se estão saudáveis. Caso se observe anormalidades comportamentais ou morfológicas (ver seção 4.1.2), mortalidade >10%, ou perda de biomassa >20% para *Eisenia* ou >25% para as demais espécies (ainda não existem dados para todas as espécies), as possíveis razões dessas alterações, mortalidade ou perda de biomassa devem ser buscadas, avaliando os resultados de uma análise química de rotina do solo. Neste caso, esse solo não deve ser usado para ensaios ecotoxicológicos com essa(s) espécie(s) de minhoca.

Todos os dados de biomassa, mortalidade, e qualquer alteração morfológica devem ser anotados e, caso se detecte rejeição do solo ou anormalidades morfológicas, fotos digitais devem ser tomadas dos indivíduos.

Referências

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

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; ANDRÉS, P.; SOUSA, J. P. Improving ecological risk assessment in the mediterranean area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two oligochaete species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1050-1058, 2011. DOI: 10.1002/etc.480.

JAMES, S. W.; GUIMARÃES, A. A. Discovery and development of new species for vermiculture. In: EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; SHERMAN, R. L. (Ed.). **Vermiculture technology**: earthworms, organic wastes and environmental management. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 41-52.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Reviews**, v. 13, p. 51-83, 2005. DOI: 10.1139/a05-007.

RÖMBKE, J.; JANSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNASS, H. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails, and plants for the assessment of metals in natural soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 776-787, 2006.

Preparo do substrato teste

7

Julia Carina Niemeyer
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Maria Edna Tenório Nunes
Paulo Roger Lopes Alves
Alexandre Martin Martines
Mara Mercedes de Andréa
George Gardner Brown
Cintia Carla Niva

A maior parte dos ensaios padronizados para invertebrados do solo foi desenvolvida para fornecer uma estimativa numérica dos efeitos da exposição a substâncias ou elementos químicos sobre os organismos, em substratos ou solos artificiais formulados. O primeiro substrato artificial recomendado para ensaios de toxicidade com minhocas (*Eisenia fetida*) foi o Artisol (Association Française de Normalisation, 1984), composto por sílica gel em mistura com bolas de vidro e água, sem qualquer similaridade com as propriedades físicas e químicas dos solos naturais. No Brasil, até recentemente, o Artisol era recomendado como substrato em normas locais (Ibama, 1990; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1990).

A partir de 1994, a Portaria nº 139 de 21 de dezembro de 1994 do Ibama introduziu a possibilidade de realização de ensaios ecotoxicológicos com metodologias distintas das constantes do manual do Ibama, desde que referenciadas e reconhecidas internacionalmente (Ibama, 1994). Passaram a ser utilizados os ensaios feitos de acordo com normas internacionais, como da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) ou da Agência Norte-Americana de Proteção do Meio Ambiente (EPA), mas somente substratos artificiais eram utilizados. Somente em 2007 a norma ABNT foi adotada no país, para ensaios de ecotoxicidade aguda com minhocas (ABNT, 2007), propondo o uso de solo artificial composto por areia, caulim e uma fonte de matéria orgânica.

Obviamente, o uso de solos de origem natural em ensaios ecotoxicológicos é importante em determinadas situações devido à maior relevância ecológica em comparação ao uso de solo artificial. Apesar disso, o uso do solo artificial ainda é bastante comum por ser um substrato padronizado e que permite comparações. Tanto para o uso do solo natural como para o solo artificial, ainda existem questões discutíveis em termos de relevância ou adequabilidade para as condições tropicais, ou do Brasil (ver capítulos 2 e 3; Cesar et al., 2014) que precisam ser discutidas amplamente e definidas. A seguir, descrevemos o preparo do solo artificial e natural como substratos para os ensaios ecotoxicológicos com organismos de solo.

7.1 Solo artificial

O substrato padrão, recomendado pelas normas ISO/OECD para a maioria dos estudos ecotoxicológicos terrestres com oligoquetas, é o solo artificial OECD (OECD, 1984), constituído por uma mistura de 70% de areia industrial fina (quartzosa - SiO_2), 20% de argila caulinítica (pelo menos 30% de caulinita) e 10% de turfa (moída e seca). No entanto, alguns autores tem adaptado a composição deste substrato para as condições ambientais brasileiras (Römbke et al., 2007; Garcia et al., 2011), sendo então denominado como Solo Artificial Tropical (SAT) (Figura 7.1). Neste caso, a fonte de matéria orgânica utilizada é o pó de fibra de casca de coco (seca e peneirada) em substituição à turfa devido à sua maior disponibilidade. Esta adaptação foi proposta por Garcia et al. (2004) e se manteve com a seguinte composição: 70% do volume total da mistura de areia, 20% de caulim e 10% de pó de fibra de casca de coco e tem sido a mais utilizada atualmente. Internacionalmente, o uso da fibra da casca de coco na composição do solo artificial também foi recomendada para regiões de clima tropical por De Silva et al. (2009). Recomenda-se que estudos adicionais sejam realizados para que estas proporções sejam mais bem ajustadas aos solos tropicais, especialmente no que diz respeito à porcentagem de matéria orgânica, já que constitui-se em um parâmetro do solo importante na avaliação de risco ambiental de agrotóxicos (Gomes; Espadotto, 2004). Na versão atualizada da norma ISO 16387 (ISO, 2014) aceita-se também a utilização de 5% de turfa nos ensaios com enquitreídeos, demonstrando a tendência de mudança nas recomendações para o solo artificial.

Tanto para o substrato de criação das minhocas quanto para a produção do SAT, o pó da fibra da casca de coco é largamente utilizado no Brasil (Tomczak et al., 2007; Dias et. al., 2009). Este produto, obtido comercialmente, não deve conter adição de fertilizantes. Antes de ser utilizado na preparação do SAT, o pó de fibra de coco deve ser peneirado (malha 5 mm) e disposto em bandejas para secar ao ar livre, já que há certa umidade agregada ao seu conteúdo, ou em estufa a 60 °C por 24 horas.

Figura 7.1. Composição do Solo Artificial Tropical.

O caulim (Figura 7.1), representando a fração de argila no solo, também é obtido comercialmente e deve ser esterilizado para ser utilizado no SAT. O caulim (de grau analítico) tem sido o mais utilizado atualmente.

Em relação à areia, mais de 50% das partículas devem ter entre 0,05 mm e 0,2 mm de diâmetro. Para garantir maior pureza, a areia deve ser lavada várias vezes com água deionizada e seca em estufa a 105 °C por 24 horas. A análise química da areia, e também do caulim, especialmente em relação aos possíveis resíduos de carbonato de cálcio presentes, pode prevenir problemas de ajuste do pH do substrato depois de preparado.

Depois da preparação inicial, os componentes do SAT devem ser misturados até a homogeneização. Retira-se, então, uma amostra para determinação do pH (ver seção 7.5), que deve estar na faixa de 6,0 ± 0,5. A correção do pH (no caso de estar abaixo da faixa recomendada) pode ser feita pela adição de carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Em geral, o pH do SAT atinge a faixa recomendada sem

correção com $CaCO_3$, mas a qualidade dos componentes pode variar bastante em termos de pH, mesmo quando obtidos do mesmo fornecedor. Por exemplo, constatou-se que o pH do caulim de lotes e marcas diferentes pode variar de 3.7 a 6.5 e, consequentemente, refletir em valores de pH do SAT diferentes, inclusive ultrapassando a faixa recomendada. O pó da fibra da casca de coco, por ser matéria orgânica, também pode alterar seu pH ao longo do tempo. Recomenda-se, portanto, atenção redobrada com o pH para cada preparo de SAT, pois o pH dos componentes do SAT podem ser alterados por sua estocagem ou pela renovação do lote.

Com o pH adequado, o SAT está quase pronto para o uso, precisando ainda ter a umidade ajustada para 40-60% da CRA (Capacidade de Retenção de Água) (ISO 11268-3, 1998) para o início dos ensaios de ecotoxicidade. Este ajuste deve ser realizado com água deionizada e, quando a substância-teste for líquida, deve-se considerar a quantidade necessária da mesma para cada tratamento. Por exemplo, a metade da quantidade necessária de água para ajustar 40-60% da CRA pode ser utilizada para o pré-umedecimento do substrato no dia anterior ao início do ensaio e a outra metade pode ser utilizada para diluição dos contaminantes (quando solúveis em água). A determinação da CRA (ver seção 7.4) faz-se necessária para cada novo lote de SAT.

7.2 Solos de áreas contaminadas

As amostras de solos de áreas contaminadas ou de resíduos a serem testados (ex.: área industrial, agrícola, mineração, lodo industrial, lodo de esgoto, dejetos animais) devem ser secas ao ar até que seja possível peneirá-las (preferencialmente malha 2 mm). Para solos muito argilosos, provavelmente será difícil conseguir uma quantia de solo peneirada em malha $\leq$ 2 mm com um gasto aceitável de trabalho. Neste caso, pode-se peneirar o solo com malha $\leq$ 4 mm. Antes da realização dos ensaios, deve ser realizado o ajuste da umidade para 40-60% da CRA, como descrito para o SAT.

Na avaliação de solos de locais contaminados, faz-se necessário utilizar um solo de referência natural (i.e., um *background* pedogeoquímico oriundo de uma área de referência ou de uma zona vizinha não contaminada) tão similar quanto possível ao solo-teste em todas as características físicas e químicas, exceto na presença de contaminantes. Recomenda-se determinar, no mínimo, o pH, a textura, a umidade, a CRA, a capacidade de troca catiônica, conteúdo e tipologia de argilominerais, e o carbono orgânico desses solos e, preferivelmente, eles devem ser submetidos a análises físico-químicas de rotina dos solos, seguindo métodos da Embrapa (Teixeira et al., 2017), uma vez que estes dados servirão para a interpretação dos resultados. O anexo E da norma ISO 11268-2 (ISO, 1998) sobre os ensaios de reprodução de minhocas recomenda que características do solo referência como pH, capacidade de troca catiônica, distribuição do tamanho de partículas (i.e., textura), densidade aparente, conteúdo de água, capacidade de retenção de água e biomassa microbiana sejam determinadas e apresentadas.

Nos casos em que não haja o solo de referência natural semelhante em propriedades com os solos da área contaminada, recomenda-se usar:

1. Um solo com características de acordo com a ISO 11269-2 (ISO, 1998) [carbono orgânico - Corg ≤ 1,5 %; conteúdo de areia (tamanho de partículas de 0,063 mm a 2 mm) de 50% a 75%, com menos de 20% de partículas menores que 0,02 mm; pH de 5 a 7,5] (ver discussão sobre solo natural padrão na seção 7.3).
2. Um solo artificial, o SAT (seção 7.1). No caso dos ensaios de fuga, as influências potenciais desses solos são abrangidas pelos critérios de avaliação de 80% (ver capítulo 13).

7.3 Solos naturais padrão não contaminados

Assim como a Alemanha adotou o uso de solos naturais padrão, como os Lufas, que são usados rotineiramente desde a década de 80 para vários ensaios requeridos para regulamentação de princípios ativos de agrotóxicos, no Brasil, o Ibama, por meio da Portaria Normativa nº 84 de 15 de outubro de 1996, estabeleceu que os testes de comportamento de agrotóxicos no solo (de biodegradabilidade em solos, de avaliação da mobilidade e de avaliação da adsorção/dessorção) sejam realizados com solos das seguintes classes (segundo a classificação mais atual da Embrapa; Santos et al., 2018): Latossolo vermelho, distrófico ou álico, A moderado textura média; Latossolo vermelho distroférrico, A moderado, textura argilosa; ou Gleissolo melânico, Tb, A proeminente, textura média (ver Tabela 7.1 e seção 3.2). Solos brasileiros com estas características já foram utilizados em ensaios ecotoxicológicos de fuga (Stefani Junior, 2010; Sousa, 2010) e de bioacumulação em minhocas (Stefani Junior, 2010) e comprovou-se a sobrevivência e a ausência de anormalidades tanto morfológicas quanto comportamentais, assim como manutenção da capacidade de escavação das minhocas nesses solos. Um estudo realizado com minhocas *E. andrei* demonstrou que os solos recomendados pelo Ibama podem ser utilizados em ensaios de fuga e reprodução dessa espécie (Ferreira et al., 2015). Estudos sobre o possível efeito desses solos sobre outras espécies de oligoquetas ainda são necessários visto que algumas espécies, como por exemplo, a *Dichogaster annae*, podem ter sobrevivência abaixo do nível desejável em Latossolo bastante semelhante ao recomendado pelo Ibama (Cantelli, 2011).

Embora se reconheça que o uso de solos artificiais como substrato fornece informações que podem ser comparadas internacionalmente, o uso de solos

Tabela 7.1. Características físico-químicas dos solos recomendados pela Portaria Normativa nº 84 (Ibama, 1996).

Classificação do solo	pH em H_2O	pH em KCL	Corg (g kg)	Argila (g kg)	Densidade	Porosidade (%)
Latossolos	4,9 a 5,3	3,8 a 4,8	15 a 40	580 a 700	1,1 a 1,5	50 a 65
Gleissolos	3,5 a 5,1	3,0 a 4,7	50 a 100	300 a 500	0,8 a 1,0	-

naturais de regiões agrícolas podem gerar resultados mais realísticos. A diretriz da OECD (2010) cita a possibilidade do uso de solo natural ou solo artificial como substrato para ensaios de bioacumulação em minhocas e enquitreídeos, em solos contaminados com agrotóxicos, metais ou outros compostos. De acordo com a diretriz, o solo natural deve permitir a sobrevivência e a reprodução dos oligoquetas durante os períodos de aclimatação e do ensaio, sem que os organismos-teste apresentem qualquer mudança ou anormalidade na aparência e no comportamento, além de escavarem o solo normalmente.

Os solos naturais a serem usados em ensaios de ecotoxicidade devem ser tratados e analisados como descrito na seção 7.2. Antes da realização dos ensaios, deve ser realizado o ajuste da umidade dos solos para 40-60% da *CRA*, como descrito para o SAT.

7.4 Determinação da capacidade de retenção de água (CRA)

Para determinar a capacidade de retenção de água (*CRA*) do SAT ou solo natural, recomenda-se utilizar o método descrito na norma ISO 11268-2 (ISO, 1998). Recipientes específicos, que podem ser anéis largos de metal ou tubos de PVC, têm a parte inferior vedada com papel de filtro e são preenchidos com uma quantidade definida (por exemplo, 5 g) do solo-teste (natural ou artificial). Os recipientes (pelo menos três replicatas) são colocados em uma bandeja com água de modo a permitir absorção pela abertura inferior até que a água alcance a superfície do solo por capilaridade. Cuidadosamente, adiciona-se água à bandeja até que o nível da mesma esteja acima do nível do solo no interior do recipiente, e aguarda-se por três horas. Em seguida, os recipientes devem ser colocados sobre areia quartzosa fina por duas horas para a drenagem do excesso de água, uma vez que nem toda a água absorvida por capilaridade é retida nos poros do solo. Após este período, registra-se o peso do recipiente com o material úmido e posteriormente realiza-se a secagem em estufa à temperatura constante de 105 ºC por 24/48 horas. Após a secagem, registra-se o peso do recipiente com o material seco. O peso úmido (*U*) e seco (*S*) do solo é obtido após descontado o peso do recipiente e do papel filtro. A capacidade de retenção de água é calculada a partir da seguinte equação:

$$CRA = [(U - S) / S] \times 100$$

onde:

CRA = capacidade de retenção de água, em porcentagem de massa seca (%).

U = peso do SAT (ou solo) úmido.

S = peso do SAT (ou solo) seco.

É importante destacar que, devido à grande variabilidade na granulometria no teor de matéria orgânica e na quantidade e tipologias de argilominerais, cada

solo tem um valor específico de CRA. A umidade adequada para oligoquetas está entre 40% a 60% da CRA, segundo a norma ISO 11268-2 (ISO, 1998).

7.5 Determinação do pH

Para que o SAT esteja em condições ideais para a sobrevivência e a reprodução das minhocas, seu pH deve estar em 6,0±0,5. Esta aferição deve ser feita quando todo o material já estiver misturado e pronto para o uso, porém, antes da adição de água ao substrato. Para isso, retiram-se diversas alíquotas de 10 g do substrato artificial para cada amostra. Em cada uma devem ser adicionadas quantidades crescentes (ex. 0; 0,2; 0,4; até 1%) de $CaCO_3$, o que permite determinar a quantidade necessária de $CaCO_3$ para a correção do SAT. Após a mistura da amostra com o $CaCO_3$, adicionam-se 50 mL de uma solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,01M a cada amostra e os recipientes devem ser agitados por 5 minutos. Em seguida, esta mistura deve permanecer em repouso por 2 horas, antes de se realizar a leitura de pH, por meio de imersão do eletrodo do aparelho na suspensão. Com os valores de pH obtidos na análise do substrato, devido às diferentes concentrações de carbonato de cálcio (p.ex., Tabela 7.2), é possível construir uma curva de calibração (Figura 7.2) e corrigir a quantidade necessária de $CaCO_3$ para que a mistura fique na faixa de pH desejada.

Tabela 7.2. Exemplo de calibração do pH do SAT.

$CaCO_3$ (%)	$CaCO_3$ (g)	pH do substrato	Condição
0,0	0,00	4,89	Impróprio
0,2	0,02	6,04	OK
0,4	0,04	6,17	OK
0,6	0,06	6,36	OK
0,8	0,08	6,50	OK
1,0	0,10	6,68	Impróprio

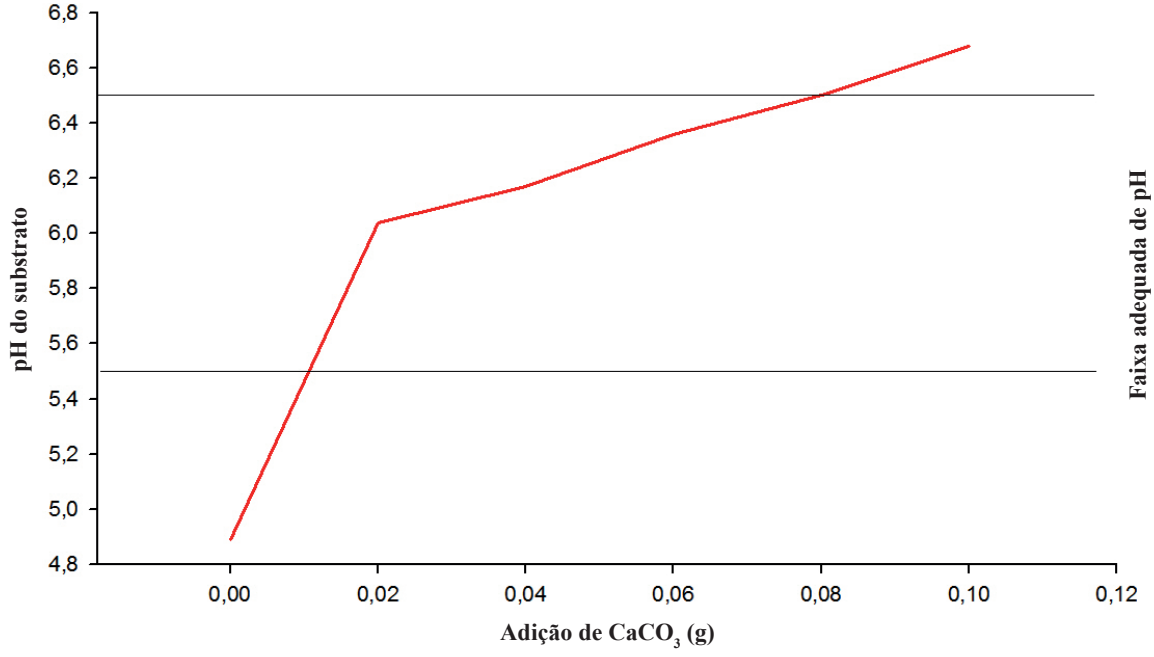


Figura 7.2. Curva de calibração do SAT demonstrando a faixa ideal do pH para a utilização em ensaios de ecotoxicidade.

A norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda a utilização de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,01M ou cloreto de potássio (KCl) 1M como veículo para medida do pH. Alguns autores também utilizam água destilada. Neste manual, indicamos a utilização de $CaCl_2$ por ser o método mais comum em laboratórios de solo no Brasil.

7.6 Defaunação do solo

Quando se trabalha com solos naturais como substrato para os ensaios de ecotoxicidade, a retirada da fauna original é importante para evitar interferência de fatores não inerentes à substância-teste nos resultados, principalmente quando se trata de ensaios de reprodução que têm duração mais longa. A presença de casulos de minhocas nesses solos pode levar a resultados errôneos na contagem dos juvenis. Da mesma forma, a presença de outros organismos que possam competir com as minhocas por alimento, espaço, ou a presença de predadores e parasitas durante a execução dos ensaios podem interferir nos resultados. A mesma precaução deve ser adotada com relação aos substratos de cultivo das minhocas, bem como ao alimento a ser utilizado nos ensaios de reprodução.

Alguns processos de defaunação do solo podem interferir na biodisponibilidade dos contaminantes e, por isso, tal procedimento é motivo de controvérsia. Porém, o método que vem sendo bastante utilizado é o recomendado por Pesaro et al. (2003), com ao menos dois ciclos de congelamento de 48 horas, seguidos de descongelamento do substrato. Normalmente, o solo é congelado por este período e em seguida, mantido em temperatura ambiente por igual período de tempo, sendo este procedimento repetido por três vezes, totalizando 12 dias de defaunação. Esse procedimento também pode ser aplicado para defaunação do alimento das minhocas.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: eco toxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2007. 11 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **Qualité des soils**: determination de la toxicité d'une substance vis-à-vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*). Method "artisol". Paris, 1984. Norme NFX 31-250.

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.

CESAR, R. G.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E. D.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. **(Eco)toxicologia de metais em solos**: conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental. Rio de Janeiro: CETEM, 2014. 100 p. (Série tecnologia ambiental, 1).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Solo**: teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca): método de ensaio: norma técnica L6.401. São Paulo, 1990. 13 p.

DE SILVA, P. M. C. S.; VAN GESTEL, C. A. M. Development of an alternative artificial soil for earthworm toxicity testing in tropical countries. **Applied Soil Ecology**, v. 43, p. 170-174, 2009. DOI: 10.1016/j.apsoil.2009.07.002.

DIAS, T. J.; PEREIRA, W. E.; CAVALCANTE, L. F.; RAPOSO, R. W. C.; FREIRE, J. L. O. Development and nutritional quality of *Hancornia speciosa* seedlings cultivated in mixture containing coconut fiber and fertilized with phosphorus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 512-523, 2009. DOI: 10.1590/S0100-29452009000200028.

FERREIRA, R. C.; PAPINI, S.; DE ANDRÉA, M. M. Bioavailability and influence of 14C-carbofuran on *Eisenia andrei* avoidance, growth and reproduction in treated natural tropical soils. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 50, p. 266-274, 2015. DOI: 10.1080/03601234.2015.999599.

GARCIA, M.; SCHEFFCZYK, A.; GARCIA, T.; RÖMBKE, J. **The effects of the insecticide lambda-Cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* under experimental conditions of tropical and temperate regions**. Environmental Pollution, v. 159, p. 398-400, 2011. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.10.038.

GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283 f. Thesis (Ph.D.) - University of Bonn, Bonn.

GOMES, M. A. F.; ESPADOTTO, C. A. **Subsídio à avaliação de risco ambiental de agrotóxicos em solos agrícolas brasileiros**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 5 p. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado técnico, 11).

Ibama. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Parte D.5.1: avaliação de toxicidade para organismos do solo: minhocas. Brasília, DF, 1990.

Ibama. Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 out. 1996.

Ibama. **Portaria Normativa nº 139 de 21-12-1994**. Disponível em: <https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro12764/documento%201.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2019.

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

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, Switzerland, 2014.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes**. Paris, 2010. (OECD. Guideline for testing chemicals, 317).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

PESARO, M.; WIDMER, F., NICOLLIER, G.; ZEYER, J. Effects of freeze–thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1049-10618, 2003. DOI: 10.1016/S0038-0717(03)00147-0.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNAß, H. -J. The effect of tributyltin-oxide on earthworms, springtails and plants in artificial and natural soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 525-534, 2007. DOI: 10.1007/s00244-006-0099-y.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

STEFANI JUNIOR, A. **Avaliação comparativa do efeito de compostos fungicidas sintético e natural por parâmetros biológicos do solo**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo.

SOUSA, A. P. A. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo.

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.

TOMCZAK, F.; DEMETRIO, S. T. H.; SATYANARAYANA, K. G. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part II: Morphology and properties of Brazilian coconut fibers. **Composites Part A-Applied Science and Manufacturing**, v. 38, n. 7, p. 1710-1721, 2007. DOI: 10.1016/j.compositesa.2007.02.004.

Aplicação da substância teste

8

Paulo Roger Lopes Alves
Maria Edna Tenório Nunes
José Paulo Sousa
Amarildo Pasini
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Alexandre Martin Martines
Ricardo Gonçalves César
Juan Pereira Colonese

Para avaliar o potencial de toxicidade de determinados compostos químicos a organismos bioindicadores são utilizados diferentes métodos, destacando-se: aplicação localizada, alimentação forçada e testes de imersão, entre outros (Kula; Larink, 1997). Entretanto, para organismos edáficos, recomenda-se que as substâncias-teste sejam previamente aplicadas ao solo, antes de expor os mesmos. No caso de agrotóxicos, dependendo do objetivo do ensaio, a substância-teste pode ser avaliada tanto com a formulação comercial, quanto pelo uso do ingrediente ativo (i.a.) puro. A concentração que se deseja testar (ver seções 8.1, 11.2.4 e 11.2.5) deve ser baseada na quantidade de i.a. da substância de interesse, normalmente expressa em miligramas de i.a. por quilo de substrato seco (mg kg^{-1}). A norma NBR 15537 (ABNT, 2007) preconiza fórmulas e exemplos de como preparar as soluções da substância-teste nas concentrações desejadas. De maneira geral, são recomendados três métodos para incorporação da substância-teste ao solo (ISO, 1998; ABNT, 2007), os quais serão descritos a seguir:

8.1 Substâncias solúveis em água

Imediatamente antes de iniciar o ensaio, deve-se dissolver a quantidade necessária da substância-teste em cerca de metade do volume de água necessário para corrigir a umidade do solo para 40-60% da capacidade de retenção de água (CRA). A outra metade da água já deverá ter sido utilizada no pré-umedecimento do solo no dia anterior (ver seção 4.4). A solução/suspensão da substância-teste deve ser aplicada sobre o substrato, e ambos misturados intensamente, até completa homogeneização. A homogeneização pode ser obtida com: misturador elétrico (tipo Mixer), betoneira pequena (para grandes quantidades). Dependendo da quantidade, o processo de mistura do solo com a solução da substância pode ser feita dentro de recipientes grandes (baldes) revolvendo-se o solo com colheres grandes, ou em sacos plásticos grandes (resistentes) que são agitados manualmente até completa homogeneização. Para se testar a eficiência do método, pode-se utilizar uma quantidade de areia

colorida, misturada ao solo. Se a mistura resultar em porções mais coloridas que outras, então o método não foi eficiente. No caso do Solo Artificial Tropical (SAT), o próprio pó da casca de coco, em contraste com a cor clara da areia, serve como indicador da homogeneização.

8.2 Substâncias insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos

Nestes casos, a substância-teste deve ser diluída em pequenas quantidades de algum solvente orgânico volátil (por exemplo, acetona ou hexano) e misturada à porção de areia correspondente (no caso de solo artificial). O solvente é evaporado deixando-se os recipientes-teste abertos, por no mínimo 1 hora, de preferência em uma capela de laboratório para proteger os organismos de gases tóxicos em certos casos resultantes das reações químicas entre o solvente e o soluto, no ato da mistura. Após estes procedimentos, os demais ingredientes constituintes do solo artificial são adicionados e misturados e a umidade é ajustada para 40% - 60% da CRA do substrato. Em solo natural, a substância-teste pode ser adicionada a uma porção de solo seco, como descrito acima para o solo artificial, ou adicionada no solo úmido, com subsequente período de evaporação, se um agente solubilizante for utilizado. Em geral, o contato do solo úmido com os solventes deve ser evitado tanto quanto possível (OECD, 2010).

8.3 Substâncias insolúveis em água ou solventes orgânicos

Misturar 10 g de areia industrial de granulometria fina (mais de 50% de partículas de tamanho entre 0,05 mm e 0,2 mm) à quantidade da substância-teste requerida, de acordo com a concentração desejada, e em seguida adicionar o restante dos ingredientes do solo-teste, a quantidade necessária de água, e homogeneizar. Em solo natural esta mistura é adicionada no solo pre-umedecido e, após homogeneização, adiciona-se o restante de água para o requerido conteúdo de umidade (OECD, 2010).

Em qualquer uma das alternativas anteriores, é desejável que se saiba a persistência da substância-teste no tipo de solo testado. O equilíbrio entre o solo e a água intersticial deve ser estabelecido antes da exposição dos organismos e, dependendo da substância-teste utilizada, este período de tempo pode ser de dias ou de meses (OECD, 2010).

Métodos analíticos adequados com acuracidade, precisão, sensibilidade e limites de detecção conhecidos devem ser utilizados para a quantificação da substância nas soluções-teste, no solo e no material biológico, bem como os detalhes da preparação das amostras e armazenamento (OECD, 2010).

8.4 Considerações relativas a ensaios com agrotóxicos que simulem situações reais das práticas agrícolas

Os ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas também podem ser utilizados para avaliar o efeito de agrotóxicos sobre organismos não alvos, por meio de ensaios que simulam a utilização desses produtos em áreas agrícolas.

No Anexo D da norma ISO 11268-2 (ISO, 1998), que apresenta recomendações semelhantes às da norma OECD 222 (OECD, 2004), um ensaio desenvolvido com este objetivo é descrito. Nesse anexo, recomenda-se que a aplicação do agrotóxico para o ensaio em laboratório seja realizada da forma mais similar possível às rotinas agrícolas. Como exemplo, recomenda-se que, no caso de agrotóxicos aplicados nas lavouras sob a forma de pulverizações, seja utilizado também em laboratório um pequeno pulverizador (comumente utilizado em jardinagem), para aplicação dos produtos na superfície do substrato, nos respectivos recipientes em que os organismos serão expostos.

Da mesma forma, salienta-se que as quantidades de produto utilizadas devam ser correspondentes àquelas recomendadas para aplicações em campo. Para tanto, a taxa de aplicação deve ser ajustada levando-se em consideração a quantidade de produto, a profundidade atingida, bem como a densidade dos solos utilizados nos ensaios. Recomenda-se ainda que se utilize uma técnica de calibração (por exemplo, pesagem), para conferir a quantidade de produto depositada sobre o solo. Assim, pode-se calcular a quantidade do produto a ser incorporada por kg do solo-teste, com base na dose recomendada por área, e a conversão para a quantidade de solo seco utilizado no ensaio.

Para o cálculo das quantidades de agrotóxico aplicadas por kg de solo, considera-se a densidade e a profundidade do solo em questão. Usualmente, para facilitar os cálculos, muitos autores tem fixado a densidade do solo em 1 g por cm^3. Contudo, a profundidade do solo deve ser determinada em cada situação, dependendo do objetivo do ensaio e das propriedades da substância-teste. Normalmente, nos casos onde não se tem conhecimento sobre a profundidade do solo, recomenda-se considerar 5 cm.

Em relação ao volume de calda (agrotóxico + água) a ser aplicado, o método descrito no norma da ISO 11268-2 (ISO, 1998) recomenda que o mesmo deva ser baseado em uma taxa de aplicação em campo de 600 a 800 L ha^{-1}. No entanto, estas quantidades podem ser modificadas, sempre levando em consideração as culturas nas quais o agrotóxico é aplicado, de modo a utilizar volumes mais relevantes e mais similares às situações reais.

A norma nº 222, da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2004), recomenda que, no caso de agrotóxicos aplicados por pulverização, os mesmos sejam aplicados na superfície dos substratos, nos ensaios em laboratório, quando as minhocas já tenham se deslocado para o interior do solo, esperando-se por um período de 30-60 minutos após a introdução das minhocas, para evitar qualquer exposição direta por contato à substância-teste

na pele dos organismos. Ambas as normas citadas salientam que agrotóxicos com formulações especiais, como granulados e aqueles para tratamento de sementes, devem ser aplicados da maneira mais similar possível ao seu uso agrícola.

A seguir são apresentados dois exemplos dos cálculos para determinação das quantidades de agrotóxicos a serem incorporadas ao solo-teste em ensaios laboratoriais, visando verificar os efeitos negativos sobre oligoquetas: o primeiro, considerando uma formulação líquida, utilizada em pulverização; e o segundo, formulações utilizadas no tratamento químico de sementes.

No primeiro caso, tomou-se como exemplo a utilização de Vertimec18 EC em cultivos de morango. A dosagem máxima recomendada no Brasil é de 75 mL 100 L^{-1} do produto em água, com volume de aplicação de 1250 L de calda por ha (Nunes; Espíndola, 2012). Essa dosagem corresponde a 16,88 g ha^{-1} do i.a (abamectina). Considerando um solo com densidade 1,0 e os primeiros 5 cm de profundidade, tem-se uma massa de 500.000 kg ha^{-1} de solo. Deste modo, a quantidade de i.a. a ser incorporada no solo-teste em ensaios laboratoriais deverá ser de 0,03376 mg de abamectina em cada kg de solo, para se ter uma dosagem correspondente à recomendada para a cultura do morango.

No segundo exemplo, considerou-se o caso de agrotóxicos aplicados por tratamento de sementes. Alves et al. (2013) estimaram, de acordo com as doses comercialmente utilizadas, o volume dos ingredientes ativos (i.a.) que possivelmente são disponibilizados no solo quando se utilizam sementes tratadas. Deste modo, o cálculo da quantidade de produto por hectare foi feito a partir do número de sementes recomendado para um hectare, e do volume de cada produto recomendado por quilograma de semente.

Assim, da mesma forma que no exemplo anterior, considerando um solo de densidade igual a 1.0, onde as sementes permaneçam nas camadas de 0-5 cm do solo, estimou-se que uma massa de 500.000 kg de solo ha^{-1} estaria sujeita à contaminação pelo agrotóxico. Desta forma, foi feita a extrapolação do volume de cada produto/i.a. kg^{-1} solo (Tabela 8.1).

Tabela 8.1. Cálculo estimado do volume de agrotóxicos (ingredientes ativos), sob recomendação comercial, expostos por kg de solo, considerando a camada dos 5 primeiros cm do solo e as exigências para a cultura da soja (Alves et al., 2013).

Nome comercial	Ingrediente ativo (i.a.)	i.a. (%)	mg de i.a.kg^{-1} solo
CAPTAN 480 SC	captan	48	0,229
VITAVAX 200 SC	carboxin + thiram	20	0,115
CRUISER 350 FS	thiamtoxam	35	0,201
STANDAK 250 SC	fipronil	25	0,096
GAUCHO 600 FS	imidacloprid	60	0,229

A fórmula utilizada para o cálculo do número de sementes por hectare (Embrapa Rondônia, 1999) foi:

$$Q = \frac{1000 \cdot P \cdot D}{G \cdot E}$$

Onde:

Q = Quantidade de semente necessária por hectare (kg/ha).

P = Peso de 100 sementes (g).

D = N° de plantas que se deseja por metro linear (nº/m).

E = Espaçamento utilizado (cm).

G = Porcentagem de emergência em campo (%).

Merece destaque que, embora tenham sido descritas várias formas de se expor as substâncias-testes ao substrato, em todas as situações em que se utilizam solventes voláteis, após a aplicação do agrotóxico, os recipientes-testes devem permanecer abertos por no mínimo uma hora, permitindo a volatilização dos solventes.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2007. 11 p.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p. 2674-2682, 2013. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.

EMBRAPA RONDÔNIA. **Cuidados básicos para o plantio mecanizado de soja em Rondônia**. Porto Velho, 1999. Disponível em: <http://www.cpafro.embrapa.br/embrapa/infotec/soja.PDF>. Acesso em: 20 dez. 2011.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO-11268-2**: Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): Part 2: method for the determination of effects on reproduction. Geneve, 1998. 36 p.

KULA, H.; LARINK, O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 3/4, p. 635-639, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00030-2.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes**. Paris, 2010. 30 p. (OECD. Guideline for testing chemicals, 317).

Ambiente do ensaio

9

Maria Edna Tenório Nunes
Julia Carina Niemeyer
Paulo Roger Lopes Alves
Cintia Carla Niva
Jörg Römbke

Os ensaios devem ser realizados, preferencialmente, em salas ou câmaras incubadoras em que temperatura e luminosidade possam ser controladas.

9.1 Temperatura

A temperatura recomendada nas normas NBR 15537, NBR ISO 17512-1, NBR ISO 16387 (ABNT, 2011, 2012, 2014), ISO 11268-1, ISO 11268-2 e ISO 16387 (ISO, 1993, 2004, 2012), 207 e 222 (OECD, 1984, 2004) e E1676-04 (ASTM, 2004) para o desenvolvimento dos ensaios com *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* e com *Enchytraeus albidus* é de 20 ± 2 °C, com limites de 15 °C e 20 °C, mas, para *E. crypticus*, temperaturas até 30 °C podem ser usadas conforme o objetivo do ensaio.

Para regiões tropicais recomenda-se a utilização de 28 ± 2 °C (Garcia, 2004; Garcia et al., 2007; Jänsch et al., 2005), inclusive na norma ISO 11268-2 (ISO, 2012). Para regiões subtropicais e intermediárias entre os trópicos e subtrópicos, temperaturas médias de 20 °C a 25 °C tem sido utilizadas conforme a realidade de cada local (Buch, 2010; Niva et al., 2010a, 2010b; Nunes, 2010; Niemeyer et al., 2011; Chelinho et al., 2012; Nunes; Espíndola, 2012). A norma NBR 15537 recomendava o uso de 20 °C para os ensaios, mas a versão atualizada em 2014 (ABNT, 2014) recomenda o uso de 25 °C numa tentativa de "tropicalizar" um método originalmente desenhado para as condições de clima temperado e também porque essa é uma temperatura que muitos laboratórios usam como rotina.

9.2 Iluminação

O ensaio deve ser realizado sob fotoperíodo controlado. Para minhocas, as normas ISO 11268-1 (ISO, 1993) e 11268-2 (ISO, 2012) recomendam ciclos entre 12 horas de luz para 12 horas de escuro e 16 horas de luz para 8 horas de escuro; as normas 207 (OECD, 1984), E1676-04 (ASTM, 2004) e NBR 15537 (ABNT, 2014) recomendam luz contínua; e a norma 222 (OECD, 2004) recomenda preferivelmente 16 horas de luz para 8 horas de escuro. Para enqui-

treídeos, o regime de 16 horas de luz para 8 horas de escuro (fotoperíodo de verão de clima temperado) com intensidade luminosa de 400 lux a 800 lux é recomendado pela norma 16387 (ISO, 2004) na área dos recipientes-teste, para prevenir que os organismos escapem do solo.

Para região tropical, regime de luz de 12 horas tem sido utilizado (Garcia et al., 2007; Nunes, 2010, Nunes & Espíndola, 2012).

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro, 2014. 13 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 17512-1**: 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. 26 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência Rio de Janeiro, 2012. 29p.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1676-04**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken, 2004. 26 p.

BUCH, A. C. ***Pontoscolex corethrurus* (Müler, 1857) e *Eisenia andrei*, Bouché, 1972, como bioindicadoras de solos contaminados por agrotóxicos**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CHELINHO, S.; LOPES, I.; NATAL-DA-LUZ, N.; DOMENE, X.; NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n 2, p. 437-445, 2012. DOI: 10.1002/etc.738.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283 f. Theis (Ph.D.) - University of Bonn, Bonn.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditons. **Environmental Pollution**, v. 153, n. 2, p. 450-456, 2007. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.08.007.

ISO. International Organization 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 Organization for Standardization. **ISO 11268-2**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: determination of effects on reproduction. Geneve, 2012.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2004.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requeriments of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**, v. 13, p. 51-83, 2005. DOI: 10.1139/a05-007.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA SANTO, M.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; RIBEIRO, R.; 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 n. 8, p. 1557-1571, 2010. DOI: 10.1007/s11368-010-0255-x.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; BROWN, G. G. Adaptação do ensaio ecotoxicológico com enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11., 2010, Bombinhas. **Anais**... Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010a.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; BROWN, G. G. Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11., 2010, Bombinhas. **Anais**... Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010b.

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos sobre a fauna edáfica da utilização de agrotóxicos em Bom Repouso, MG, Brasil, por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* e com uma comunidade natural do solo**. 2010. 175 f. Tese (Doutorado em Ciencias da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)**. Paris, 2004. (OECD. Guideline for the testing of chemicals, 222).

Dados de ecotoxicidade e desenho experimental

10

José Paulo Sousa
Cintia Carla Niva

A ecotoxicidade de uma substância baseia-se na relação dose-resposta gerada a partir de dados de um ensaio ecotoxicológico, ou seja, dos diferentes níveis de efeito obtidos em função das diferentes concentrações (ou doses) da substância a que os organismos-teste foram expostos durante o ensaio. O mesmo conceito pode ser aplicado no caso de uma matriz contaminada (e.g., lodo) ou de um solo contaminado. A relação entre a concentração (ou dose) e a resposta mensurável (proporção da população afetada no caso de ensaios de letalidade ou fuga ou a inibição da germinação, ou o decréscimo do número de juvenis produzidos ou da biomassa no caso de ensaios de reprodução ou crescimento) pode ser representada por uma curva dose-resposta (Figura 10.1). Nessa curva, geralmente sigmóide, não se observa efeito tóxico na porção inicial (concentrações menores), mas em seguida, observa-se um rápido aumento do efeito à medida que a concentração aumenta, ou seja, quanto mais alta a concentração, maior será o número de indivíduos respondendo à ação da mesma (seja por aumento da mortalidade ou por diminuição da reprodução ou crescimento). Não raramente, algumas substâncias apresentam configurações diferentes da curva dose- resposta (ver capítulo 14).

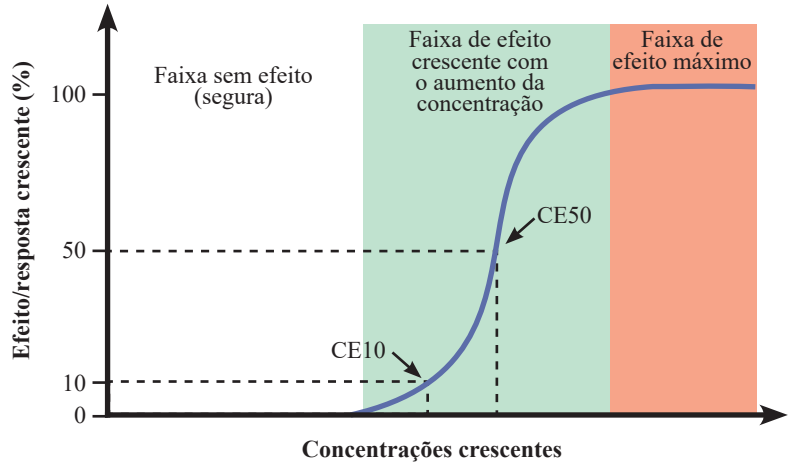


Figura 10.1. Curva dose resposta sigmoide hipotética indicando faixas de concentração de acordo com a intensidade de um efeito/resposta (ex. diminuição do número de juvenis, perda de biomassa, aumento da letalidade). A posição da concentração efeitiva para 50% (CE50) e para 10% da população (CE10) estão indicadas na curva.

Através de análises estatísticas desses dados (ver capítulo 14) pode determinar-se um valor representativo da concentração da substância testada que causa um determinado efeito (letalidade, redução na reprodução, redução da biomassa, rejeição ao solo contaminado) sobre um determinado estágio de vida específico de uma população de organismos durante um determinado período

de tempo. Os valores mais comumente utilizados e considerados em avaliações de risco são:

1. CENO (concentração de efeito não observado) - a maior concentração da substância testada que não causa efeito (por exemplo, letalidade, reprodução) estatisticamente significativo sobre os organismos-teste em comparação ao controle (probabilidade $p > 0,05$).
2. CEO (concentração de efeito observado) - a menor concentração da substância testada que causa efeito (por exemplo, letalidade, reprodução) estatisticamente significativo sobre os organismos-teste em comparação ao controle (probabilidade $p \leq 0,05$).
3. CLx (concentração letal para x% da população) - a concentração que causa letalidade em x% da população em relação ao controle. Por exemplo, CL50 é a concentração que causa letalidade em 50% dos organismos testados.
4. CEx (concentração efetiva para x% da população) - a concentração que causa efeito específico (por exemplo, inibição da reprodução) em x% da população em relação ao controle. Por exemplo, CE50 é a concentração que causa 50% de redução na reprodução (número de juvenis produzidos ao final do ensaio) em relação ao controle.

Apesar da CENO e CEO ainda serem utilizadas em avaliações de risco e para fins regulatórios, a sua relevância tem sido bastante criticada, principalmente por se restringirem às concentrações testadas nos ensaios e pela análise estatística utilizada (Van Der Hoeven, 1997; Isnard et al., 2001; Magalhães; Ferrão Filho, 2008; Delignette-Muller et al., 2011). Neste momento, no caso do registro de agrotóxicos na Europa, os valores do CENO estão sendo substituídos pelo cálculo do CE10.

10.1 Ensaios de letalidade e reprodução

A norma ISO 16387 (ISO, 2014) recomenda três desenhos amostrais para o ensaio definitivo de mortalidade e de reprodução, onde o fator de espaçamento das concentrações do contaminante a serem testadas não deve ser maior que 2 para garantir maior robustez dos resultados. Esses desenhos se aplicam a ensaios com enquitreídeos. O mesmo princípio, com ligeiras adaptações, pode ser aplicado com minhocas (normas ISO 11268-1 e ISO 11268-2) e colêmbolos (norma ISO 11267) (ISO, 1993, 1998, 1999).

Estratégia CENO - Se o objetivo é a determinação do CENO e do CEO, o ensaio de letalidade e/ou reprodução deve ser conduzido com pelo menos cinco concentrações em uma série geométrica, em que cada concentração deve ser testada com quatro replicatas (cinco, no caso dos colêmbolos), e o controle, com oito.

Estratégia CEx - Se o objetivo é a determinação de CEx, o ensaio de letalidade e/ou reprodução deve ser conduzido com 12 concentrações com pelo menos duas replicatas cada, mais seis replicatas no controle. O fator de espaçamento pode variar, sendo menor na faixa de concentrações mais baixas, e maior nas concentrações mais altas. No entanto a situação ideal será testar mais concentrações próximas ao valor da concentração de efeito que se queira determinar (por exemplo, o CE50), pois nesse caso o intervalo de confiança associado ao valor determinado será menor e mais confiável. Para isso é necessário ter informação com base em ensaios preliminares para uma melhor definição da gama de concentrações a serem testadas.

Estratégia mista para determinação de CENO e CEx simultaneamente - recomenda-se conduzir o experimento com seis a oito concentrações, em uma série geométrica, com quatro replicatas cada uma e mais oito replicatas no controle. Este desenho amostral foi proposto originalmente pela força-tarefa do ensaio interlaboratorial com enquitreídeos (Römbke; Moser, 2002), mas também se aplica aos ensaios com minhocas e colêmbolos.

10.2 Ensaio de fuga

Para o ensaio de fuga recomenda-se conduzir o experimento com cinco replicatas para quando se deseja testar apenas uma concentração (um uma dose e.g., lodo ou de solo contaminado). No caso de se testar várias concentrações/doses, recomenda-se testar pelo menos quatro concentrações diferentes mais o controle, também com cinco replicatas para cada combinação.

O capítulo 14 discute as implicações estatísticas para a determinação de CLx, CENO, CEO e CEx.

Referências

DELIGNETTE-MULLER, M. L; FORFAIT, C.; BILLOIR, E.; CHARLES, S. A new perspective on the Dunnett procedure: filling the gap between NOEC/LOEC and ECx concepts. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2888-91, 2011. DOI: 10.1002/etc.686.

ISNARD, P.; FLAMMARION, P.; ROMAN, G.; BABUT, M.; BASTIEN, P.; BINTEIN, S.; ESSERMÉANT, L.; FÉRARD J.F.; GALLOTTI-SCHMITT, S.; SAOUTER, E.; SAROLI, M.; THIÉBAUD, H.; TOMASSONE, R.; VINDIMIAN, E. Statisical analysis of regulatory ecotoxicity tests. **Chemosphere**, v. 45, p. 659-669, 2001.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11267**: soil quality: inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneva, 1999.

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

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

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organization and results of an international ring-test. **Chemosphere**, 46, p. 1117-1140, 2002.

VAN DER HOEVEN, N. How to measure no effect. Part 1: towards a new measure of chronic toxicity? **Environmetrics**, v. 8, p. 241-248, 1997.

Ensaios de letalidade

11

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

Para avaliar a ecotoxicidade aguda de substâncias isoladas ou solos de áreas contaminadas a oligoquetas existem ensaios padronizados em normas, como a 207 da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1984), a 11268-1 da International Organization for Standardization (ISO) (1993), a E1676-04 da American Society for Testing and Materials (ASTM) (2004), a NBR 15537 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para minhocas (ABNT, 2014), e a NBR/ISO 16387 para enquitreídeos (ABNT, 2012). Além disso a Environment Canada também publica metodologias para ensaios para avaliação de toxicidade com minhocas (Canada, 2004). Estas normas descrevem a metodologia para se determinar o efeito letal de contaminantes a oligoquetas, por meio da exposição de espécimes adultos a solos tratados com várias concentrações de substâncias químicas, ou solos contaminados com poluentes. Dentre outros métodos utilizados para se realizar ensaios de toxicidade de substâncias químicas destacam-se a aplicação localizada, alimentação forçada e testes de imersão (Kula; Larink, 1997), mas estes têm sido pouco utilizados e são considerados menos realísticos.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda com oligoquetas podem ser conduzidos com diferentes substâncias químicas potencialmente poluentes ou com solos de áreas contaminadas, ou com resíduos sólidos e líquidos, tanto em estudos de caráter prospectivo como retrospectivo (ver seção 1.1 e capítulo 2 para definições e exemplos).

Descreve-se neste capítulo o procedimento para condução do ensaio de ecotoxicidade aguda (letalidade) tendo por base as normas NBR 15537 (ABNT, 2014), ISO 11268-1 (ISO, 2012) e E1676-04 (ASTM, 2004), para minhocas, e as normas NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004a) para enquitreídeos. Ao longo do texto, foram incluídas observações sobre adapta-

ções já testadas e recomendadas para as condições brasileiras. A importância do uso de espécies de origem e ocorrência local, bem como das demais adaptações ao ensaio, é discutida no capítulo 2.

11.1 Princípio do ensaio de letalidade

O ensaio de ecotoxicidade aguda (letalidade) preconiza manter indivíduos adultos (com clitelo e peso característico da espécie adulta) confinados em amostras de solo natural contaminado ou em material de solo ou substrato tratados com concentrações conhecidas da substância-teste (denominados solos--teste), por um período de 14 dias, após o qual a mortalidade dos organismos expostos é determinada. Além disso, podem ser avaliadas alterações no peso corporal, morfológicas e comportamentais nos organismos expostos.

Os resultados obtidos com a exposição aos solos-teste são comparados com os obtidos em solo-controle (não contaminado) e utilizados para estimar a concentração que causa entre 10% e 90% (CLx, 14 dias) de mortalidade dos organismos expostos, bem como a maior concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO).

O ensaio é conduzido em duas etapas: uma preliminar, na qual a exposição e a avaliação da mortalidade podem ser feitas aos sete dias de contato dos organismos com o solo-teste, e que fornece uma indicação aproximada das concentrações responsáveis pela mortalidade total e pela ausência de mortalidade. Esta etapa serve para determinar o intervalo de concentrações a serem utilizadas no ensaio definitivo. A segunda etapa determina as concentrações que causam entre 10% e 90% de mortalidade, e produz o resultado definitivo.

11.2 Ensaio de letalidade com minhocas

11.2.1 *Eisenia andrei* e *E. fetida*

O material biológico deste ensaio consiste em minhocas adultas das espécies *E. andrei* ou *E. fetida*, com pelo menos 2 meses de idade, apresentando clitelo e pesando de 300 mg a 600 mg.

A norma ISO 11268-1 (ISO, 1993) recomenda que as minhocas sejam retiradas do substrato de cultivo e aclimatadas aos solos a serem usados nos ensaios, sem contaminação (solos-controle), no mínimo 24 horas antes do início do ensaio. A norma E1676-04 (ASTM, 2004) ainda recomenda que os organismos sejam lavados em água deionizada, colocados para secar em papel de filtro (ou outro papel absorvente) e pesados antes da aclimatação, ou que sejam deixadas por 24 horas em papel de filtro umedecido, para purgar o conteúdo intestinal. É importante que um número muito maior de organismos necessários para a

realização do ensaio seja separado e aclimatado para garantir número suficiente de indivíduos adultos saudáveis (sem apresentar quaisquer sintomas, como letargia, ou injúrias em seus corpos). Após este período de aclimatação e/ou de esvaziamento do conteúdo intestinal, no momento da montagem dos ensaios, as minhocas devem ser retiradas dos solos-controle ou do papel de filtro, lavadas em água destilada, colocadas para secar em papel absorvente e, pesadas individualmente em balança analítica. Este procedimento é importante não apenas para selecionar organismos que estejam dentro da faixa de peso recomendada, mas para a avaliação do efeito da exposição ao(s) contaminante(s) sobre a biomassa dos organismos, por comparação com as mesmas medidas, ao final do ensaio. Durante a pesagem, recomenda-se que os organismos sejam mantidos em condições favoráveis de umidade, sobre papel de filtro umedecido. Também recomenda-se que os organismos pesados sejam separados em grupos, de acordo com as quantidades a serem colocadas em cada recipiente-teste, colocados em um recipiente e recobertos com uma pequena camada do solo-controle, até o momento de serem colocadas nos recipientes de ensaio.

11.2.2 Outras espécies de minhocas

O ensaio de letalidade também pode ser conduzido com minhocas adultas de espécies geófagas (por ex.: *Amynthas gracilis* ou *Pontoscolex corethrurus*) coletadas no campo ou espécies epigêicas (por ex.: *P. excavatus*, *Eudrilus eugeniae*), criadas em laboratório ou compradas comercialmente (sobre a importância do uso de outras espécies, ver capítulo 2). Caso sejam coletadas no campo, devem ser seguidas as instruções detalhadas no capítulo 5.

O peso dos indivíduos adultos de espécies maiores como *A. gracilis*, *P. corethrurus* e *E. eugeniae* pode variar significativamente, dependendo de sua procedência. Contudo, os indivíduos de cada espécie a serem usados nos testes devem ter tamanhos e peso similares e não devem ser usados indivíduos provenientes de diferentes locais ou lotes, ou comprados de diferentes fornecedores. Os adultos de *A. gracilis* e *E. eugeniae* devem pesar no mínimo 1 g e de *P. corethrurus*, no mínimo 700 mg. O peso de *P. excavatus* deve estar entre 200 e 400 mg. Se os indivíduos forem provenientes de culturas realizadas no laboratório, indivíduos de idade, tamanho e peso similares devem ser selecionados para uso.

11.2.3 Recipientes-teste e equipamentos

Para *E. andrei* e *E. fetida*, os recipientes-teste podem ser de plástico ou de vidro, com capacidade de 1 L a 2 L e área transversal de cerca de 200 cm^2, de modo a permitir uma profundidade mínima de solo-teste de 5-6 cm, com cada réplica contendo 500 g de solo-teste (matéria seca). A tampa ou cobertura do recipiente deve permitir trocas gasosas entre o solo-teste e a atmosfera, devendo ser perfurada, e permitir acesso de luz (material transparente). A Figura 11.1 apresenta exemplo de recipiente-teste.

Foto: Maria Edna Tenório Nunes

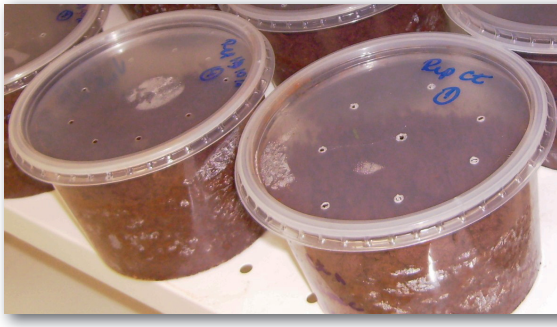


Figura 11.1. Exemplo de recipiente-teste para ensaios com *E. fetida* e *E. andrei*.

Foto: Andressa Cristhy Buch

Figura 11.2. Exemplos de recipientes-teste de vidro para outras espécies de minhocas: (A) Para espécies com peso corpóreo maior que 1 g, contendo 2.000 g de solo-teste (massa seca), e (B) para espécies com peso corporal menor que 1 g, com 500 g solo-teste (massa-seca).

Para *P. corethrurus* e *P. excavatus*, espécies com tamanho de menos de 1 g, os recipientes-teste devem comportar 500 g de solo seco, enquanto para *A. gracilis* e *E. eugeniae*, espécies de tamanho maior que 1 g, são necessários recipientes que comportem de 1.000 a 2.000 g de solo seco. Para *A. gracilis* recomenda-se o uso de 2.000 g (equivalente em peso seco) de solo-teste por réplica e para *E. eugeniae*, 1.000 g (Figura 11.2). Todos os recipientes devem ser preferivelmente de vidro para permitir iluminação do substrato ao redor do recipiente, e também devem possuir tampas ou material de cobertura transparentes e com furos para permitir trocas gasosas (Figura 4.5). Devido ao comportamento fotofóbico das minhocas, a iluminação ajuda a evitar que elas fiquem aderidas ao vidro e que se mantenham mais tempo em contato com o solo-teste.

Além do recipiente-teste, são necessários os seguintes equipamentos e materiais, especificamente: balança analítica, balança semi-analítica, balança com capacidade para quantidades superiores a 1 kg, estufa de secagem, luxímetro, medidor de pH, equipamento para determinação da CRA (ver capítulo 7), equipamento para determinação de distribuição de tamanho de partículas do solo, equipamento para determinação de densidade do solo, peneiras com abertura de malha entre 0,05 mm e 0,2 mm, pipeta volumétrica ou automática, termômetros ou equipamentos de monitoramento e registro de temperatura (tipo *Datalogger*), temporizadores (*timers*) para controle de fotoperíodo (luz:escuro) dos ambientes de cultivo e de ensaios (câmaras e/ou salas), bandejas plásticas, sacos plásticos para misturar o solo, pinças, recipientes de vidro.

11.2.4 Preparo do solo ou substrato-teste

No caso em que a substância-teste é incorporada ao solo artificial ou a um solo natural, este procedimento deverá ser realizado imediatamente antes do início do ensaio, seguindo as recomendações do capítulo 8 (Aplicação da substância-teste). Para avaliar solos naturais oriundos de áreas contaminadas ou com suspeita de contaminação, os mesmos devem passar pelos procedimentos descritos no capítulo 7 (Preparo do substrato teste).

Os substratos já preparados deverão ser acondicionados nos recipientes-teste, colocando-se quantidade equivalente a 500 g (equivalente em peso seco) do solo-teste por recipiente, ou até 2.000 g, no caso de espécies de maior peso corporal, como *A. gracilis*.

Dados de pH do solo-teste devem ser obtidos para cada concentração testada, no início e no final do ensaio, preferencialmente com uma solução de cloreto de cálcio (ver seção 7.5). Para solos naturais, recomenda-se não fazer o ajuste do pH, no entanto, caso o pH do solo natural contaminado esteja fora da faixa recomendada (6,0 ± 0,5), um ensaio paralelo com ajuste do pH da amostra pode ser realizado para auxiliar na interpretação dos resultados. Para ensaios com *E. fetida* e *E. andrei*, a NBR 15537 (ABNT, 2014) recomenda a utilização de 750 g de substrato por recipiente teste, enquanto a norma E

1676-04 (ASTM, 2004) cita 200 g e recipientes de vidro de 473 mL. É importante manter uma profundidade de substrato no recipiente suficiente para que as minhocas fiquem enterradas. Além disso, camadas muito finas de substrato podem ressecar mais rapidamente.

11.2.5 Ensaio preliminar de letalidade de minhocas

Para avaliação de substâncias químicas potencialmente tóxicas, um ensaio preliminar pode ser realizado para estabelecer um intervalo de concentrações-teste a ser utilizado no ensaio definitivo. Para tanto, os recipientes-teste devem ser preparados com o substrato em duplicatas para cada concentração-teste e para o controle (sem o contaminante avaliado, mas tratado com água deionizada ou o solvente usado como veículo), inserindo 10 organismos-teste em cada replicata. Este número de organismos refere-se aos ensaios com espécies padronizadas, como *E. andrei* ou *E. fetida*. Para ensaios com outras espécies, não há norma específica sobre o número de espécimes a ser usado, mas para *P. corethrurus*, Buch et al. (2013) usaram 6 organismos por recipiente com 500 g (peso seco) de solo-teste. Contudo, recomenda-se usar, preferivelmente, 10 indivíduos para que os ensaios sejam mais comparáveis aos das espécies padrão. Recomenda-se usar no mínimo cinco concentrações com um fator de progressão (por exemplo 0,1, 1, 10, 100 e 1.000), expressas em miligramas da substância-teste para cada quilograma do substrato (matéria seca) (mg kg^{-1}), além do solo controle. Este ensaio preliminar deve ser conduzido sob condições idênticas às descritas na seção 11.2.6. (Ensaio definitivo).

Segundo a NBR 15537 (ABNT, 2014), os ensaios preliminares, com objetivo de determinar a menor concentração que causa 100% de letalidade e a maior em que não se observa letalidade, podem ter a duração de 7 dias.

11.2.6 Ensaio definitivo de letalidade de minhocas

O ensaio definitivo deve ser realizado com base nos resultados do ensaio preliminar ou, em último caso, baseado em dados de literatura. Nesta etapa se avaliam no mínimo cinco concentrações da substância-teste, em uma progressão geométrica entre a maior concentração que não causou letalidade (CENO) e a menor concentração que causou 100% de mortalidade no ensaio preliminar, além dos controles (CEO). Devem ser preparadas no mínimo 4 repetições para cada concentração da substância-teste ou para cada diluição do solo contaminado-teste, e também para o controle (ver capítulo 10 para detalhes sobre o desenho experimental).

Em cada recipiente com solos-teste, devem ser adicionadas 10 minhocas na superfície do solo, quando utilizadas as espécies padronizadas *E. andrei* e *E. fetida*. Para as outras espécies, o não há norma específica, mas para melhorar a comparabilidade dos resultados com as espécies padrão, recomenda-se o uso de 10 indivíduos adultos. Não se costuma alimentar as minhocas quando em SAT. No caso de ensaios com solos naturais, caso os mesmos contenham < 2%

de Carbono orgânico, pode-se adicionar 5 g de alimento (5 g de esterco de cavalo misturado com 5 mL de água deionizada por recipiente) por cada 500 g de solo, no inicio do ensaio, quando espécies padronizadas, como *E. andrei* e *E. fetida* forem utilizadas. Para as demais espécies, observar hábitos alimentares das mesmas e recomendações de suplementação alimentar em literatura (ver seção 4). Caso haja consumo do alimento, ele deve ser reposto na superfície do solo aos sete dias do ensaio, mas se não houver consumo do alimento, não é necessário realimentar as minhocas. Após adicionar os organismos-teste, os recipientes-testes devem ser pesados para o monitoramento e reposição semanal da umidade como descrito no ensaio preliminar.

Segundo a NBR 15537 (ABNT, 2014), durante a condução do ensaio, a temperatura ambiente (máxima e mínima) e umidade relativa do ar deverão ser medidas diariamente, enquanto a luminosidade deve ser determinada no mínimo no início do ensaio, no 7º e no 14º dias.

Como mencionado anteriormente, o ensaio tem duração máxima de 14 dias, quando são avaliadas as características de redução da biomassa corporal, letalidade, alterações morfológicas, letargia, entre outros. O critério utilizado para identificar indivíduos mortos é a ausência de reação a um leve estímulo mecânico na parte frontal. Para avaliar a biomassa corporal, os organismos devem ser pesados no início e no fim do teste, individualmente, e a diferença de pesos calculada. Assim, após a quantificação destes parâmetros, calcula-se a percentagem da letalidade e da alteração de biomassa corporal das minhocas para cada tratamento.

Os principais parâmetros utilizados para avaliar os resultados do ensaio de letalidade são: a CL50 (concentração da substância letal para 50% das minhocas durante o período de teste), CENO (maior concentração testada, sem efeitos significativos observados) e CEO (menor concentração testada, com efeitos significativos observados). Os efeitos são considerados significativos quando há diferença estatística dos resultados obtidos em relação ao controle. Para maiores detalhes, ver capítulo 14.

11.2.7 Substância de referência

Para confirmar a sensibilidade das minhocas à exposição dos contaminantes, deve-se realizar ensaio com cloroacetamida (grau analítico) como substância de referência. Este ensaio deve ser conduzido de acordo com o procedimento descrito na seção 11.2.6 (Ensaio definitivo) e deve ser realizado, no mínimo, uma vez ao ano com as minhocas das culturas-estoques ou paralelamente a cada ensaio com a amostra.

A ABNT (2014) recomenda que os ensaios com a substância de referência sejam mais frequentes para o estabelecimento de uma carta-controle de sensibilidade. Para tanto, a sensibilidade do organismo-teste à cloroacetamida deve ser avaliada mensalmente, nas mesmas condições do ensaio definitivo. Após 5 ou 20 ensaios, podem ser calculados dois desvios-padrão (um superior e outro inferior à média obtida) e esses valores devem ser grafados na carta-

-controle, como linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade. O valor obtido nos ensaios de sensibilidade posteriores deve estar compreendido no intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para o organismo-teste, que corresponde à carta-controle. No caso de utilização de solo artificial, a CL(I)50, em 14 dias de teste, para cloroacetamida deve ser de 20 mg kg^{-1} a 80 mg kg^{-1} (ABNT, 2014). O ácido bórico também tem sido utilizado para testar a sensibilidade de organismos, porém Niemeyer et al. (2018) reportaram CL50 maior que 1.000 mg kg^{-1} de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica para *E. andrei*, em ensaio de reprodução, dado que confere com Princz et al. (2017). Portanto, o ácido bórico não é a substância referência mais adequada para ensaios de letalidade com minhocas, ao menos para as *Eisenia* spp..

11.2.8 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de letalidade de minhocas

A Tabela 11.1 apresenta um resumo das condições do ensaio de mortalidade com *E. andrei* e *E. fetida*, e o cronograma de execução do ensaio está sumarizado na Tabela 11.2.

Tabela 11.1. Resumo dos requisitos e condições do ensaio de letalidade com minhocas des espécies padronizadas (*Eisenia andrei* e *E. fetida)*.

Requisitos	Condição
Tipo de ensaio	Ecotoxicidade aguda; Letalidade.
Referências	OECD 207 (OECD, 1984); ISO 11268-1 (ISO, 2012), NBR 15537 (ABNT, 2014); ASTM E1676 (ASTM, 1995).
Duração	14 dia.
Organismo-teste	*E. fetida* ou *E. andrei* (adultos, com peso individual entre 300 mg e 600 mg). *A. gracilis* e *E. eugeniae*, adultos com peso individual >1 g. *P. corethrurus*, adultos com peso individual >700 mg. *P. excavatus*, adultos com peso individual entre 200 mg e 400 mg.
Alimentação	Nenhuma. Obs.: Se o solo natural a ser utilizado tiver <2% de carbono orgânico, adicionar 5 g de alimento (esterco) por cada 500 g de solo, no início do ensaio.
Substrato	Solo artificial/ natural ou de áreas contaminadas (ver capítulo 7 deste Manual).
Quantidade de solo por recipiente	500 g (material seco) para *E. andrei*, *E. fetida*, *P. corethrurus* e *P. excavatus.* 1.000 g (material seco) para *E. eugeniae* e 2.000 g para *A. gracilis.* Obs.: ABNT (2014) - 750g e ASTM (2004) - 200 g para recipientes 473 mL.
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, com temperatura e fotoperíodo controlados (Ver capítulo 9 Ambiente do ensaio).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle sem tratamento.
Número mínimo de repetições/tratamento	4
Número de organismos por repetição	10
Temperatura	18 °C a 22 °C Obs.: Outras temperaturas têm sido sugeridas para condições tropicais (Ver capítulo 9).
Fotoperíodo	12 horas luz: 12 horas escuro. Obs.: NBR ISO 11269-2 recomenda luz contínua.

Continua...

Tabela 11.1. Continuação...

Requisitos	Condição
Intensidade de luz	400 a 800 lux.
Efeito observado	Mortalidade.
Expressão dos resultados	CL(I)50 em 14 dias. Além de: tóxico ou não tóxico.
Critérios de validade	Tratamento controle com mortalidade < 10% e perda de biomassa corporal das minhocas < 20%.
Substância de referência	Cloroacetamida: CL50 = 20-80 mg C_2H_4ClNO/kg de SAT (massa seca).

Tabela 11.2. Resumo do cronograma de execução do ensaio de letalidade com *E. andrei* e *E. fetida*.

Etapas	Dias	Descrição do trabalho a fazer
Preparo do material e organismos	1	- Preparo do solo- ou substrato-teste (ver capítulo 7 e seção 11.2.4).
	3	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5) e ajuste, se necessário (no caso de solo artificial). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).
	5-6	- Seleção dos organismos a serem utilizados no ensaio e aclimatação em solo-controle (não contaminado), por no mínimo 24 horas. - Ajuste da temperatura e fotoperíodo da sala ou câmara de ensaio.
Montagem do ensaio	8	- Ajuste da umidade do solo-teste. - Preparo da solução estoque e aplicação no solo-teste (ver capítulo 8). - Retirada dos organismos do solo em que estavam para aclimatação, lavagem em água corrente, secagem sobre papel de filtro, separação em grupos de 10, pesagem. - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Retirada de amostras de solo-teste dev cada tratamento, para determinação de pH. - Introdução de 10 organismos por recipiente-teste.
Ensaios preliminar e definitivo - Monitoramento e avaliações	15 (7º dia após o início do ensaio)	Primeira avaliação: - Retirada das minhocas dos recipientes-teste, observação e anotação das alterações morfológicas e comportamentais e do número de sobreviventes. - Retorno dos organismos sobreviventes para os recipientes-teste. - Retirada de amostras de solo-teste de cada tratamento, para determinação de pH. - ajuste da umidade, se necessário.
	22 (14º dia após início do ensaio)	Avaliação final: - Remoção dos organismos sobreviventes. - Determinação final da mortalidade e observação do comportamento. - Determinação de variação da biomassa dos organismos: lavagem, secagem e pesagem dos organismos sobreviventes de cada recipiente-teste. - Retirada de alíquotas do solo-teste de cada tratamento para determinação do pH e umidade. - Descarte adequado de organismos e solos-teste (ver capítulo 16).

11.2.9 Validação do ensaio de letalidade de minhocas

Alguns critérios devem ser atendidos para que o ensaio seja considerado válido. Neste caso, dois principais precisam ser cumpridos:

1. No tratamento controle, a média de mortalidade de minhocas deve ser inferior a 10%.
2. No tratamento controle, a média da perda de biomassa deve ser inferior a 20%.

11.3 Ensaio de letalidade com *Enchytraeus* sp.

O ensaio de letalidade para enquitreídeos será descrito a seguir, separadamente do ensaio de reprodução, porém, na maioria dos casos, os dois ensaios são conduzidos simultaneamente e, em algumas situações, a avaliação do efeito sobre a mortalidade é suprimida para espécies de tamanho corporal menor, fazendo-se apenas a avaliação do efeito sobre a reprodução.

11.3.1 Organismo-teste

Para o ensaio de letalidade, assim como para o ensaio de reprodução, enquitreídeos adultos de tamanhos parecidos (cerca de 0,7 cm no caso de *E. crypticus* e 1,5 mm no caso de *E. albidus*) devem ser selecionados para aclimatação em solo-teste não tratado, por pelo menos 24 horas antes do início do ensaio sob as condições experimentais. Os organismos devem ser provenientes de culturas que passaram por pelo menos uma geração no laboratório sem ter apresentado qualquer problema anteriormente (NBR/ISO 16387; ABNT, 2012), como por exemplo, contaminação da cultura por outra espécie, estresse hídrico, térmico ou alimentar extremo e/ou prolongado. Um número muito maior do que o necessário de enquitreídeos deve ser selecionado, para garantir que haja indivíduos adultos saudáveis (indivíduos ágeis e sem anomalias) suficientes para o ensaio.

Em cada recipiente teste são utilizados 10 enquitreídeos adultos, ou seja, indivíduos que possuem oócitos vitelogênicos (esferas brancas na região clitelar) (Figura 2.2). Não é necessária a sincronização dos adultos como é feito para minhocas, mas o tamanho dos indivíduos deve ser distribuído o mais homogeneamente possível entre os recipientes-testes de modo que o conjunto de dez indivíduos do primeiro recipiente não seja muito diferente do segundo, e assim por diante. Esse cuidado é importante para minimizar a variabilidade dos resultados. Os enquitreídeos devem ser manipulados cuidadosamente com pinça macia, pincéis finos ou estiletes, de tal forma que não se provoquem lesões e o processo provoque o mínimo de estresse.

Uma outra opção para selecionar e contar enquitreídeos de porte pequeno (por exemplo, *E. crypticus*) é colocar os indivíduos em água mineral abundante numa placa de Petri, recolhê-los um a um com uma pipeta Pasteur e depositá-los sobre pequenos pedaços de parafilme dentro de uma pequena gota de água (Figura 11.3). Por ser um material hidrofóbico, o parafilme permite que a gota d'água se mantenha sobre sua superfície sem se espalhar. Desse modo, os 10 indivíduos aprisionados numa única gota d'água podem ser facilmente depositados sobre o substrato-teste de uma só vez. O tamanho da gota não deve ser muito grande para não alterar a umidade do substrato. Esse procedimento deve ser feito no menor espaço de tempo possível para não estressar os enquitreídeos.

Fotos: Cintia Carla Niva

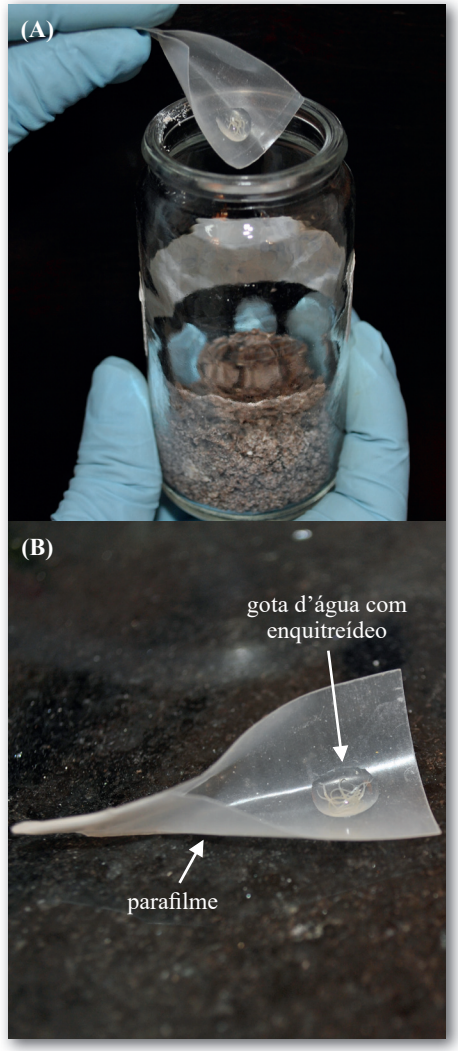


Figura 11.3. Separação de enquitreídeos em gotas d'água sobre a superfície de um pedaço de parafilme. (A) Transferência de 10 enquitreídeos a um recipiente teste com solo. (B) Detalhe de um pedaço de parafilme com enquitreídeos em uma gota d'água.

11.3.2 Recipientes-teste e equipamentos

Recipientes para o ensaio - qualquer recipiente de vidro incolor transparente, por exemplo, béquer com capacidade de 0,2 L a 0,25 L e 6 cm de diâmetro com tampa de vidro ou tampado com filme plástico perfurado, de modo a permitir trocas gasosas e evitar ressecamento do solo teste; estufa; estereomicroscópio; balanças com capacidade para 50 g a 32 kg e precisão de pelo menos 1 g; balança analítica com capacidade para 25 mg a 200 g; precisão de pelo menos 1 mg; peagâmetro; termômetro (idealmente com registro de temperatura e umidade); luxímetro; bastão de vidro; incubadora ou sala com temperatura controlada; pinças, ganchos, alças, pincel bem fino, espátulas, pipetas Pasteur de plástico; parafilme; bandejas; placas de Petri; sacos plásticos para misturar o solo.

11.3.3 Preparo do solo- ou substrato-teste

O substrato-teste deve ser preparado seguindo recomendações do capítulo 7, porém em quantidades maiores do que o necessário para apenas preencher os recipientes e garantir maior precisão das concentrações. Recomenda-se que 500 g (equivalente em matéria seca) de substrato sejam preparados para cada tratamento. Desse montante, a quantidade necessária deve ser distribuída para cada recipiente-teste.

Quantidade do substrato-teste - A norma NBR/ ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda que seja utilizado o correspondente a 20 g (equivalente em matéria seca) do substrato-teste em cada recipiente.

Nota:

Para espécies de tamanho menor, como é o caso de *E. crypticus*, a quantidade pode ser reduzida para 15 g (Arrate et al., 2002) ou 10 g (Pokarzhevskii et al., 2003) porém, a quantidade de substrato utilizada deve preencher 2 cm de profundidade no recipiente, para garantir que todos os enquitreídeos tenham contato suficiente com o substrato-teste durante o ensaio. A redução da quantidade de substrato facilita a busca dos juvenis entre os grânulos do solo e a contagem ao final do ensaio.

Alimento - A quantidade de aveia autoclavada misturada ao substrato-teste que a norma NBR/ ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda é de 50 mg ao início, e 25 mg a cada semana subsequente em cada recipiente para *E. albidus*, mas para *E. crypticus* e outras espécies menores, a quantidade pode ser reduzida. O alimento em excesso é prejudicial, pois pode propiciar o crescimento excessivo de fungos.

Organismos-teste - Dez enquitreídeos saudáveis e com clitelo, limpos e já aclimatados ao substrato, ou solo de referência, devem ser adicionados cuidadosamente a cada recipiente preenchido com o substrato-teste e alimento (ver seção 11.3.1). Pinças, pincéis e alças podem ser utilizados cuidando-se para que os enquitreídeos não sejam lesionados durante esse processo.

11.3.4 Ensaio preliminar de letalidade de *Enchytraeus* sp.

O ensaio preliminar (*range-finding*) só é necessário quando não se sabe qual o intervalo de concentrações de uma substância a ser testada no ensaio definitivo de letalidade (ecotoxicidade aguda). A norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda que o ensaio preliminar para teste de letalidade de uma substância seja conduzido como um ensaio de 14 dias, no qual a substância é testada a 0, 1, 10, 100, 1.000 mg kg^{-1} (miligramas da substância teste por quilograma

de matéria seca do substrato) (ver capítulo 8). Concentrações maiores que 1.000 mg kg^{-1} não precisam ser testadas. Recomenda-se a utilização de um recipiente-teste para cada concentração mais o controle (cada um contendo 10 enquitreídeos adultos) sem a necessidade de replicatas. Após duas semanas, o número de sobreviventes é contado e a letalidade determinada. Se os enquitreídeos não responderem a um estímulo mecânico na parte dianteira (tocando-se de leve com pinça ou pincel), esses também devem ser considerados como mortos.

A presença de espécimes juvenis também pode ser verificada para uma estimativa do efeito sobre a reprodução. Se o efeito observado demonstrar uma relação dose-resposta clara, as concentrações a serem testadas no ensaio definitivo poderão ser determinadas sem problemas e a CL50 aproximada poderá ser estimada por regressão logística ou análise probit (ver capítulo 14). Se a relação dose-resposta não for clara, recomenda-se repetir o ensaio para confirmar o resultado e descartar a possibilidade de problemas de execução do mesmo.

Se nenhum efeito for observado mesmo na maior concentração testada, o ensaio definitivo, nesse caso chamado de ensaio limite, deverá ser conduzido comparando somente oito recipientes-controles com oito recipientes-testes com a concentração de 1.000 mg kg^{-1}.

Em ensaios com solos contaminados provenientes do campo, o mesmo procedimento pode ser feito, porém, com 0, 1, 5, 25, 50 e 100% do solo misturado ao solo padrão ou de referência (ver capítulo 7), se o objetivo for encontrar a CEx. Caso contrário, se o objetivo é apenas verificar a existência ou não de toxicidade, os solos podem ser testados diretamente a 100% no ensaio definitivo.

11.3.5 Ensaio definitivo de *Enchytraeus* sp.

O ensaio definitivo é conduzido como o ensaio preliminar, porém, seguindo o desenho experimental com enfoque desejado (ver capítulo 10) e com a faixa de concentrações desejada ou previamente determinada no ensaio preliminar. A duração do ensaio definitivo de letalidade é de 21 dias (para *E. albidus*) e 14 dias para *E. crypticus* ou outro *Enchytraeus* de ciclo curto. Os adultos são alimentados uma vez por semana com, no máximo, 50 mg ao início do ensaio, e posteriormente, com, no máximo, 25 mg de aveia moída autoclavada por recipiente-teste (ver seção 4.1.3.3). Após esse período, o substrato-teste é examinado cuidadosamente com o auxílio de uma pinça (ou gancho, alça, ou um pincel fino) para verificação de quantos dos 10 adultos sobreviveram em cada recipiente. Alterações morfológicas ou comportamentais também são observadas. Caso se queira prosseguir com o ensaio para verificação de reprodução, o mesmo substrato-teste do ensaio de letalidade, juntamente com os casulos depositados durante o período do ensaio, são reincubados sob as mesmas condições até completar o tempo de exposição necessário (ver seção 12.3).

11.3.6 Substância de referência

A norma não tem valores de referência específicos para letalidade de enquitreídeos uma vez que esse parâmetro não é utilizado normalmente. Portanto, para testar a sensibilidade do organismo, faz-se a avaliação considerando o efeito sobre a reprodução (ver seção 4.9.3). O ácido bórico é a substância referência recomendada (ISO, 2014). Esse procedimento é importante para verificar se a sensibilidade dos organismos-teste das culturas utilizadas se manteve ao longo do tempo e se as condições do laboratório estão adequadas. A norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) ainda recomenda o carbendazim como substância referência, contudo, esse fungicida foi banido em vários países, por isso a substituição pelo ácido bórico é recomendada atualmente.

11.3.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de letalidade com enquitreídeos

Os requisitos e condições necessários para condução e cronograma do ensaio de letalidade estão resumidos nas Tabelas 11.3 e 11.4. O cronograma do ensaio é descrito para *E. crypticus* e *E. albidus*, que são as espécies mais utilizadas, mas pode ser utilizado para qualquer outra que apresente ciclo de vida semelhante.

Tabela 11.3. Resumo dos requisitos e condições recomendadas para condução do ensaio de letalidade com enquitreídeos.

Requisitos	Condição
Tipo de ensaio	Ecotoxicidade aguda; Letalidade.
Referências	NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012); OECD 220 (OECD, 2004a); ISO 16387 (ISO, 2014).
Duração	14 d (alternativamente 7 dias para espécies de ciclo curto).
Organismo-teste	Enquitreídeos adultos com clitelo (espécies do gênero *Enchytraeus*).
Alimentação	Aveia em flocos moída autoclavada (50 mg ou menos, dependendo da espécie) .
Substrato	Solo artificial/natural ou de áreas contaminadas (ver seção 4.4).
Quantidade de solo por recipiente	20 g (material seco) ou menos, desde que preencha 2 cm de profundidade .
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, com temperatura e fotoperíodo controlados (ver capítulo 9).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle, para enfoque na CENO, ou 12 e um controle, para enfoque na ECx (ver capítulo 10).
Número mínimo de repetições/tratamento	4
Número de organismos por repetição	10
Temperatura	18 °C a 22 °C. Obs.: Outras temperaturas têm sido sugeridas para condições tropicais (ver capítulo 9).
Fotoperíodo	16 horas luz: 8 horas escuro (ABNT, 2012).
Intensidade de luz	400 a 800 lux.
Efeito observado	Redução no número de adultos sobreviventes.
Expressão dos resultados	CL50 em 14 dias (ou 7 dias). Além de: tóxico ou não tóxico.
Critérios de validade	Tratamento controle com mortalidade < 20%.
Substância de referência	Ácido bórico. Usar o procedimento para o ensaio de reprodução (ver seção 12.3).

Tabela 11.4. Resumo do cronograma de execução do ensaio de letalidade com *E. crypticus* e *E. albidus*.

Etapas	Dias	*Enchytraeus crypticus*	*Enchytraeus albidus*
Preparo do material	1	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.3.3).	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.3.3).
	3	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).
	4-6	- Seleção de organismos para aclimatação (ver seção 11.3.1).	- Seleção de organismos para aclimatação (ver seção 11.3.1).
	7	- Pré-umedecimento do substrato e separação em lotes (ver seção 11.3.3).	- Pré-umedecimento do substrato e separação em lotes (ver seção 11.3.3).
Montagem do ensaio	8	- Preparação da solução estoque e aplicação da substância-teste (ver captíulo 8 e seção 11.3.4). - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste.. - Introdução dos organismos (ver seções 11.3.1 e 11.3.3). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e pesagem.	- Preparação da solução estoque e aplicação da substância-teste (ver captíulo 8 e seção 11.3.4). - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos (ver seções 11.3.1 e 11.3.3). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e pesagem.
Ensaios preliminar e definitivo - Monitoramento e avaliações	15 (ou 1ª semana de ensaio)	- Verificação da umidade do meio e adição de alimento.	- Verificação da umidade do meio e adição de alimento.
	22 (ou 2ª semana de ensaio)	- Determinação da mortalidade. - Remoção dos adultos. - Observação do comportamento. - Determinação do pH e umidade do meio. (preliminar e definitivo - fim)	- Determinação do pH e umidade do meio. (preliminar- fim) - Verificação da umidade e alimento. (definitivo)
	29 (ou 3ª semana de ensaio)		- Remoção dos adultos. - Observação do comportamento. - Determinação da mortalidade. - Verificação da umidade e alimento do meio. (definitivo – fim)

11.3.8 Validação do ensaio de letalidade de *Enchytraeus* sp.

Para que o ensaio de letalidade de enquitreídeos seja considerado válido, a norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004a) recomendam que a mortalidade dos adultos parentais (os primeiros 10 espécimes colocados em cada recipiente-teste) não exceda 20% em média das replicatas, ao final do teste definitivo. Porém, quando o ensaio de reprodução também é realizado simultaneamente, critérios como o número de juvenis gerados e o coeficiente e variação são considerados nessa avaliação conforme seção 12.3.

11.4 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de letalidade

Para cada concentração, deve-se determinar as médias do percentual de mortalidade e, no caso das minhocas, também a redução/ aumento de biomassa dos

adultos no teste definitivo. A concentração da substância testada deve ser indicada em miligramas do ingrediente ativo por quilograma de massa seca do solo (mg kg^{-1}). Esses dados devem ser apresentados de forma gráfica onde as médias dos efeitos, incluindo seus desvios padrão, são dispostas em um dos eixos e as concentrações testadas, em outro. O gráfico resultante deve expressar a intensidade do efeito em função das concentrações testadas/ diluições do solo-teste.

Os resultados do ensaio de letalidade devem ser expressos em CL50 (14 dias; que se refere à concentração da substância que causa letalidade para 50% das minhocas durante o período de 14 dias de teste), ou como tóxico ou não tóxico, quando a avaliação é qualitativa. Os resultados ainda podem ser expressos como CENO e CEO (ver capítulo 10). No caso da CL50 (14 dias), a percentagem de mortalidade para cada concentração deve ser calculada em relação ao número total de organismos utilizados. A partir dessas percentagens, a CL50 é calculada através de um método estatístico adequado (ver seção 14.2). Também é importante que sempre se referencie o tempo de exposição do ensaio.

Se diluições do solo-teste foram utilizadas nos ensaios, os dados deverão ser apresentados da mesma forma com as diluições do solo-teste indicadas em percentual de solo contaminado em peso de matéria seca ou em miligramas por quilo de substrato seco.

No caso de avaliação qualitativa, se houver diferença estatística significativa entre o solo-teste e solo controle, então o resultado deve ser expresso como "tóxico", caso contrário, o resultado é "não tóxico".

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro, 2014.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.

ARRATE, J. A.; RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M. Effects of three chemicals on the survival and reproduction of the oligochaete worm *Enchytraeus coronatus* in chronic toxicity tests. **Pedobiologia**, v. 46, p. 136-149, 2002. DOI: 10.1078/0031-4056-00120.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **E1676-95**: standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with lumbricid earthworm *Eisenia foetida*. West Conshohocken, 1995.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **E1676-04**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken, 2004.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; SOUZA, J. P. F. A. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 32-38, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.011.

Canada. Environment Canada. Environmental Technology Centre. **Biological test method**: test for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Ottawa, 2004. 156 p.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 1: determination of acute toxicity using soil substrate. Geneva, 2012.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: effects of contaminants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction. Geneva, 2014.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 17512-1**: soil quality: avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals: part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva, 2007.

KULA, H.; LARINK, O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, n. 3/4, p. 635-639, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00030-2.

NIEMEYER, J. C.; CARNIEL, L. S. C.; DE SANTO, F. B.; SILVA, M.; KLAUBERG-FILHO, O. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 4, p. 395-401, 2018. DOI: 10.1007/s10646-018-1915-7.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004a. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction tests** (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Paris, 2004. (OECD. Guideline for the testing of chemicals, 222).

POKARZHEVSKII, A. D.; FILIMONOVA, Zh V.; GORYACHEV, O. A. Life-cycle length determines the differences in sensitivity to toxicants between enchytraeid species. In: **Doklady Biological Sciences**. [Moscow]: MAIK Nauka/Interperiodica, 2003. p. 256-258.

PRINCZ, J.; BECKER, L.; SHCHEFFCZYK, A.; STEPHENSON, G.; SCROGGINS, R.; MOSER, T.; RÖMBKE, J. Ecotoxicity of boric acid in standard laboratory tests with plants and soil organisms. **Ecotoxicology**, v. 26, p. 471-481, 2017. DOI: 10.1007/s10646-017-1789-0.

Ensaios de reprodução (ecotoxicidade crônica) com oligoquetas

12

Paulo Roger Lopes Alves
Maria Edna Tenório Nunes
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Cintia Carla Niva
Julia Carina Niemeyer
Julia Corá Segat
José Paulo Sousa
Jörg Römbke

Os ensaios de ecotoxicidade crônica, em contraste aos de ecotoxicidade aguda, são realizados com a finalidade de determinar efeitos na reprodução, crescimento e comportamento de organismos, decorrentes de perturbações fisiológicas e bioquímicas (Rida; Bouché, 1997). Embora os testes de toxicidade aguda sejam úteis para identificar substâncias químicas tóxicas, eles não avaliam os efeitos sobre os principais eventos do ciclo de vida dos organismos-testes, durante os quais a sensibilidade a compostos tóxicos pode ser pronunciada (Hoffman et al., 2003).

Da mesma forma que para os ensaios de ecotoxicidade aguda (ver capítulo 11), há normas internacionais que descrevem metodologias-padrão para estudar a ecotoxicidade crônica de poluentes a organismos terrestres. Essas metodologias padronizam os ensaios que avaliam o efeito sobre a reprodução de oligoquetas e estão disponíveis para espécies consideradas modelo na ecotoxicologia terrestre. Entre elas destacam-se as normas nº 222 e nº 11268-2 da Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) (2004a) e da International Organization for Standardization (ISO) (1998), respectivamente, para as espécies de minhocas *Eisenia fetida* e *E. andrei*, e ISO 16387 (ISO, 2014), para enquitreídeos do gênero *Enchytraeus*. Existem ainda métodos recomendados pela Environment Canada (EC) para ensaios com minhocas (Canada, 2004). O princípio dos ensaios para as distintas espécies é o mesmo, contudo, os procedimentos seguem particularidades de acordo com as caraterísticas biológicas do organismo-teste, as quais serão detalhadas adiante.

Apesar de se conhecer a sensibilidade e importância desse tipo de ensaio nas avaliações do risco de toxicidade, estas metodologias têm sido pouco exploradas em países das regiões de clima tropical e subtropical (Cardoso & Alves, 2012). Algumas adaptações aos métodos padronizados (OECD e ISO) têm sido adotadas em termos de substrato e temperatura (Römbke et al., 2007; Nunes; Espíndola, 2012; Alves et al., 2013). Entretanto, a utilização de espécies nativas nesse ensaio ainda encontra entraves, pois a biologia e adequabilidade das espécies ainda não são suficientemente conhecidas. A única espécie de minhoca de ocorrência local com biologia razoavelmente conhecida no momento, *P. corethrurus*, apresenta um ciclo de vida de aproximadamente 12

meses a 20 °C (ver seção 4.4), período longo demais para o ensaio de reprodução dentro dos padrões recomendados em Solo Artificial Tropical (SAT) (Buch et al., 2011). Contudo, sob temperaturas maiores, a reprodução é mais rápida, e um aumento da temperatura para ≥22 °C e do tempo do ensaio para 90 dias poderia viabilizar o ensaio com essa espécie e sua comparação com *E. andrei* ou *E. fetida* (ver Buch et al., 2017).

A seguir, descrevemos o procedimento para condução do ensaio de ecotoxicidade crônica (reprodução) para *E. fetida* e *E. andrei* seguindo, basicamente, as normas ISO 11268-2 (ISO, 2012) e OECD 222 (OECD, 2004a) e, para enquitreídeos, *Enchytraeus* sp., as normas ISO 16387 (ISO, 2014) e OECD 220 (OECD, 2004b). Ao longo do texto, foram incluídas observações sobre as adaptações recomendadas para condições tropicais, como as do Brasil.

12.1 Princípio do ensaio de reprodução

Organismos adultos são expostos a uma gama de concentrações de uma substância-teste, em um substrato (solo artificial, natural, ou ainda em amostras de solo provenientes de áreas contaminadas) e então são determinados os efeitos na reprodução em termos de número de juvenis produzidos e, no caso de minhocas, também no crescimento (biomassa corporal).

O percentual de sobrevivência dos adultos é determinado 28 dias após o início do ensaio para minhocas e, após 14 dias (ou 7 dias), para enquitreídeos, havendo exigências mínimas de sobrevivência nos controles para a validação dos ensaios. Os efeitos sobre a reprodução são avaliados pela contagem do número de juvenis, normalmente, nascidos aos 56 dias (minhocas), e aos 28 ou 42 dias (enquitreídeos), entretanto, estes períodos podem variar de acordo com o ciclo de vida de cada espécie.

No caso de ensaios com uma substância-teste da qual ainda não se conhece a concentração capaz de provocar algum efeito negativo na reprodução, recomenda-se a realização do ensaio em duas etapas, uma preliminar e outra definitiva. O objetivo do ensaio preliminar é determinar a faixa de concentrações subletais que serão utilizadas no teste definitivo. Neste segundo momento serão determinadas as concentrações da substância-teste que afetam apenas a reprodução do organismo.

12.2 Ensaio de reprodução de minhocas

12.2.1 Organismo-teste

Assim como nos ensaios de letalidade (ver capítulo 11), minhocas adultas (com clitelo aparente) das espécies *E. andrei* e *E. fetida*, com peso individual

entre 300 e 600 mg, são utilizadas nos ensaios de reprodução (ecotoxicidade crônica). Os organismos devem ser obtidos a partir de uma criação padrão (ver seção 4.1.3) e os demais cuidados e procedimentos de preparação para os ensaios são idênticos aos descritos no capítulo do ensaio de letalidade (ver seção 11.2).

Visando evitar uma alta variabilidade nas taxas de reprodução, decorrentes de grandes diferenças na idade dos organismos utilizados nos ensaios de reprodução, recomenda-se utilizar apenas adultos, com idade entre dois meses e um ano de idade, provenientes de culturas sincronizadas, ou seja, aqueles em que as minhocas tenham idade e biomassa parecidas. Para tanto, deve-se iniciar as culturas com casulos, como descrito na seção 4.1.3.

12.2.2 Recipientes-teste e equipamentos

Os equipamentos são os mesmos utilizados no ensaio de letalidade. Porém, um equipamento para banho-maria é recomendado para facilitar a extração e contagem dos juvenis aos 56 dias de ensaio (Figura 12.1).

12.2.3 Preparo do solo- ou substrato-teste

O preparo do conteúdo dos recipientes e a instalação dos ensaios de toxicidade crônica com minhocas são semelhantes aos descritos para a avaliação da toxicidade aguda (ver seção 11.2). Da mesma forma, devem ser seguidas as recomendações de faixa ideal de pH do substrato-teste (ver seção 7.5), peso e idade dos organismos, formas de aplicação das substâncias a serem testadas (ver capítulo 8), tipo de recipientes utilizados e a manutenção semanal dos experimentos. Contudo, neste caso, recomenda-se que, antes de iniciar o experimento, seja misturada ao substrato-teste uma fonte de alimento.

12.2.4 Ensaio preliminar de reprodução de minhocas

A principal função deste ensaio é determinar as concentrações subletais, que possivelmente causam algum efeito prejudicial à reprodução dos organismos. Os procedimentos para realização do mesmo estão descritos na seção 11.2.5 (minhocas).

12.2.5 Ensaio definitivo de reprodução de minhocas

O procedimento de instalação do ensaio definitivo é o mesmo descrito para o ensaio de letalidade, na seção 11.2. Contudo, a manutenção e a forma de avaliação são diferentes. No caso de ensaios com aplicação de substâncias ao substrato, devem ser avaliadas pelo menos cinco diferentes concentrações da substância-teste, calculadas em relação ao peso de substrato seco (mg kg^{-1}), em série geométrica (ver capítulo 10), além de um tratamento controle, no qual o substrato será tratado com o mesmo solvente utilizado para diluir as dife-

Fotos: Paulo Roger Lopes Alves

Figura 12.1. A) Recipientes do ensaio de toxicidade crônica em banho-maria para extração das minhocas juvenis geradas após 56 dias; B) Detalhe da separação dos juvenis provindos da superfície dos recipientes com solo; C) Contagem manual dos juvenis de *E. andrei* gerados no ensaio de toxicidade crônica.

rentes concentrações da substância-teste (normalmente água), com pelo menos 4 repetições por tratamento.

No ensaio de reprodução as minhocas devem ser alimentadas com 5 g de alimento (5 g de esterco misturado com 5 mL de água deionizada por recipiente) por cada 500 g de solo, no inicio do ensaio, quando espécies padronizadas, como *E. andrei* e *E. fetida* forem utilizadas. No caso de ensaios com solos naturais, caso os mesmos contenham < 2% de carbono orgânico, adiciona-se a mesma quantidade de alimento. Para as demais espécies, observar hábitos alimentares das mesmas e recomendações de suplementação alimentar em literatura. Caso haja consumo do alimento, ele deve ser reposto na superfície do solo aos sete dias do ensaio, mas se não houver consumo do alimento, não é necessário realimentar as minhocas. Após adicionar os organismos-teste, os recipientes-testes devem ser pesados para o monitoramento e reposição semanal da umidade como descrito no ensaio preliminar.

Após quatro semanas (28 dias) do início do ensaio, deve ser realizada a primeira avaliação. Neste momento, os indivíduos adultos devem ser retirados manualmente, observando-se alterações morfológicas (como afilamento; falta de pigmentação da porção posterior; estrangulamentos em diferentes regiões do corpo; fragmentação e perda de segmentos), comportamentais (letargia ou lentidão na resposta a estímulos mecânicos) e o número de sobreviventes em cada recipiente-teste. Os sobreviventes devem ser pesados, individualmente, em balança analítica, para obter os valores da biomassa corporal. Após a retirada dos adultos, o solo, junto aos eventuais casulos e juvenis, deve retornar aos recipientes-testes, os quais devem ser mantidos por mais 28 dias sob as mesmas condições do início do ensaio.

Após 56 dias do início do ensaio faz-se a contagem do número de juvenis gerados para avaliar os efeitos causados pela substância-teste na reprodução dos organismos. Para isto, os recipientes-testes, sem as tampas, devem ser mantidos em banho-maria (Figura 12.1A) a temperaturas entre 55 °C e 65 °C, por um período de 20 a 30 minutos (ISO, 1998). Há casos nos quais este período no banho-maria é insuficiente e, nestas situações, recomenda-se aguardar até uma hora. Devido ao gradiente de calor produzido dentro do substrato, os juvenis presentes sobem até a superfície e podem ser facilmente extraídos. Na sequência, os juvenis são separados manualmente e contados (Figuras 12.1B e C).

Como o ensaio de reprodução tem longa duração (8 semanas), é imprescindível que se mantenha a umidade dos substratos corrigida, assim como deve ser realizada uma suplementação de alimento para que os organismos mantenham taxas suficientes de reprodução e crescimento. Para tanto, imediatamente após a inserção dos substratos nos recipientes-testes, no momento de instalação do ensaio, cada recipiente deve ser pesado e o peso anotado. Semanalmente, durante todo o período do ensaio, após nova pesagem, devem ser adicionadas quantidades de água correspondentes às perdas em relação à semana anterior. Estercos bovino ou equino (secos e peneirados) são suge-

ridos para suplementar a alimentação dos organismos, semanalmente, durante o ensaio. Recomenda-se que sejam fornecidos 5 g de esterco (seco) umedecido com 5 mL de água para cada porção de 500 g (matéria seca) do substrato-teste, se houver consumo, independentemente do solo-teste utilizado (natural ou artificial). A Environmental Canada ainda recomenda o uso de aveia em flocos cozida para alimentação dos organismos (Canada, 2004).

Após o final do ensaio de reprodução definitivo, será possível determinar a maior concentração da substância-teste que, quando misturada ao solo, não causa efeito significativo na biomassa dos adultos e no número de juvenis gerados, quando comparado ao controle (Concentração de Efeito Não Observado - CENO), e a menor concentração que causa efeito significativo (Concentração de Efeito Observado - CEO). Além disso, através do uso de regressões não lineares, é possível estimar as concentrações (Concentração Efetiva – CE) em que 50% e 20% (CE50 e CE20) da taxa reprodutiva são reduzidas. Detalhes sobre o cálculo e a expressão dos resultados estão descritos na seção 12.4 e no capítulo 14.

12.2.6 Substância de referência

Para confirmar e monitorar a sensibilidade das minhocas como organismos bioindicadores, é necessário realizar um ensaio de toxicidade crônica com o ácido bórico, substância de referência para *E. fetida* e *E. andrei* (ISO, 2012). Quando misturado ao substrato, efeitos significativos ($\alpha = 0,05$) na reprodução deverão ser observados em concentrações entre 400 a 600 mg i.a. (ingrediente ativo - ácido bórico) por kg de substrato seco. Este ensaio deve ser conduzido de acordo com o procedimento descrito na seção 12.2.5. (Ensaio definitivo), no mínimo, uma vez ao ano.

No trabalho realizado por Niemeyer et al. (2018), *E. andrei* apresentou CE50 de 242 e 281 mg kg^{-1} de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica, em ensaio de reprodução, com intervalo de confiança na faixa de 172 a 343 mg kg^{-1} considerando os dois casos. Esses trabalhos com SAT demonstram valores menores do que com o solo artificial OCDE com 10% de matéria orgânica para o efeito sobre a reprodução (ISO, 2012), CE50 de 433 mg kg^{-1} (Stantec, 2004) e 484 mg kg^{-1} (Becker et al., 2011). Aparentemente os valores de CE50 com SAT são menores que em solo artificial OCDE, entretanto, são necessários mais estudos para se estabelecer a faixa de sensibilidade para ensaios com o solo tropical.

O carbendazim, um fungicida de classificação toxicológica: classe III (ANVISA - Consulta Pública nº 113, de 19 de dezembro de 2007) (Anvisa, 2007), era a substância de referência utilizada anteriormente, porém o seu uso foi proibido em diversos países. Deste modo, optou-se por uma substância que oferecesse menor risco e que fosse comercialmente disponível.

12.2.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de reprodução de minhocas

A Tabela 12.1 apresenta um resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica (reprodução) com *E. fetida* e *E. andrei*. O cronograma de execução do ensaio é descrito na Tabela 12.2.

Tabela 12.1. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com minhocas.

Requisitos	Especificação
Tipo de ensaio	Ecotoxicidade crônica; reprodução.
Referências	OECD 222 (OECD, 2004a); ISO 11268-2 (ISO, 2012).
Duração total	56 dias.
Organismo-teste	Minhocas *Eisenia fetida* ou *E. andrei* (adultos, com peso individual entre 300 mg e 600 mg).
Alimentação	5 g de esterco (seco) com 5 mL de água (semanalmente).
Substrato	Solo artificial/natural ou de áreas contaminadas.
Quantidade de solo por recipiente	500 g (material seco) – ISO/OECD. Obs.: 750 g (ABNT, 2007) e 200 g para recipientes de 473 mL (ASTM, 2004).
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, com temperatura e fotoperíodo controlados (ver capítulo 9).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle.
Número minímo de repetições/tratamento	4
Número de organismos por repetição	10
Efeito observado	Alteração na biomassa e no número de juvenis gerados.
Expressão dos resultados	CENO, CEO, CE50/CE20 em 56 dias. Além de: tóxico ou não tóxico
Critérios de validade	Tratamento controle com: produção de no mínimo 30 juvenis por réplica; mortalidade < 10% e coeficiente de variação < 30%.
Substância de referência	Ácido bórico: CE50 = 400 mg a 600 mg H_3BO_3 kg^{-1} de solo artifical OCDE (massa seca) (ISO, 2012); valores para SAT discutidos na seção 12.2.6. Carbendazim: em desuso.

Tabela 12.2. Cronograma de execução do ensaio de toxicidade crônica com minhocas *Eisenia fetida* e *E. andrei*.

Etapas	Período	Atividade a ser desenvolvida
Preparo do material	2 meses antes do início	- Sincronização das culturas para obtenção de organismos com idade e biomassa corporal semelhante.
	3 dias antes do início	- Preparo do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.2.4).
	1-2 dias antes do início	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4). - Seleção de organismos para aclimatação (ver seções 11.2.1 e 11.2.2).
Montagem do ensaio	Dia 1	Seguir as recomendações descritas para o ensaio de letalidade (ver seção 11.2): - Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste e homogeneização do solo com solução/suspensão. - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos. - Determinação do pH e pesagem dos recipientes (contendo o solo e os organismos).
Monitoramento e avaliações (Ensaios preliminar e definitivo)	Dia 7	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 1).
	Dia 14	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 7).
	Dia 21	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 14).
	Dia 28	- Determinação da mortalidade, remoção e pesagem dos adultos (ver seção 11.2.8). - Observação de alterações morfológicas e no comportamento das minhocas. - Determinação do pH (ver seção 7.5). - Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 21). - Dispor apropriadamente das minhocas, de acordo com os requerimentos legais (ver capítulo 16).
	Dia 35	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 28).
	Dia 42	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 35).
	Dia 56	- Extrair juvenis do solo-teste e realizar contagem manual (ver seção 12.2.5). - Determinação do pH (ver seção 7.5). - Dispor apropriadamente das minhocas e solos, de acordo com os requerimentos legais (ver capítulo 16).

12.2.8 Validação do ensaio

Para que o ensaio de reprodução com *E. fetida* e *E. andrei* seja considerado válido, as normas OECD no 222 (OECD, 2004a) e ISO 11268-2 (ISO, 1998) recomendam que três critérios sejam preenchidos. Esses critérios se aplicam aos dados de reprodução nos controles:

1. Em cada réplica deve haver, no mínimo, 30 indivíduos no final do teste.
2. O coeficiente de variação deve ficar inferior a 30%.
3. A mortalidade de minhocas adultas, aos 28 dias, deve ser ≤ 10%.

12.3 Ensaio de reprodução de *Enchytraeus* sp.

12.3.1 Organismo-teste (ver seção 11.3.1)

12.3.2 Recipientes-teste e equipamentos (ver seção 11.3.2)

12.3.3 Ensaio preliminar de reprodução de *Enchytraeus* sp.

O teste preliminar ao ensaio de reprodução é idêntico ao preliminar de letalidade (seção 11.3), porém, como o objetivo neste ensaio é encontrar a faixa de concentrações subletais, mais atenção deve ser dada à presença e ausência de juvenis nas concentrações testadas, ao final do ensaio preliminar. Esses dados auxiliarão na determinação das concentrações a serem usadas no ensaio definitivo de toxicidade crônica.

12.3.4 Ensaio definitivo de reprodução de *Enchytraeus* sp.

O ensaio definitivo deve seguir um dos esquemas experimentais descritos no capítulo 10. O ensaio de reprodução com enquitreídeos é normalmente conduzido incluindo-se também, uma avaliação do efeito letal das concentrações testadas após a metade do tempo de duração do ensaio, como descrito na seção 11.3.5. A duração total do ensaio de reprodução é de seis semanas (42 dias) para *E. albidus* e quatro semanas (28 dias) para *E. crypticus*. Os adultos são alimentados uma vez por semana com aproximadamente 50 mg de aveia moída e autoclavada, no início do ensaio e, posteriormente, com aproximadamente 25 mg por recipiente-teste. Para avaliação da letalidade, após 14 dias, espalha-se o substrato-teste sobre um recipiente raso (bandeja pequena, placa de Petri de 15 cm de diâmetro ou pedaço de folha de papel alumínio etc.) e examina-se, cuidadosamente, com o auxílio de uma pinça (ou gancho, alça, ou um pincel fino) para contar, quantos dos 10 adultos expostos inicialmente sobreviveram em cada recipiente-teste. Os adultos são retirados e o mesmo substrato-teste, juntamente com os casulos depositados, são reincubados sob as mesmas condições até completar o tempo de exposição necessário (três semanas adicionais para *E. albidus* e duas, para *E. crypticus*) para o ensaio de reprodução. A remoção dos adultos deve ser rápida para evitar o ressecamento do substrato e dos juvenis já eclodidos. A adição de alimento deve continuar por mais uma semana.

O ensaio de reprodução com *E. crypticus* pode ser conduzido por quatro semanas ininterruptas (28 dias) sem a remoção dos adultos após 14 dias (Chelinho et al., 2011). Nesse caso, a avaliação de mortalidade não é feita pois,

ao final da quarta semana, não é possível diferenciar com precisão os adultos parentais dos seus descendentes. Ressalta-se, ainda, que em temperaturas mais altas, condizentes com o clima subtropical e tropical (> 20 °C), o ciclo de vida dos enquitreídeos será provavelmente mais rápido e, portanto, o número de juvenis produzidos durante o período do ensaio de 28 dias será maior, o que poderá tornar o processo de contagem muito mais laborioso. A redução da duração do ensaio de reprodução em temperaturas mais altas pode ajudar desde que os critérios de validade do teste (ver seção 12.3.8) sejam atendidos. Castro-Ferreira et al. (2012) demonstraram que o tempo de exposição pode ser reduzido para 21 dias para *E. crypticus*, devido ao curto ciclo de vida da espécie, e Oliveira-Filho et al. (2018) constataram a viabilidade de se utilizar apenas 21 dias para esta espécie com SAT. Ensaios de reprodução com outra espécie de *Enchytraeus* coletada no Paraná também foram realizados com três semanas, alcançando os critérios de validação recomendados (Assis, 2015; Oliveira-Filho et al., 2017).

12.3.5 Método de fixação, coloração e contagem de *Enchytraeus* sp.

Os enquitreídeos juvenis são muito pequenos e não tem pigmentação conspícua, sendo difíceis de serem visualizados mesmo quando fixados. Porém, métodos de coloração facilitam bastante a sua visualização. Os juvenis são fixados adicionando-se etanol ao recipiente teste até cobrir o substrato e algumas gotas do corante vermelho (ou rosa) de Bengala (solução 1% em etanol) ou eosina (2%), o suficiente para que o etanol fique rosado. Após 12 horas, os enquitreídeos estarão coloridos e poderão ser facilmente visualizados. Para contagem, espalha-se o conteúdo do recipiente-teste sobre uma bandeja ou placa de Petri, remove-se o excesso de etanol e contam-se os enquitreídeos sob um microscópio estereoscópio (Figura 12.2). Os recipientes com solo e etanol, devidamente tampados, podem ser preservados em geladeira ou local fresco por várias semanas até que se faça a contagem. Esses e outros métodos para contagem de juvenis estão descritos na norma NBR ISO 16387 (ABNT, 2012). Após a contagem, o descarte de material deve ser feito conforme o capítulo 16.

Foto: Cintia Carla Niva

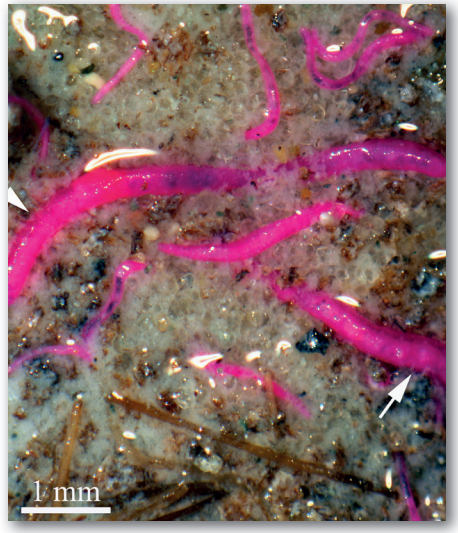


Figura 12.2. Enquitreídeos juvenis e adultos fixados em etanol e corados com Rosa de Bengala.

12.3.6 Substância de referência

Assim como visto para as minhocas, para verificar se a resposta do organismo teste tem se mantido ao longo do tempo e se as condições do laboratório estão adequadas, a norma NBR ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda que a CENO e/ou CEx de uma substância referência seja determinada periodicamente (duas vezes ao ano) ou em paralelo com a avaliação de toxicidade de outra substância. Neste caso, o fungicida carbendazim costumava ser utilizado como substância de referência (controle positivo), pois afeta a reprodução dos enquitreídeos. A CE50 (reprodução-42 dias) de *E. albidus* é de 1,2 ± 0,8 mg carbendazim kg^{-1} de peso de solo OCDE seco, em teste com temperatura de 20 °C (Römbke;

Moser, 1999), enquanto a de *E. crypticus*, nessas mesmas condições, é de 44 ± 5 mg kg^{-1} (Kuperman et al., 2006). O teste deve ser conduzido com duas ou três concentrações próximas a CE50, com oito repetições cada, bem como o mesmo número para o controle (sem a substância). O número esperado de juvenis nessas concentrações deve ser de aproximadamente 50% ± 20%.

Na versão atualizada da norma ISO 16387 de 2014 (ISO, 2014), o ácido bórico passou a ser a substância referência recomendada, devido à proibição do uso do carbendazim. De acordo com essa nova recomendação, o efeito do ácido bórico a concentrações entre 400 mg e 600 mg por quilograma da massa de matéria seca do substrato sobre a reprodução poderá ser testado para comprovar a sensibilidade ($\alpha = 0.05$). Um trabalho mais recente apresentou CE50 para *E. crypticus* de 165 mg kg^{-1} de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica, para o efeito sobre a reprodução por 28 dias (Niemeyer et al., 2018). Em outro trabalho, *E. crypticus* e uma espécie coletada no estado do Paraná e criada em laboratório, *Enchytraeus* sp. (Schmelz & Niva, espécie nova não publicada) apresentaram CE50 de 67 mg kg^{-1} e CE50 de 57 mg kg^{-1} de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica, respectivamente, em ensaio de reprodução realizado por 21 dias (Assis, 2015; Morais et al., 2016). Esses trabalhos com SAT demonstram valores bem menores do que com o solo artificial OCDE com 10% de matéria orgânica para o efeito sobre a reprodução. Mais estudos são necessários para o estabelecimento da faixa de sensibilidade dos enquitreídeos ao ácido bórico, porém deve-se atentar a uma possível maior sensibilidade, quando em SAT.

12.3.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de reprodução de *Enchytraeus* sp.

Os requisitos e condições recomendados para a condução do ensaio de reprodução estão descritos na Tabela 12.3. O resumo do cronograma para condução do ensaio de reprodução está descrito na Tabela 12.4 para *E. crypticus* e *E. albidus*, que são as espécies mais utilizadas, mas pode ser utilizado para qualquer outra espécie de enquitreídeo que apresente ciclo de vida semelhante.

Tabela 12.3. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com enquitreídeos.

Requisitos	Condição
Tipo de ensaio	Ecotoxicidade crônica; reprodução.
Referências	NBR/ ISO 16387 (ABNT, 2012); OECD 220 (OECD, 2004b); ISO 16387 (ISO, 2014).
Duração	42 dias (há casos de 21 dias para espécies de ciclo curto).
Organismo-teste	Enquitreídeos adultos com clitelo (espécies do gênero *Enchytraeus*).
Alimentação	Aveia em flocos moída autoclavada (50 mg ou menos, dependendo da espécie) (ver seção 11.3.3).
Substrato	Solo artificial/ natural ou de áreas contaminadas
Quantidade de solo por recipiente	20 g (material seco) desde que preencha 2 cm de profundidade.
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, com temperatura e fotoperíodo controlados (ver capítulo 9).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle, para enfoque na CENO, ou 12 e um controle, para enfoque na CE (ver capítulo 10).
Número mínimo de repetições/tratamento	4
Número inicial de organismos por repetição	10
Temperatura	18 °C a 22 °C. Obs.: Outras temperaturas têm sido sugeridas para condições tropicais (ver capítulo 9).
Fotoperíodo	16 horas luz: 8 horas escuro (ABNT, 2012)
Intensidade de luz	400 a 800 lux.
Efeito observado	Alteração no número de juvenis em relação ao controle
Expressão dos resultados	CE50 em 42 dias para *E. albidus*; 28 dias para espécies de *Enchytraeus* de ciclo de vida mais curto (21 dias em alguns casos; ver seção 12.3.4). Além de: tóxico ou não tóxico.
Critérios de validade	Coeficiente de variação < 50%.
Substância de referência	Ácido bórico: 400 a 600 H_3BO_3 kg^{-1} de solo artificial OCDE (massa seca); valores para SAT discutidos na seção 12.3.6. Carbendazim: em desuso.

Tabela 12.3. Resumo do cronograma de execução do ensaio de reprodução com *E. crypticus* e *E. albidus*.

Etapas	Período	*Enchytraeus crypticus*	*Enchytraeus albidus*
Preparo do material	Dia 1	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.3.3).	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.3.3).
	Dia 3	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).	- 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 seção 11.3.1).	- Seleção de organismos para aclimatação (ver seção 11.3.1).
	Dia 7	- Pré-umedecimento do substrato e separação em lotes (ver seção 11.3.3).	- Pré-umedecimento do substrato e separação em lotes (ver seção 11.3.3).
Montagem do ensaio	Dia 8	- Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste (ver captíulo 8 e seção 11.3.4). - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos (ver seções 11.3.1 e 11.3.3). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e pesagem.	- Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste (ver captíulo 8 e seção 11.3.4). - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos (ver seções 11.3.1 e 11.3.3). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e pesagem.
Ensaios preliminar e definitivo - Monitoramento e avaliações	Dia 15	- Verificação da umidade e alimento.	- Verificação da umidade e alimento.
	Dia 22	- Determinação da mortalidade, remoção dos adultos e observação do comportamento (etapa facultativa do ensaio definitivo). - Verificação de umidade e alimento. - Ensaio preliminar se encerra aqui com: • Estimativa do número de juvenis. • Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). • Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.	- Verificação da umidade e alimento. - Ensaio preliminar se encerra aqui com: • Estimativa do número de juvenis. • Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). • Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.
	Dia 29	- Verificação de umidade e alimento.	- Determinação da mortalidade, remoção dos adultos e observação do comportamento. - Verificar umidade e alimento.
	Dia 36	- Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.	- Verificação da umidade.
	Dia 43		- Verificação da umidade e alimento.
	Dia 44		- Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.

12.3.8 Validação do ensaio de reprodução *Enchytraeus* sp.

Para que o ensaio de reprodução com enquitreídeos seja considerado válido, as normas NBR ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004b) recomendam que três critérios sejam preenchidos. Esses critérios se aplicam aos dados de sobrevivência e reprodução nos controles:

1. A mortalidade dos adultos parentais (dez em cada recipiente-teste) não deve exceder 20% em média ao final do teste definitivo.
2. O número de juvenis ao final do teste definitivo em cada recipiente-controle deve ser maior que 25 (*E. albidus* – 42 dias) ou 50 (*E. crypticus* e outros

Enchytraeus de tamanho menor - 28 dias); o número mínimo poderia ser modificado para ≥ 100, conforme dados mais recentes discutidos a seguir.

3. O coeficiente de variação calculado para os dados de reprodução (número de juvenis) ao final do teste deve ser menor que 50% no ensaio definitivo.

O critério para o número de juvenis recomendados pelas normas NBR ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004b) é bastante baixo em relação à quantidade de juvenis produzidos em determinadas condições. Achazi (1997) relata o número de 104 juvenis produzidos por adulto em 28 dias em solo natural padrão LUFA 2.2 a 20 °C, enquanto Kuperman et al. (2006), relataram 480 juvenis por 10 adultos em solo artificial OECD. Kuperman et al. (2006), após compararem o efeito de vários tipos de solos americanos sobre a reprodução de *E. crypticus*, propõem que, para essa espécie, o critério de mortalidade aceitável seja mantido em 20%, mas que o número mínimo de juvenis por recipiente-controle seja modificado para 100 em 28 dias e o coeficiente de variação seja de no máximo 30%. Chelinho et al. (2011) também verificaram taxas reprodutivas bastante altas para *E. crypticus* em vários tipos de solo mediterrâneos (382-1.200 juvenis por recipiente a 20 °C em 28 dias) que também justificam um valor maior para o critério de número de juvenis para essa espécie. Castro- Ferreira et al. (2012) relataram mais de 700 juvenis após 21 dias em solo natural LUFA. A experiência dos autores desse capítulo mostrou que *E. crypticus* em SAT a 22 °C ou 25 °C apresenta taxa reprodutiva de mais de 1.000 juvenis por recipiente após 28 dias de incubação (Comunicação fornecida por Cintia Niva e Júlia Niemeyer em julho de 2013) e 400-700 juvenis após 21 dias a 22 °C ou 25 °C com *E. crypticus* ou outra espécie de *Enchytraeus* em SAT (Assis, 2015; de Menezes Oliveira et al., 2018; Oliveira-Filho et al., 2018; Niemeyer et al., 2018).

12.4 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de reprodução

Nos ensaios de reprodução com minhocas e enquitreídeos, a percentagem de mortalidade, redução/aumento de biomassa corporal (apenas para minhocas) e o número de juvenis produzidos no ensaio definitivo devem ser calculados e comparados por métodos estatísticos adequados (ver capítulos 10 e 14).

A maior concentração da substância testada que não causou alterações significativas na biomassa e na reprodução (CENO) e a menor que causou alterações (CEO) devem ser expressas em miligramas da substância por quilograma de solo seco (mg kg^{-1}). A CENO e CEO são identificadas por análises de variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas (ver capítulo 14).

O valor de CEx do ensaio de reprodução, onde x pode ser a percentagem de 10, 20 ou 50, é a concentração estimada que causa efeito no número de juvenis produzidos em relação ao controle. Por exemplo, CE50 é a concentração que causa 50% de redução no número de juvenis produzidos em relação ao con-

trole. A concentração estimada é calculada através de uma análise de regressão não linear, com as médias obtidas de número de juvenis de cada tratamento. O CEx é obtido a partir do valor correspondente a X% da média do controle na equação da análise de regressão.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. 2012. 29 p.

ACHAZI, R. K. Einfluss von anthropogenen schadstoffen (PAK und PCB) auf terrestrische invertebraten urbaner ökosysteme. In: KRATZ, W.; BROSE, A. (Ed.). **Bodenökologische Untersuchungen zur Wirkung und Verteilung von organischen Stoffgruppen (PAK, PCB) in ballungsraumtypischen Ökosystemen**. München: Abschlussbericht für das BMBF, 1997. p. 109-120.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p. 2674-2682, 2013. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 114, de 19 de dezembro de 2007**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/consulta_publica/consultas_paginado.asp?ano=2007>. Acesso em: 22 fev. 2019.

ASSIS, O. **Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como indicadores do manejo do solo e em ensaios ecotoxicológicos**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **E1676**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken, 2004. 26 p.

BECKER, L.; SCHEFFCZYK, A.; FÖRSTER, B.; OEHLMANN, J.; PRINCZ, J.; RÖMBKE, J.; MOSER, T. Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 238-248, 2011. 10.1007/s11368-010-0282-7.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. **Pedobiologia**, v. 54, S19-S25, DOI: 10.1016/j.pedobi.2011.07.007.

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, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.150.

CASTRO-FERREIRA, M. P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM M. J. B. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 87, p. 1222-1227, 2012. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.021.

CARDOSO, E.J.B.N.; ALVES, P.R.L.A. Soil Ecotoxicology. In:BEGUM, G. (Org.). **Ecotoxicology**. 1ed. InTech, 2012, p. 27-50.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; ANDRÉS, P.; SOUSA, J. P. Improving ecological risk assessment in the

mediterranean area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two oligochaete species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1050-1058, 2011. DOI: 10.1002/etc.480.

Canada. Environment Canada. Environmental Technology Centre. **Biological test method**: test for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Ottawa, 2004. 156 p.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS J. **Handbook of Ecotoxicology**. London: Blackwell Scientific Publications, 2003. v. 2. 1290 p.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268:-2**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eienia fetida*): part 2: determination of effects on reproduction. Geneve, 2012.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: effects of contaminants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction. Geneve, 2014.

KUPERMAN, R. G.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; LANNO, R.; CHECKAI, R. T.; DODARD, S. G.; SUNAHARA, G. I.; SCHEFFCZYK, A. Adaptation of the enchytraeid toxicity test for use with natural soil types. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S234-S243, 2006. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.028.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; BIANCHI, M.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2919-2924, 2018. DOI: 10.1002/etc.4056.

MORAIS, R. S.; ASSIS, O.; NIVA, C. C.; OLIVEIRA, V.B. M.; BIANCHI, M. O.; BROWN, G. G. Ensaio de reprodução de duas espécies de enquitreídeos utilizando ácido bórico como substância de referência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 14., 2016, Curitiba. **Anais de resumos**. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2016. p. 1812-1813.

NIEMEYER, J. C.; CARNIEL, L. S. C.; DE SANTO, F. B.; SILVA, M.; KLAUBERG-FILHO, O. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 4, p. 395-401, 2018. DOI: 10.1007/s10646-018-1915-7.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; BRITO, D. Q.; DIAS, ZELIA M. B.; GUARIEIRO, M. S.; CARVALHO, E. L.; FASCINELI, M. L.; NIVA, C. C.; GRISOLIA, C. K. Effects of ashes from a Brazilian savanna wildfire on water, soil and biota: an ecotoxicological approach. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 101-111, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.051.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*andrei*)**. Paris, 2004a. 18 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 222).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004b. 22 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

RIDA, A. M. M. A.; BOUCHÉ, M. B. Earthworm toxicology: from acute to chronic tests. **Soil Biology & Biochemistry**,v. 29, n. 3/4, p. 699-703, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00275-1.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. **Organisation and performance of an international ringtest for the validation of the enchytraeid reproduction test**. [S.l.: s.n.], 1999. v. 1, 2. 223 p. (UBA-Texte 4/99).

RÖMBKE, J.; GARCIA, M. V. B.; SCHEFFCZYK, A. Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 590-598, 2007. DOI: 10.1007/s00244-006-0219-8.

STANTEC. **Developmental studies in support of environment Canada's biological test methods for measuring soil toxicity to earthworms**. Ottawa: Environmental Technology Centre, 2004.

Ensaio de comportamento de fuga

13

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 (Yeardley 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, consequentemente, 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 *Amynthas 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 cm^2 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

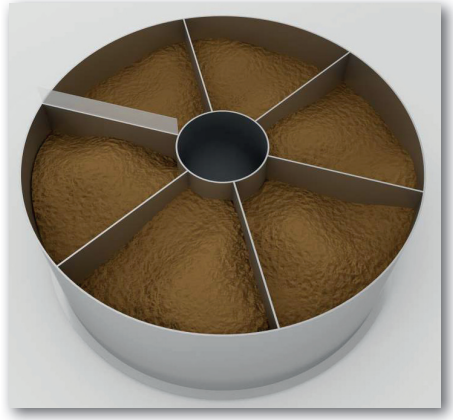


Figura 13.2. Exemplo de um recipiente-teste com seis seções.

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 (H_2BO_3) é recomendado como substância de referência tóxica. Um comportamento de fuga deve ser obtido numa concentração de 750 mg H_2BO_3 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 *E. fetida* ou *E. andrei* (adultos, com peso individual entre 300 mg e 600 mg). *A. gracilis* e *E. eugeniae* adultas com peso individual >1 g. *P. corethrurus* adultas com peso individual >700 mg. *P. excavatus* 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 minímo 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
Critérios 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_3BO_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 (ser 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.

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

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 *Pontoscolex 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.

Análise estatística dos resultados de ensaios de ecotoxicidade

14

José Paulo Sousa
Dilmar Baretta

14.1 Aspectos importantes na análise de dados

A análise de dados derivados de ensaios ecotoxicológicos passa essencialmente pela avaliação da existência de efeitos significativos em relação ao controle no(s) parâmetro(s) medido(s) (a identificação do CEO e CENO) e/ou pela interpolação da concentração da substância teste que origina uma determinada percentagem de efeito em relação ao controle (estimativa do CEx ou CLx) (ver capítulo 10).

Já numa análise de risco retrospectiva, especialmente quando os ensaios são realizados em solos naturais contaminados, a avaliação foca essencialmente nas diferenças entre os solos teste e as respectivas referências. A determinação do CENO, CEO, CEx, CLx pode ser efetuada caso haja uma diluição do(s) solo(s) contaminado(s) com a(s) respectiva(s) referência(s), criando um gradiente em laboratório. No entanto, neste caso, tal como referido nos diferentes capítulos anteriores, é fundamental trabalhar com um (ou mais) solo(s) de referência cujas propriedades pedológicas sejam semelhantes às do(s) solo(s) teste.

Os métodos estatísticos utilizados para avaliar os parâmetros mencionados são a Análise de Variância (Anova) e métodos de regressão linear ou não linear. Nestes métodos paramétricos, é fundamental verificar os pressupostos inerentes a estes testes, nomeadamente a normalidade e a homogeneidade de variância dos resultados obtidos. Caso um destes pressupostos não seja atendido, deve proceder com a transformação dos dados e reavaliar os dois pressupostos. Entretanto, caso a transformação não tenha efeito, deve-se avançar para a aplicação de métodos não paramétricos (apenas para a Anova) (Figura 14.1).

Antes de se avançar para a realização dos testes estatísticos, mesmo com a validação dos respectivos pressupostos, é importante efetuar uma exploração dos resultados, ou seja, a verificação da existência de "outliers", seja via uma representação gráfica (fazendo um gráfico tipo "box-plot") ou efetuando testes estatísticos apropriados para o efeito (por exemplo teste de Grubbs/Dixon). No entanto, é importante chamar a atenção para o fato que a remoção de um "outlier" deverá ser efetuada com base no conhecimento que o pesquisador tem dos resultados, assim um valor "outlier" deverá ser retirado apenas quando houver uma justificativa plausível para tal (por exemplo, uma alteração de algum parâmetro ambiental durante o teste) e não apenas porque a visualização gráfica ou os testes indicam a existência desses valores.

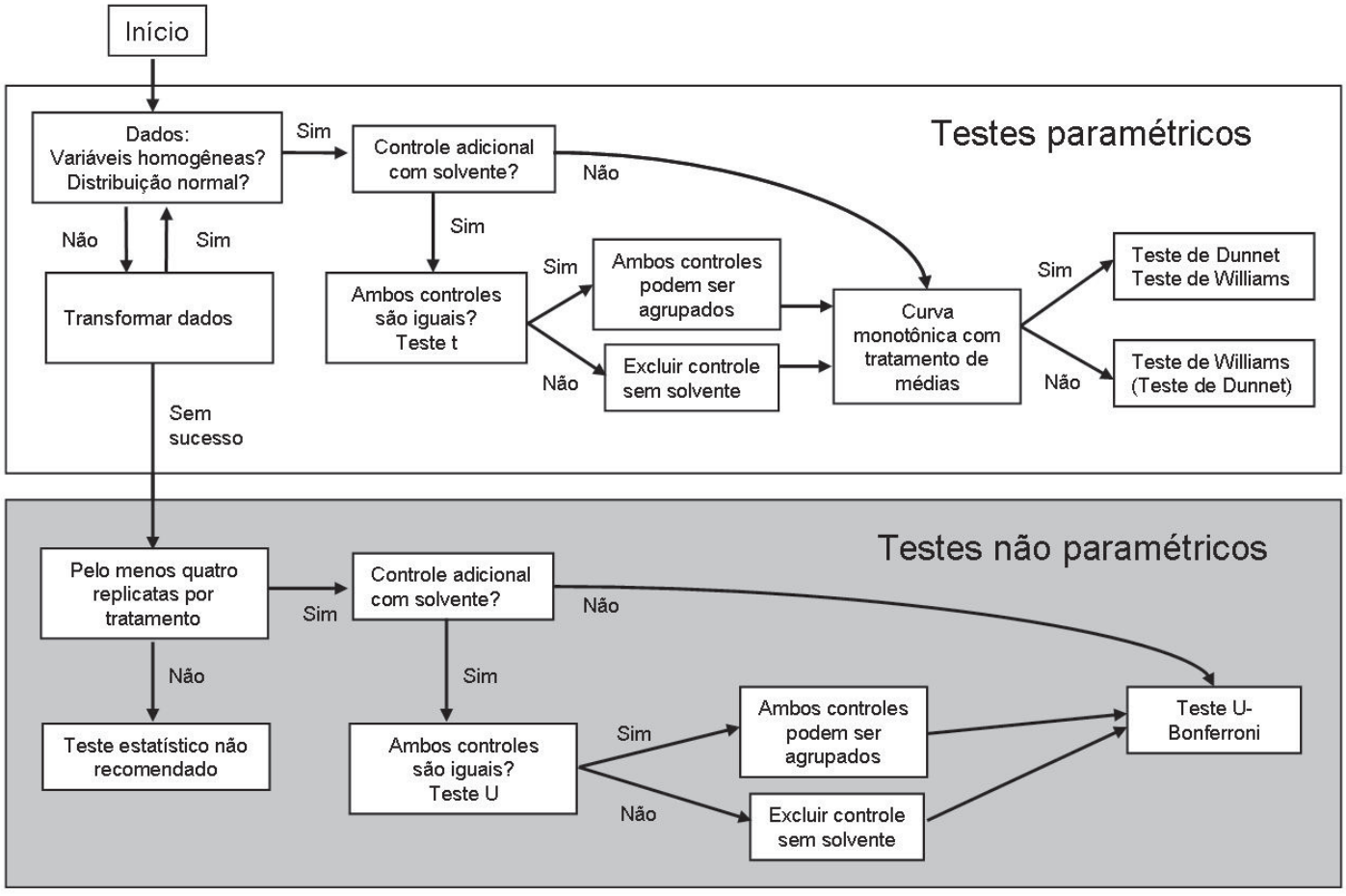


Figura 14.1. Fluxograma da avaliação estatística de dados para ensaios com desenho experimental para estratégia CENO (modificado de ISO, 2014).

Outro aspecto importante é adequar a análise de dados ao tipo de desenho experimental que foi utilizado (ver capítulo 10). Em ensaios de laboratório é usual utilizarem-se uma das duas estratégias em termos de desenho experimental: a estratégia CENO/CEO e a estratégia CEx. Na primeira o objetivo é determinar os respectivos parâmetros e o importante é ter diversas repetições em cada concentração/dose testada, já que o teste utiliza a Anova. Já na segunda, é mais relevante possuir um maior número de tratamentos (concentrações/doses) do que ter muitas repetições dentro de cada tratamento. Isto porque a derivação do CEx é efetuada via métodos de regressão e, nesse caso, é importante ter mais tratamentos para poder calcular intervalos de confiança menores dos valores de CEx derivados. Vale salientar que neste momento a estratégia CENO/CEO está caindo em desuso em quase todos os esquemas de avaliação de risco prospectiva, priveligiando-se a estratégia CEx. Esta alteração ocorre devido ao grau de incerteza em estabelecer valores reguladores com base num valor de CENO, pois este é completamente dependente das concentrações/doses testadas e da variabilidade intra-tratamento. No entanto, estudos efetuados com agrotóxicos apontam, no caso da maioria das substâncias testadas, o CENO corresponde aproximadamente ao CE10 (concentração/dose que afeta 10% da população).

14.2 Cálculos nos ensaios de letalidade

No caso dos ensaios de letalidade, o principal parâmetro a ser calculado é o CL50. Este poderá ser calculado por análise de Probit ou pelo método de Trimmed Spearman-Karber. No caso da análise de Probit esta poderá ser estimada com o software PriProbit (Sakuma, 1998) e, que pode ser obtido no seguinte website: http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11284.

Uma estimativa do CENO e CEO para a alteração de biomassa das minhocas durante o período da exposição também pode ser realizada mediante uma Análise de Variância.

14.3 Cálculos nos ensaios de reprodução

Nos ensaios de reprodução, os parâmetros estatísticos a serem calculados são o CENO e o CEO para o número de juvenis gerados, mortalidade dos adultos e, no caso dos ensaios com minhocas, para alterações na biomassa. A estimativa de um CEx (normalmente um CE50) para o número de juvenis é também requerida.

O CENO e o CEO são calculados com base numa Análise de Variância, cujos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias deverão ser avaliados utilizando, por exemplo, os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Todavia, caso haja necessidade de utilizar um teste não-paramétrico devido à violação de qualquer um dos dois pressupostos, o teste Kruskal-Wallis poderá ser utilizado.

A rejeição da hipótese nula da ANOVA indica a existência de diferenças significativas entre os tratamentos. Neste caso o CENO e o CEO são identificados utilizando um teste de comparações múltiplas (cada tratamento vs. o controle), como por exemplo o teste de Dunnet ou o teste de Williams. Neste caso, pretende-se comprovar a diminuição do valor médio do parâmetro devido aos tratamentos em relação ao controle (Ct). Assim, a hipótese nula destes testes de comparações múltiplas terá de ser H0: $Ct \leq TratamentoX$. Caso se tenha realizado uma ANOVA não paramétrica, os testes de comparações múltiplas deverão ser também não paramétricos, por exemplo o Bonferroni-U-test.

Os mesmos procedimentos devem ser aplicados quando se pretende comparar os efeitos observados num solo contaminado em relação a um solo de referência (numa análise de risco retrospectiva).

No cálculo do CEx, modelos de regressão linear ou não linear deverão ser utilizados. Diversos modelos são habitualmente utilizados, dependendo do padrão de resposta observado: modelo logístico, exponencial, Gompertz e hormético (ver Tabela 14.1). Quando se utiliza qualquer um dos modelos é conveniente atribuir diferentes "starting values" aos parâmetros a serem modelados, pois isso ajuda o processo de iteração e a capacidade do modelo em estimar parâ-

metros confiáveis. É importante realçar que se deve sempre reportar o intervalo de confiança a 95% do valor do CEx determinado. É importante ainda salientar que a avaliação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias só poderá ser efetuada "a posteriori" via a análise de resíduos. A normalidade poderá ser avaliada via a visualização de um gráfico tipo "Q-Q plot" e também via a representação dos resíduos em relação aos valores previstos. Esta representação gráfica serve também para avaliar a homogeneidade de variâncias dos resultados.

Tabela 14.1. Modelos não lineares mais utilizados (adaptado de Canada, 2005).

Modelo Logístico	Modelo: Y = a/(1+{[p / (1-p)] · [C/ECp]b})
	CE50: juvenis=(a/(1+(C/X)^b))
	CE20: juvenis=(a/(1+[0,25*(C/X)^b]))
Modelo com resposta hormética	Modelo: Y = (t · [1 + hC] /{1 + [(p + h ECp) / (1 – p)] · [C/ECp]b}
	CE50: juvenis=(t*(1+h*C))/(1+((0,5+h*C)/(1-0,5))*(C/X)^b)
	CE20: juvenis=(t*(1+h*C))/(1+((0,2+h*C)/(1-0,2))*(C/X)^b)
Modelo exponencial	Modelo: Y = a · e(([log(1-p)] / ECp) · C)+b
	CE50: juvenis=a*exp(((log(1-0,5))/X)*C)+b
	CE20: juvenis=a*exp(((log(1-0,2))/X)*C)+b
Modelo de Gompertz	Modelo: Y = a · e([log(1-p)] · [C/ECp]b)
	EC50: juvenis=a*exp((log(1-0,5))*(C/X)^b)
	EC20: juvenis=a*exp((log(1-0,2))*(C/X)^b)

Onde:
Y = valor do parâmetro medido (Exemplo: número de juvenis).
a = resposta no controle.
t = resposta no controle no modelo hormético.
e = base do logaritmo natural.
p = % inibição/100 (Exemplo: 0,50 para EC50).
C = concentração do solo teste.
X = CEx a calcular.
ECp = estimativa da concentração que causa uma determinada percentagem de efeito.
h = parâmetro hormético.
b = parâmetro de escala do modelo.

14.4 Cálculos nos ensaios de fuga

A percentagem de fuga é calculada conforme indicada na seção 13.10. O cálculo da concentração que origina uma percentagem de fuga (ACx) pode ser determinado pelo método de Probit, utilizando o software mencionado anteriormente.

Já o cálculo do CENO e CEO deverão ser derivados seguindo uma metodologia distinta. Neste caso, a existência de uma resposta de fuga significativa num determinado tratamento (concentração/dose do contaminante ou matriz contaminada), deverá ser avaliada mediante a utilização do teste exato de Fisher.

Uma resposta de fuga significativa é obtida quando o número de organismos no solo teste é significativamente menor que o número encontrado no solo controle. Assim, uma resposta de "não-fuga", ocorre quando o número de organismos no solo controle é menor ou igual ao número de indivíduos no solo teste.

O teste de Fisher baseia-se na comparação da resposta medida vs. resposta numa situação de "não-fuga" (resposta esperada). Nesta situação esperada, o número de indivíduos que ficam no solo teste corresponde a 50% do número total de indivíduos testados, ou seja, nenhum indivíduo evita o solo teste e foge para o solo controle. Neste caso, a hipótese nula (uma cauda) é que o número de indivíduos observados no solo teste é maior ou igual ao número de indivíduos esperados no solo teste, conforme exemplo abaixo na Tabela 14.2.

Tabela 14.2. Exemplo de uma tabela de análise do teste de Fisher para um teste de fuga em um determinado solo teste considerando cinco repetições com 10 organismos cada.

	Nº indivíduos que ficam no solo teste	Nº indivíduos que fogem do solo teste	Total
Esperados (resposta de não fuga)	25	0	25
Observados	5	20	25
Total	30	20	50

O tratamento correspondente à dose mais elevada onde esta resposta não foi significativa é considerado o CENO; já o CEO corresponde à concentração/dose mais baixa testada onde a resposta foi significativa.

No caso dos testes de controle duplo ("dual control test" - solo controle nos dois compartimentos) o teste de Fisher é utilizado para avaliar a distribuição homogênea dos organismos. Neste caso, a hipótese nula (duas caudas) é que o número de indivíduos observados no "solo teste" (selecionar um dos compartimentos como "solo teste") é igual ao número de organismos esperados no "solo teste" (ver Tabela 14.3). A rejeição desta H0 implica uma distribuição não homogênea dos indivíduos.

Tabela 14.3. Exemplo de uma tabela de análise do teste de Fisher para avaliação da homogeneidade dos organismos num teste de fuga (*dual control tests*) considerando cinco repetições com 10 organismos cada.

	Nº indivíduos no "solo teste"	Nº indivíduos no outro compartimento	Total
Esperados (distribuição homogênea)	25	25	50
Observados	23	27	50
Total	38	52	100

O mesmo procedimento deve ser utilizado para avaliar a significância da resposta de fuga a solos contaminados (avaliação retrospectiva). O teste de Fisher pode ser efetuado online no site http://www.langsrud.com/fisher.htm.

Referências

Canada. Environment Canada. Environmental Technology Centre. **Guidance document on statistical methods for environmental tocxicity tests**. Ottawa, 2005. 241 p. (Report EPS 1/RM/46).

ISO. International Organization for Standardization. **ISO-16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology and Zoology**, v. 3, p. 339-347, 1998.

Bioacumulação

15

Mara Mercedes de Andréa
Silvia Gonçalves Egler
Ricardo Gonçalves Cesar
Juan Colonese
Jörg Römbke

As informações sobre o ensaio de bioacumulação de compostos ou elementos em minhocas foram baseadas nas normas E1676 (ASTM, 2004) – *Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the enchytraeid potworm Enchytraeus albidus* e OECD 317 – *OECD Guidelines for the testing of chemicals: Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes* (OECD 2010). O livro de Cesar et al. (2014) também descreve os conceitos e métodos para estudos de bioacumulação com oligoquetas.

15.1 Princípio do ensaio de bioacumulação

Agrotóxicos, metais, drogas de uso veterinário, derivados de petróleo e outros poluentes decorrentes de atividades antrópicas que atingem ou são descartados no solo podem persistir sob a forma de resíduos ou produtos tóxicos da sua degradação, afetando os organismos edáficos. Entre os possíveis efeitos ecotoxicológicos cita-se a bioacumulação dos compostos xenobióticos nos organismos do solo, que é o acúmulo do poluente nos organismos em relação à quantidade presente no solo. Quanto mais baixo for o nível trófico do organismo contaminado ou bioacumulador e quanto mais ele servir de alimento para os níveis superiores da cadeia trófica, maior é sua relevância ecológica, porque maior é a probabilidade de contaminação das teias e cadeias alimentares de que ele fizer parte (Andréa, 2008, 2010; Kelsey et al., 2011). Os organismos que se alimentam de solo ou no solo, como os oligoquetas são, portanto, os que ficam mais expostos às substâncias ligadas ao solo.

O perigo de toxicidade é função da biodisponibilidade das substâncias ou elementos químicos para os organismos, mas espécies que se alimentam de solo são ainda mais expostas aos perigos da contaminação, não somente por resíduos de compostos recém-aplicados ou descartados no solo, mas também por resíduos persistentes e aqueles que reagem com partículas minerais ou da matéria orgânica e ali se tornam resíduos-ligados (Gevao et al., 2001; OECD, 2010; Fragoulis et al., 2011). Estes resíduos-ligados não são facilmente biodisponíveis porque não estão presentes na solução do solo, mas podem ser ingeridos juntamente com as partículas do solo (Andréa; Wiendl, 1995b).

Além de todas as reconhecidas atividades benéficas dos oligoquetas no ecossistema edáfico, eles também são alimento de outros invertebrados e de vertebrados predadores e, por isso, eles influenciam a biodisponibilidade de poluentes para toda a teia alimentar da qual eles fazem parte (OECD, 2010) e servem como rota de transferência e biomagnificação dos contaminantes ao longo dessas teias alimentares (Andréa, 2010; Bartlett et al., 2010). Como as minhocas são de fácil manipulação experimental e, principalmente as das espécies *E. fetida* e *E. andrei* são de fácil manutenção, elas se tornaram ferramenta padrão em pesquisa ecológica sobre a importância e sobre as ligações entre a biota da superfície e a biota subterrânea do solo (Eijsackers, 1998; Andréa, 2010; Bartlett et al., 2010).

Estudos com minhocas, entre outros invertebrados de solo, atingem os objetivos da ecotoxicologia terrestre que, de acordo com Van Gestel (2012), tem como meta a compreensão dos efeitos em longo prazo de substâncias químicas e outros fatores de estresse sobre os ecossistemas edáficos, visando proteger seu funcionamento e sua estrutura. São estudos de prognóstico sobre o risco de substâncias químicas para o ecossistema, que podem ser avaliados a partir de testes de toxicidade a determinadas espécies, como indicadores, expostos à(s) substância(s) em testes padrões conduzidos em condições controladas de laboratório (Van Gestel, 2012). O prognóstico efetuado a partir de organismos bioindicadores é importante porque, como as diferentes espécies se relacionam na natureza, esses bioindicadores fornecem informações sobre o risco potencial da contaminação de outras espécies da flora e da fauna, incluindo a população humana.

Entretanto, para relacionar mudanças fisiológicas ou de comportamento dos organismos com a contaminação do ambiente é necessário se certificar da presença do poluente. Bioensaios podem ser montados com amostras de locais contaminados e o componente biológico deve ser analisado juntamente com análises químicas das amostras da área em estudo. Essas análises químicas têm que ser feitas por técnicas e métodos precisos e padronizados, sem interferência no parâmetro estudado (Velki et al., 2012), de tal forma que não restem dúvidas sobre as verdadeiras causas das mudanças. Os métodos de extração e de análise do contaminante necessitam de mão de obra e equipamentos especializados e devem ser conduzidos em condições de laboratório bastante específicas (Andréa, 2010).

Diretrizes internacionais sobre bioacumulação de substâncias químicas em oligoquetas terrestres foram elaboradas e propostas somente em 2004 (ASTM, 2004) com atualização em 2010 (OECD, 2010), para possível adoção como ensaio ecotoxicológico com vistas ao registro de substâncias para comercialização (OECD, 2010). A norma 317 (OECD, 2010) foi baseada em dados de estudos conduzidos predominantemente em clima temperado e ressalta sua aplicabilidade somente para compostos orgânicos estáveis, compostos organo-metálicos estáveis, metais e outros elementos-traço.

O ensaio é caracterizado por duas fases: de absorção (exposição das minhocas ao composto ou elemento para bioacumulação) e de eliminação (pós-expo-

sição para depuração), ambos com duração de 14 dias com enquitreídeos e de 21 a 28 dias com minhocas (ASTM, 2004; OECD, 2010).

Amostragens periódicas com retirada de organismos, substrato-teste e controles devem ser realizadas de forma a se obter dados suficientes para elaboração de uma curva e uma taxa constante de bioacumulação, de tal forma que se atinjam condições de equilíbrio no solo que permitam calcular o fator da cinética de bioacumulação. Essas condições também devem permitir uma análise estatística dos resultados e cálculos dos coeficientes de correlação, coeficientes de determinação, do erro padrão e limite de confiança.

Com minhocas, indica-se de seis a oito amostragens em cada fase: respectivamente após 0, 1, 4, 7, 10, 14, 17 e 21 dias de contato com o(s) solo(s) tratado(s), e após 0 (de 4 a 6 h), 1, 4, 7, 10, 14, 17 e 21 dias da transferência para o(s) solo(s) não tratado(s). Nos solos controle as amostragens são realizadas no início e fim da fase de absorção e início e fim da de eliminação. Cesar et al. (2010), avaliando a incorporação de metais por oligoquetas fizeram amostragens na etapa de bioacumulação aos 4, 7, 14, 21, e 28 dias e na de depuração aos 7, 14, 21 e 28 dias após a transferência para meio não tratado. Vampré et al. (2010) e Sousa (2010) utilizaram menores proporções de quantidade de solo por minhoca e menor número de organismos em estudos com ^{14}C-agrotóxicos, por causa da grande sensibilidade e do limite de detecção bastante baixo da tecnologia radiométrica.

O preparo do solo deve começar seis dias antes do início do ensaio com diferentes substâncias poluentes e três semanas antes do início do ensaio com metais, por meio de umedecimento, respectivamente, a 40-60% e 35-45% da capacidade máxima de retenção de água (CRMA) (ASTM, 2004; OECD, 2010) com água deionizada, destilada ou de osmose reversa. O pH dos solos naturais não deve ser ajustado (ASTM, 2004) e, no solo artificial deve ser ajustado a 6,0 ± 0,5 (OECD, 2010).

De acordo com ASTM (2004), o ensaio é conduzido em iluminação constante e temperatura controlada (22 ± 2 °C), mas a norma 317 da OECD (2010) indica ciclos controlados de 16/8 horas de luz/escuro, sendo preferivelmente de 400 a 800 lux, temperatura de 20 ± 2 °C. Nesta última norma o tratamento do solo com a substância-teste deve ser feito quatro dias (ou três semanas quando se estudam metais) antes da colocação dos animais. Essas condições devem ser monitoradas constantemente durante o ensaio.

A substância-teste utilizada nos ensaios tem que ser descrita de modo amplo: nome químico (de acordo com o Union of Pure and Applied Chemistry (Iupac)); fórmula estrutural, número de registro no Chemical Abstracts Service (CAS); grau de pureza; características e requisitos de armazenamento; precauções de segurança; métodos de análise e seus limites de detecção no solo e nos organismos. Também devem ser conhecidas algumas de suas propriedades, tais como: solubilidade em água; coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}); coeficiente de partição solo-água (K_{oc}); pressão de vapor; degradabilidade (no solo e na água, por exemplo); metabólitos conhecidos. Como se trata de veri-

ficar a possível bioacumulação de compostos ou elementos em quantidades que podem ser muito pequenas, os resíduos recuperados tanto no solo como nos organismos devem ser expressos em porcentagem do composto originalmente aplicado.

Após pesquisa de diferentes métodos de extração e combustão que têm que ser comprovadamente eficientes, o principal pré-requisito é a utilização de métodos de análise e de detecção extremamente sensíveis e precisos. A maioria dos estudos com agrotóxicos que deram origem a esta diretriz utilizaram moléculas radiomarcadas com [^{14}C] e detecção por espectrometria de cintilação em líquido (sigla em inglês LSC) ou, de acordo com as características químicas da molécula, por cromatografia gasosa (sigla em inglês GC) ou líquida (sigla em inglês HPLC), cujos equipamentos podem ser acoplados a detectores de espectrometria de massa (sigla em inglês MS), para quantificação e identificação dos compostos. Os metais são analisados também após pesquisa de métodos específicos de digestão e extração de amostras e detectados por espectrometria de emissão atômica (sigla em inglês ICP-AES), absorção atômica com indução de plasma acoplado a espectrômetro de massa (sigla em inglês ICP-MS), absorção atômica com indução de plasma em espectrômetro de emissão atômica (sigla em inglês ICP-AES), espectrômetro de absorção atômica de chama ou de forno de grafite, etc. Quando se utilizam compostos marcados com [^{14}C] deve-se levar em conta não somente o treinamento e a licença de manuseio de compostos radioativos, mas também se deve assegurar que a radiomarcação da molécula garanta que metabólitos tóxicos contenham radiocarbono, para sua detecção após degradação do composto originalmente aplicado ao solo.

Verifica-se então que, para uma resposta clara, além da toxicidade da substância-teste para as espécies usadas no teste, como por exemplo, efeito de uma concentração (EC) ou a concentração letal (CL) num determinado tempo ou fase de absorção, o ensaio deve ser precedido de descrição completa das características dos solos e das condições dos organismos; do composto ou elemento pesquisado; dos métodos de extração e sua eficiência, assim como dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do composto ou dos elementos pelas técnicas analíticas utilizadas. A eficiência dos métodos de extração e de análise, assim como os limites de detecção das técnicas devem ser previamente pesquisados, de forma a não deixar dúvida sobre sua boa recuperação e sobre a garantia da precisão dos resultados nos diferentes compartimentos (solos e organismos). Sempre que possível deve-se estudar e quantificar também os metabólitos formados tanto nos solos como nos organismos e aí, tornam-se essenciais análises tanto por cintilação líquida, quanto por métodos cromatográficos. Verifica-se que a atividade específica (Bq mol^{-1}) do ^{14}C-composto deve ser grande o suficiente para garantir a detecção de quantidades pequenas de composto e também de metabólitos absorvidos ou formados pelos organismos e no solo.

Em ensaios com solos naturais, estes devem ser caracterizados e ter, pelo menos, os seguintes parâmetros determinados: pH, porcentagem de matéria orgânica, capacidade de troca catiônica, nitrogênio total, distribuição do

tamanho de partículas (porcentagem de areia, silte e argila), e porcentagem do conteúdo de água (ASTM, 2004; OECD, 2010).

15.2 Organismos-teste

15.2.1 *E. andrei* ou *E. fetida*

As espécies são as mesmas descritas para o ensaio de letalidade. A lavagem dos organismos deve ser realizada com água deionizada, destilada ou de osmose reversa.

15.2.2 Espécies de Enchytraeidae

As espécies propostas são *Enchytraeus albidus* e *E. luxuriosus* (OECD, 2010). A lavagem dos organismos deve ser realizada com água reconstituída, sugerida em ISO 16387 (ISO, 2004). Esta norma indica a formulação da água reconstituída como a utilizada para cultivo e ensaio com *Daphnia magna*, encontrada no Anexo 3 de OECD 202/04 (OECD, 2004a) (Tabela 15.1).

Tabela 15.1. Composição da Água Reconstituída, conforme Anexo 3 da norma OECD 202/04 (OECD, 2004a), recomendada para lavagem de enquitreídeos.

Soluções estoque		Volume para 1 L (mL/L)
Substância	Quantidade (g/L)	
Cloreto de cálcio dihidratado $CaCl_2$. 2 H_2O	11,76	25
Sulfato de magnésio $MgSO_4$. 7 H_2O	4,93	25
Bicarbonato de sódio $NaHCO_3$	2,59	25
Cloreto de potássio KCl	0,23	25

Nota: Água utilizada nas soluções de pureza adequada (por exemplo, deionizada, destilada ou de osmose reversa). Parâmetros obtidos após mistura das soluções: condutividade < 10 µS/cm; pH = 6-9; dureza = 140-250 mg $CaCO_3$/L e O.D ≥ 3 mg/L.

15.3 Recipientes-teste e equipamentos

Balança analítica com capacidade para faixa de 25 mg a 200 g e precisão de pelo menos 1,0 mg; Balanças com capacidade para 2 kg e precisão de pelo menos 1,0 g; Estereomicroscópio; Ambiente com temperatura controlável; Luxímetro; Deionizador de água, destilador ou osmose reversa; Peagâmetro; Recipientes-teste cilíndricos ou retangulares de vidro ou aço inoxidável (para agrotóxicos), polipropileno que comportem uma camada de 4 cm a 5 cm de solo para minhocas, ou de 2 cm a 3 cm para enquitreídeos; Sacos plásticos, para homogeneização de solo; Termômetro com registro de temperatura e de umidade; Câmaras de temperatura e luminosidade controladas;

Agitador mecânico; Extratores Soxhlet; Espectrômetro de cintilação em líquido (LSC), ou Cromatógrafo Gás-Líquido (GC) ou Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC), acoplados a Espectrômetro de Massa (MS); Espectrômetro de Emissão Atômica (ICP-AES); Estufa (mais que 150 °C) ou Balança Determinadora de Umidade; Absorção Atômica com Indução de Plasma acoplado a Espectrômetro de Massa (ICP-MS), ou Absorção Atômica com Indução de Plasma em Espectrômetro de Emissão Atômica (ICP-AES), ou Espectrômetro de Absorção Atômica de Chama ou de Forno de Grafite; Bandejas; Papel toalha; Parafilm; Peneiras; Placas de Petri; Filme plástico.

15.4 Preparo do conteúdo dos recipientes-testes

Os solos coletados no campo para serem usados nesses ensaios devem ser armazenados no laboratório pelo menor tempo possível, a aproximadamente 4 °C, e de tal forma que se garanta a troca de gases entre o solo e a atmosfera, para manter suas propriedades bioquímicas. O solo deve permitir a sobrevivência dos oligoquetas a serem usados como animais-modelo e também possibilitar sua reprodução durante o período de aclimatação e do ensaio, sem que nenhuma anormalidade morfológica ou comportamental seja detectada. Além disso, as minhocas devem escavá-lo em poucas horas (normalmente o fazem rapidamente), porque anomalias nesse comportamento podem indicar que as condições do ensaio não são as ideais ou as minhocas não estão saudáveis, e o ensaio deve ser repetido em outras condições.

Quando se trata de ensaio com solos naturais contaminados, não só a contaminação deve ser previamente determinada, como também algumas características desses solos naturais, tais como, pH, conteúdo de carbono orgânico, granulometria e a capacidade máxima de retenção de água (CMRA). Se o pH estiver fora da faixa do limite de tolerância do organismo-teste um lote com ajuste de pH na faixa de 5,5 a 7 deve ser testado juntamente com o lote onde este parâmetro não foi ajustado (ASTM, 2004). Os constituintes e características dos solos artificiais devem seguir as orientações da seção 7.1.

Em ensaios com substâncias teste é recomendada a obtenção prévia de dados sobre sua toxicidade. Recomenda-se também que o tratamento do substrato seja feito quatro dias antes da colocação dos animais ou três semanas em solo com metal. Sua incorporação no solo deve ser feita de tal forma que se assegure homogeneidade do tratamento e um ambiente onde as minhocas possam sobreviver, isto é, em ambiente úmido e sem resíduos de solventes. Mas, isto pode ser inadequado quando a substância for rapidamente degradada no solo, como ocorre com alguns agrotóxicos (por exemplo, Andréa et al., 2003).

Caso a substância seja muito pouco solúvel em água e em solventes orgânicos, pode-se adicioná-la em 2,0-2,5 g de areia quartzosa para cada recipiente-teste, homogeneizar e então, adicionar e homogeneizar no(s) solo(s) já umedecido(s). Nos casos em que foram utilizados diluentes diferentes de água, deve ser utili-

zado, além das amostras-controle sem tratamento, outro controle com a maior quantidade de solvente usada para tratamento.

15.5 Ensaio preliminar de bioacumulação

Devem-se seguir os protocolos realizados para o ensaio de letalidade (ver capítulo 11) para minhocas ou enquitreídeos.

15.6 Ensaio definitivo de bioacumulação

O tratamento deve ser feito primeiro com a dose de 1% da concentração letal a 50% dos organismos-teste- CL50 - e, pelo menos, até 10 vezes maior do que seu limite de detecção pelo método analítico utilizado (OECD, 2010).

A quantidade de organismos a ser retirada nas duas fases deve ser baseada em testes prévios que devem indicar a quantidade mínima de tecido animal para o limite de análise e detecção utilizado. Os espécimes devem ser selecionados pela presença de clitelo e peso individual entre 250 mg e 600 mg.

Se o meio de cultura dos oligoquetas for diferente do de ensaio, os animais devem ser aclimatados no solo-teste não tratado, por aproximadamente 24 horas a 72 horas antes de serem colocados nos recipientes do ensaio. As minhocas devem ser lavadas em água deionizada e ligeiramente secas, em peneira ou em papel-toalha úmido, antes de serem pesadas.

De acordo com OECD, 317 (2010), os recipientes com o tratamento devem conter 50 g de solo / minhoca e de 10 g a 20 g de solo / enquitreídeo. Devem-se utilizar triplicatas das amostras, grandes o suficiente para a retirada de amostras a cada tempo de amostragem (Figura 15.1). As triplicatas dos recipientes--controle devem conter o mesmo solo sem tratamento e com quantidade de organismos e substrato suficientes para amostragens no início e final da fase de absorção, e no início e final da fase de eliminação. Entre os solos artificiais, o chamado solo OECD é um substrato composto de 10%, ou como preconizado mais recentemente, 5% de esfagno de turfa (o conteúdo menor para simular a pior situação em termos de matéria orgânica), 20% de argila caulinita e 70% de areia quartzosa, na qual se adiciona carbonato de cálcio para ajustar o pH até 6,0 (OECD, 2004b; Van Gestel, 2012). Devido à dificuldade na obtenção do esfagno de turfa no Brasil, este material foi substituído por pó de casca de coco para a formação do Solo Artificial Tropical (SAT), como sugerido por Garcia (2004), nas mesmas proporções utilizadas no solo OECD (ver seção 7.1).

Em solos artificiais ou com baixo conteúdo de matéria orgânica o alimento deve ser incorporado no início e semanalmente durante o ensaio: 7 g de esterco (boi ou cavalo) seco e moído kg^{-1} solo para minhocas e de 2 g a 2,5 g de aveia moída kg^{-1} de solo para enquitreídeos. Durante o ensaio o alimento deve ser colocado

Fotos: Mara Mercedes de Andréa

Figura 15.1. Detalhe das minhocas se enterrando no solo (A) e sistemas completos, com solos e minhocas, em câmara de temperatura e luminosidade controladas (B).

sobre a superfície do solo ou ser incorporado manualmente na camada próxima à superfície. Qualquer alimento adicionado deve ser analisado quimicamente para determinação da concentração do contaminante testado.

Os recipientes-testes devem ser vedados com um filme-plástico contendo pequenos orifícios, de modo a impedir a fuga dos animais, mas que possibilite a troca de ar. Cada conjunto solo-organismo deve ter seu peso anotado e, uma vez por semana, deve ser repesado para adição de água deionizada em caso de perda de peso, para manutenção da umidade.

Para a quantificação dos contaminantes nos tecidos dos organismos-teste estes últimos devem ser deixados purgando o conteúdo intestinal antes de serem sacrificados para a realização das análises químicas. O purgamento é realizado, em geral, por 24 horas em ambiente restritivo e com alta umidade (por exemplo, com papel de filtro umedecido e tampa perfurada).

Se a estabilidade da substância teste for detectada a um tempo de coleta anterior às seis ou oito coletas pode-se diminuir a quantidade de amostragens do solo. Entretanto, deve-se analisar pelo menos três replicatas no início e no final da fase de absorção.

O pH e umidade das amostras e a temperatura da sala de teste devem ser medidos no início e no final das duas fases.

A norma OECD 317 (OECD, 2010) recomenda que o ensaio seja conduzido em condições de luz e temperatura controladas, isto é, 16 horas de luz (preferivelmente de 400 lux a 800 lux) e 20 ± 2 °C. Contudo, há trabalhos que descrevem o uso de luz constante (por exemplo, Van Gestel et al., 2011, Cesar et al., 2013) para criar condições que obriguem as minhocas a ficar no interior do solo, evitando a luz e maximizando seu contato com o solo tratado.

15.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de bioacumulação

Os requisitos e cronograma do ensaio de bioacumulação estão descritos na Tabela 15.2 e o resumo do cronograma para condução do ensaio de cinética de bioacumulação/eliminação de solo contaminado por minhocas ou enquitreídeos está descrito na Tabela 15.3.

Tabela 15.2. Resumo dos requisitos do ensaio de bioacumulação com minhocas.

Requisitos	Condição
Tipo de ensaio	Absorção e eliminação.
Referências	OECD 317 (OECD, 2010); ASTM E1676 (ASTM, 2004).
Duração	42 a 56 dias (ASTM E1676) (ASTM, 2004); ou, 28 (enquitreídeos) e 42 (minhocas) dias (OECD 317) (OECD, 2010).
Organismo-teste	*E. fetida* ou *E. andrei*: adultos, com clitelo e mais do que 2 meses de idade, com peso entre 250 mg e 600 mg. Enchytraeidae com aproximadamente 1 cm.
Alimentação (quando se usa solo com baixo conteúdo de Carbono orgânico)	No início e semanalmente durante o ensaio: 7 g de esterco (boi ou cavalo) seco e moído kg^{-1} solo para minhocas e de 2 g a 2,5 g de aveia moída kg^{-1} para enquitreídeos.
Substrato	Solo artificial ou solo natural.
Proporção de solo:organismo/ensaio	OECD 317 - 50 g solo/minhoca ou 10-20 g solo/enquitreídeo (OECD, 2010).
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, onde possam ser controladas temperatura e fotoperíodo.
Número mínimo de concentrações	Uma concentração, mais o controle
Número mínimo de replicatas por concentração-teste, ou amostra de solo	OECD 317 - no mínimo 3 replicatas de cada tratamento; 3 replicatas de controle (3 amostras retiradas por tempo de coleta). (OECD, 2010).
Número mínimo de organismos por replicata	A quantidade de tecido animal retirada em cada coleta tem que se basear em testes prévios que indicam a quantidade necessária para as análises químicas (ASTM E1676) (ASTM, 2004).
Temperatura	18 °C a 22 °C
Fotoperíodo	16 horas luz: 8 horas escuro ou luz contínua.
Intensidade de luz	De 400 a 800 lux.
Efeito observado	Sobrevivência, capacidade de escavação e determinação das concentrações no(s) solo(s) e nos organismos.
Expressão dos resultados	Fator de bioacumulação (FBA); cinética de absorção e eliminação (depuração) dos contaminantes.
Critérios de validade	No tratamento e no controle: (médias das replicatas) < 10% de mortalidade (minhocas) e < 20% (enquitreídeos). Perda de biomassa < 20%.

Tabela 15.3. Ensaio de cinética de bioacumulação/eliminação de solo contaminado [solo artificial ou natural tratados com solução de composto-teste] com as minhocas *E. andrei* e *E. fetida* ou os enquitreídeos *E. albidus* e *E. luxuriosus*.

Etapa	Dias	Atividade
Preparo do material	-11	- Determinação das CMRAs dos substratos [solos artificial ou natural ou natural contaminado] (ver seção 7.4). - Pesagem dos substratos em massa suficiente para o ensaio (para aclimatação de organismos e triplicatas para cada dia de amostragem nas fases de absorção, de solo artificial para a fase de eliminação).
	- 4	- Preparo da solução do composto-teste. [- Tratamento de solo artificial ou natural com o composto-teste, separando amostras para análises da quantidade aplicada nos solos tratados. - Aplicação da quantidade máxima de solvente utilizada no tratamento com o composto-teste, nas amostras controle].
	-3	- Umedecimento dos substratos (solo natural contaminado e solo artificial para o controle) das réplicas a serem usadas para a fase de absorção com água processada (ver seções 11.2.4 e 11.3.3)
	- 1	- Determinação do pH e da umidade dos substratos (seção 7.4 e 7.5). - Pesagem dos substratos; colocação nos recipientes-teste em número suficiente para a fase do ensaio. - Seleção dos organismos por peso e maturidade para aclimatação em solo sem o contaminante (ver seção 15.6). - Remoção de amostras do solo contaminado para análise da contaminação inicial. - Separar organismos para o ensaio e purgamento de alguns para análise química dos valores de "background" do contaminante (0 Dia de Absorção). - Adição de alimento se o substrato tiver baixo conteúdo de carbono orgânico total.
Montagem do ensaio	1	- Congelamento dos organismos para análise posterior. - Correção da umidade dos substratos, se necessário. - Colocação dos organismos nos recipientes-teste (ver seção 15.6) e pesagem das réplicas para reposição de umidade durante o ensaio.
Ensaio de absorção	2	- Observação do comportamento dos organismos. - Coleta de triplicatas do substrato-teste, do controle e de organismos para análise (1ª coleta) (ver seção 15.7). - Congelamento imediato do substrato-testes para análise posterior. - Pesagem e purgamento do conteúdo intestinal dos organismos.
	3	- Congelamento dos organismos para análise posterior. - Repetir o procedimento do dia 2 só com as amostras tratadas, sem coleta de organismos do controle (2ª coleta). - Congelamento imediato do substrato-testes para análise posterior. - Pesagem e purgamento do conteúdo intestinal dos organismos.

15.8 Validação do ensaio de bioacumulação

O ensaio só será considerado válido se a mortalidade não exceder a 10% (minhocas) ou 20% (enquitreídeos) do total de animais introduzidos durante todo o período do ensaio (absorção e eliminação) nos recipientes-testes e nos controles. Além disso, a média de perda de peso das minhocas, medida ao final da fase de absorção e da fase de eliminação, não deve ultrapassar 20% do peso inicial fresco do início de cada fase.

15.9 Cálculos dos fatores de bioacumulação e de bioacumulação solo-biota

Os resultados obtidos por meio dos métodos quantitativos de análise dos teores de contaminantes no tecido animal podem ser utilizados para se calcular:

i) Os fatores de bioacumulação (*FBA*).

ii) Cinética e modelagem das taxas de absorção e eliminação (depuração) do contaminante.

O Fator de Bioacumulação (*BAF*, em inglês, ou *FBA*) é baseado na soma do composto original e seus metabólitos presentes nos organismos e no solo ao final do estudo, e calculado pela fórmula:

$$BAF \text{ ou } FBA = \frac{C_{organismo}}{C_{solo}}$$

Onde:

BAF ou *FBA* = fator de bioacumulação.

$C_{organismo}$ = concentração do composto ou elemento e seus metabólitos nos organismos (µg g^{-1}).

C_{solo} = concentração do composto ou elemento e seus metabólitos no solo (µg g^{-1}).

A norma OECD 317 (OECD, 2010) também indica a possibilidade de se calcular um Fator de Bioacumulação Solo-Biota (FBSA), por meio da normalização da concentração da substância em relação ao conteúdo de lipídios dos organismos dividido pela concentração da substância em relação ao conteúdo de Carbono orgânico (CO) do solo:

$$BSAF = \frac{C_{solo}\,(\text{CO})}{C_{organismoh}\,(\text{lip})}$$

Onde:

C_{solo} = concentração da substância no solo por g de Carbono Orgânico (µg g^{-1}) e baseado no equivalente em massa seca.

$C_{organismo}$ = concentração da substância no organismo por g de lipídios (µg g^{-1}) e baseado em peso úmido dos animais.

FBSA = dado em g de CO g^{-1} de lipídios.

Esses cálculos normalizados permitem a comparação de resultados obtidos por diferentes ensaios de bioacumulação e também informam sobre a influência dos poluentes nos conteúdos de lipídios dos animais. Estas medidas reduzem a variabilidade nos resultados de substâncias com características fortemente lipofílicas como, por exemplo, muitos agrotóxicos organoclorados.

De acordo com Liu et al. (2005), valores de *FBA* menores do que a unidade indicam que os animais absorveram o contaminante, mas não bioacumularam, isto é, as taxas de excreção são maiores que as taxas de incorporação. A bioacumulação estaria caracterizada quando os valores de *FBA* fossem maiores ou iguais a uma unidade, isto é, ocorreu um balanço de massa positivo de contaminante em tecido animal.

15.10 Cálculos dos parâmetros de absorção e eliminação, e da cinética do fator de bioacumulação

Para obtenção da cinética de bioacumulação e das taxas constantes de absorção (k_s) e de eliminação (depuração) (k_e) do contaminante, os dados analíticos [teores de contaminante em tecido de minhoca ou enquitreídeo e no(s) solo(s)] são ajustados para modelos computacionais que levam em conta parâmetros não lineares, conforme as equações 1 e 2. Essas equações permitem elaborar prognósticos acerca da incorporação e eliminação potencial de contaminantes pelo metabolismo dos animais, podendo funcionar como um indicador da cinética dos mecanismos de biodisponibilidade (Van Straalen et al., 2005; OECD, 2010).

Quando o estado de equilíbrio é alcançado durante a fase de absorção utilizam-se as seguintes equações:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s \left(1 - e^{-ket}\right) \rightarrow 0 < t < t_c \qquad \text{(Equação 1 - fase de bioacumulação)}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s \left(e^{-ket(t-t_c)} - e^{-ket}\right) \rightarrow t > t_c \qquad \text{(Equação 2 - fase de depuração)}$$

Onde:

C_a = concentração da substância nos organismos [g kg^{-1} peso seco ou úmido].

k_s = constante de absorção nos tecidos animais [g solo kg^{-1} de tecido de minhoca e enquitreídeos d^{-1}].

C_s = concentração da substância no solo [g kg^{-1} peso seco ou úmido].

k_e = constante de eliminação [d^{-1}].

t_c = tempo ao final da etapa de bioacumulação.

De acordo com a norma OECD 317 (OECD, 2010), caso a concentração inicial (C0) de contaminante nos organismos exceda a zero (ocorre principalmente com metais), o valor detectado deve ser adicionado ao valor de C_a. Esses modelos podem ser adaptados de acordo com a complexidade do comportamento da substância-teste ao longo do ensaio, como por exemplo, pela diminuição da concentração da substância-teste ao longo da etapa de bioacumulação (ocorre, por exemplo, com contaminantes que apresentam decaimento radioativo, substância muito voláteis, etc.).

Referências

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1676-97**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken, 2004.

ANDRÉA, M. M. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. [S.l.]: Infobibos, 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/artigos/2008_4/bioindicadores/index.htm>. 2008. Acesso em: 15 fev. 2013.

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, n. 2, p. 95-107, 2010.

ANDRÉA, M. M.; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L.T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1329-1335, 2003. DOI: 10.1590/S0100-204X2003001100012.

ANDRÉA, M. M.; WIENDL, F. M. Formation and biorelease of bound residues of pesticides in two Brazilian soils. I. [14C]-lindane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 687-694, 1995a.

ANDRÉA, M. M.; WIENDL, F. M. Formation and biorelease of bound residues of pesticides in two Brazilian soils. II. [14C]-parathion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 695-700, 1995b.

BARTLETT, M. D.; BRIONES, M. J. I.; NEILSON, R.; SCHMIDT, O.; SPURGEON, D.; CREAMER, R. E. A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p. 67-73, 2010. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2009.11.006.

CESAR, R. G.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E. D.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. **(Eco)toxicologia de metais em solos**: conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental. Rio de Janeiro: CETEM, 2014. 100 p. (Série tecnologia ambiental, 1).

CESAR, R. G.; COELHO, M. B.; ALVARO, T. T.; COLONESE, J. P.; CASTILHOS, Z. C.; EGLER, S. G.; BIDONE, E. D.; POLIVANOV, H.; ALEXANDRE, N. Z. Terrestrial disposal of coal mining residues: acid drainage, acute ecotoxicity and bioavailability of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 17-22, 2013. DOI: 10.5132/eec.2013.02.003.

EIJSACKERS, H. Earthworms in environmental research: still a promising tool. In: EDWARDS, C.A. (Ed.). **Earthworm ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 295-323.

FERREIRA, R. C.; PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Bioavailability and influence of 14C-carbofuran on *Eisenia andrei* avoidance, growth and reproduction in treated natural tropical soils. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 50, n. 4, p. 266-274, 2005. DOI: 10.1080/03601234.2015.999599.

FRAGOULIS, G.; MERLI A, REEVES, G.; MEREGALLI, G.; STENBERG, K.; TANAKA, T.; CAPRI, E. Bayesian approach to assessing the uncertainty in estimating bioconcentration factors in earthworms: the example of quinoxyfen. **Pest Management Science**, v. 67, p. 656-664, 2011. DOI: 10.1002/ps.2105.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicology test methods for tropical regions. Gottingen: Cuvillier Verlag, 2004. 282 p. (Ecology and development series, 19).

GEVAO, B.; MORDAUNT, C.; SEMPLE, K.; PIEARCE, R.; JONES, K. C. Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 501-507, 2001.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction. Geneve, 2004.

KELSEY, J. W.; SLIZOVSKIY, I. B.; PETRIELLO, M. C.; BUTLER, K. L. Influence of plant–earthworm interactions on SOM chemistry and p,p'-DDE bioaccumulation. **Chemosphere**, v. 83, p. 897-902, 2011. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.056.

LIU, X.; CHENGXIAO, G.; ZHANG, S. Effects on earthworm activity on fertility and heavy metals bioavailability in sewage sludge. **Environment International**, v. 31, p. 874-879, 2005. DOI: 10.1016/j.envint.2005.05.033.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. ***Daphnia* sp., acute immobilization test**. Paris, 2004b. 12 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 202).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)**. Paris, 2004a. (OECD. Guideline for the testing of chemicals, 222).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes**. Paris, 2010. (OECD. Guideline for testing chemicals, 317).

SOUSA, A. P. A. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo.

VAMPRÉ, T. M.; FUCCILLO, R.; ANDRÉA, M. M. Oligoqueta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 59-66, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000100006.

VAN GESTEL, C. A. M.; ORTIZ, M. D.; BORGMAN, E.; VERWEIJ, R. A. The bioaccumulation of molybdenum in the earthworm *Eisenia andrei*: influence of soil properties and ageing. **Chemosphere**, v. 82, p. 1614-1619, 2011. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.11.047.

VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, v. 176, p. 275-296, 2012.

VAN STRAALEN, N. M.; DONKER, M. H.; VIJVER, M. G.; VAN GESTEL, C. A. M. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 409-417, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.01.019.

VELKI, M.; STEPIĆ, S.; LONČARIĆ, Ž.; HACKENBERGER, B. K. Effects of electroshocking and allyl isothiocyanate on biomarkers of the earthworm species *Eisenia andrei* - Possible side-effects of non-destructive extraction methods. **European Journal of Soil Biology**, v. 51, p. 15-21, 2012. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2012.03.009.

Descarte de substratos e organismos

16

Silvia Gonçalves Egler
Ricardo Gonçalves Cesar
Juan Pereira Colonese
Klaus Dieter Sautter
Marie Luise Carolina Bartz

Os substratos (solos-testes, solos-referência ou solos artificiais) contaminados utilizados nos ensaios devem ser classificados de acordo com as diretrizes da NBR 10.004 (ABNT, 2004), embalados e identificados, com a indicação do(s) tipo(s) de contaminante(s) presente(s), data do descarte e tipo de solo (artificial e/ou natural). Em seguida, devem ser entregues à seção de tratamento de resíduos da instituição ou para empresas especializadas, para o correto tratamento e destinação final, conforme requerido pela Lei 12.305, que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos (Brasil, 2010).

Para o descarte dos oligoquetas e enquitreídeos sobreviventes nos ensaios, recomenda-se: (i) congelamento; (ii) congelamento seguido de autoclavagem; (iii) congelamento seguido de liofilização; (iv) fixação em formol 5% ou etanol 70%. Após estes procedimentos os organismos podem ser descartados junto com o substrato. A fixação dos animais, especialmente as minhocas, além da simplicidade e custo, tem a vantagem de evitar o mau-cheiro decorrente da deterioração dos tecidos mortos. Recomenda-se evitar o descarte de animais sobreviventes no meio ambiente, principalmente quando as espécies utilizadas nos ensaios não são naturais do Brasil. Também não se recomenda a reutilização dos animais em ensaios ou em culturas, ainda que tenham sido utilizados como controle.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10.004**: resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, 2004. 71 p.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 de agosto de 2010.

Métodos para ensaios ecotoxicológicos em níveis hierárquicos avançados: abordagens de semi-campo e campo

17

Jorg Römbke
José Paulo Sousa

17.1 Introdução

Os estudos ecotoxicológicos podem ser classificados em três níveis experimentais (Figura 17.1):

Ilustração Wellington Cavalcanti

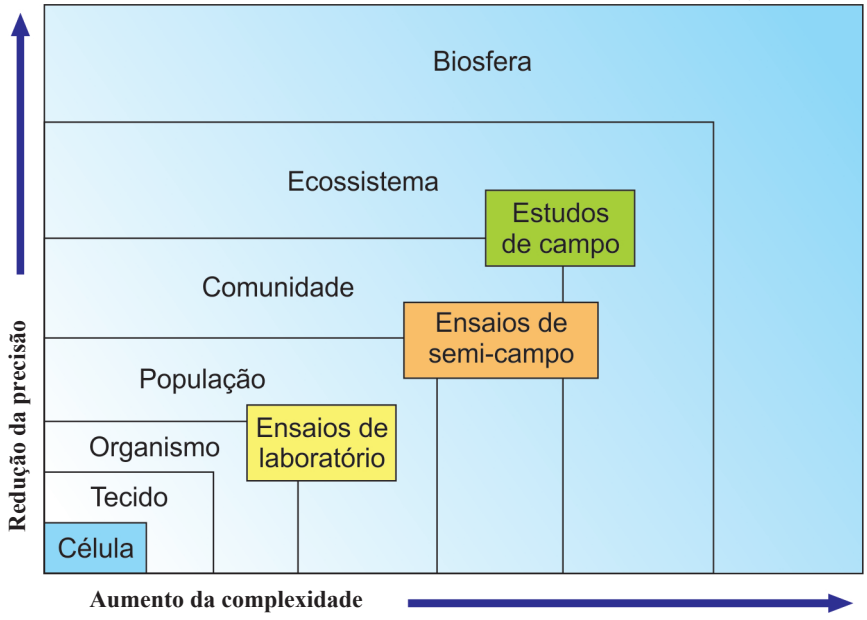


Figura 17.1. Níveis dos ensaios ecotoxicológicos (ensaios de laboratório, ensaios de semi-campo e de campo) em relação aos diferentes níveis de organização biológica.

1. **Ensaios de laboratório** onde o impacto de uma substância é estudado em condições controladas (tanto as formas de exposição quanto as variáveis ambientais). Porém, geralmente estes ensaios são considerados pouco realistas (por exemplo, a substância é aplicada a um substrato artificial), de curta duração (alguns dias até dois meses) e direcionados a poucas espécies-padrão as quais foram selecionadas principalmente pela praticidade.
2. **Estudos experimentais de campo** que, de acordo com Liess et al. (2005), são experimentos que analisam o impacto de uma substância aplicada sob condições controladas. Tais estudos são conduzidos em ambiente natural, dentro do contexto agrícola, frequentemente focando um grupo de organismos, em particular as minhocas. Nesse caso, as "condições controladas" se referem apenas à aplicação da substância, e não às variáveis ambientais.

3. **Ensaios de semi-campo**, definidos como sistemas reprodutíveis controlados, que tentam simular os processos e as interações entre componentes em uma parte do ambiente terrestre, sejam em escala laboratorial (em pequena escala), no campo, ou em escala intermediária (laboratório-campo).

Os ensaios em níveis hierárquicos superiores (*higher-tier methods*) são projetados de modo a combinar as vantagens dos ensaios de laboratório (por exemplo, padronização e condições controladas) com as vantagens de estudos de campo (variabilidade natural, interações complexas), ao mesmo tempo evitando desvantagens que cada um destes métodos tem individualmente, como o uso de uma única espécie e a necessidade de muita mão de obra, respectivamente. Em síntese, esses ensaios são direcionados ao estudo dos níveis de organização das populações e comunidades biológicas e, para tanto, englobam uma ampla gama de abordagens metodológicas (Figura 17.1).

O presente capítulo é uma versão resumida de partes do livro de Schäffer et al. (2010), também de autoria dos autores e escrito em inglês, onde poderão encontrar informações mais detalhadas e ilustrações dos ensaios em níveis hierárquicos superiores. Outras sugestões de leitura são Kuperman et al. (2002) sobre ensaios em níveis hierárquicos superiores e Scholz-Starke et al. (2017) que trazem uma revisão sobre estudos multiespécies na avaliação de risco ambiental para agrotóxicos e também Römbke et al. (2017) que discutem o uso de enquitreídeos em estudos de laboratório e em níveis hierárquicos superiores.

17.2 Abordagem de semi-campo

17.2.1 Classificação dos métodos existentes

Esse capítulo apresenta uma visão geral dos métodos disponíveis, como eles podem ser classificados e como podem ser avaliados, seguindo critérios que, basicamente, não diferem daqueles aplicados a outros métodos ecotoxicológicos. A utilização de métodos de semi-campo tem por objetivo aumentar o realismo ecológico nas metodologias de avaliação de risco. Primeiramente, Odum (1984) descreveu mesocosmos como “sistemas limitados, parcialmente permeáveis aos seus arredores”, e com isso ofereceu a definição mais básica de uma abordagem de semi-campo. Depois ele propôs o uso desse método para pesquisas ecológicas e ecotoxicológicas que, historicamente basearam-se em abordagens desenvolvidas para as questões ecológicas (por exemplo, Verhoef, 1996; Fraser; Keddy, 1997). Contudo, em meados dos anos 1980, um Modelo de Ecossistemas Terrestres (TME, em inglês) foi proposto para ensaios eco-

toxicológicos (Van Voris et al., 1985; Sheppard, 1997). Estes sistemas podem gerar melhores dados de efeito para avaliar ensaios com uma única espécie, além de ajudarem a medir as funções do ecossistema em condições controladas. Eles também podem ser utilizados para determinar efeitos indiretos, bem como sinergísticos ou compensatórios, de substâncias químicas em nível de ecossistema e permitem uma melhoria significativa na pesquisa do destino de contaminantes no ecossistema terrestre.

Para agrupar os ensaios de semi-campo, o seguinte critério dicotômico tem sido utilizado (Morgan; Knacker, 1994; Römbke; Moltmann, 1996):

1. Integridade do solo: O solo natural foi modificado ou não?

   ➞ Colunas intactas de solo versus solo modificado/"montado" (modified/assembled soil) por peneiramento e/ou defaunação (sobre defaunação ver seção 7.6).

2. Origem dos organismos: Foram utilizados organismos nativos, ou foram adicionados indivíduos de espécies selecionadas (por exemplo, uma espécie referência)? Na abordagem mista, a fauna natural é "enriquecida", ou suplementada, com espécies criadas em laboratório (com objetivo de simular os níveis tróficos ou adicionar características ainda ausentes).

   ➞ Comunidade natural versus indivíduos adicionados.

3. Condições climáticas: O estudo foi conduzido sob condições controladas ou não?

   ➞ Situação de campo versus cenário controlado.

4. Integridade de sistema/grau de isolamento: O sistema do teste está conectado com o ambiente, isto é, (i) é possível ocorrer uma mudança da substância teste ou não (importante para substâncias radiomarcadas) e (ii) é possível ocorrer uma mudança na biota, isto é, a recuperação dos parâmetros da comunidade é estritamente intrínseca ou não? Os sistemas podem ser fechados e mantidos isolados de trocas gasosas com tampas plásticas. A imigração de animais maiores é prevenida por tecido de gaze de diferentes tamanhos de malha.

   ➞ Sistemas abertos versus sistemas fechados.

5. Tamanho: Qual o tamanho do sistema-teste? Não é possível uma avaliação dicotômica.

É difícil classificar todos os potenciais sistemas de testes de semi-campo em categorias, mas a seguinte tipologia é proposta (Tabela 17.1) baseando-se nos critérios a, b e c descritos acima.

Neste capítulo apenas os sistemas de semi-campo pertencentes aos tipos A e B serão considerados, uma vez que até o momento nenhum estudo do grupo C foi realizado com oligoquetas.

Tabela 17.1. Tipologia de sistemas classificatórios de ensaios ecotoxicológicos de semi-campo.

A	Sistemas Montados (*Assembled Soil Systems*):	Unidades artificialmente montadas, com adição de organismos (sozinhos ou com remanescentes da comunidade natural).
	A1	Condições ambientais controladas.
	A2	Condições de campo.
B	Modelo de Ecossistemas Terrestres (TMEs):	Colunas intactas de solo com comunidades naturais.
	B1	Condições ambientais controladas.
	B2	Condições de campo.
C	Compartimentos em Campo (*Field Enclosures*):	Solo não perturbado, prevenção da imigração de espécies por barreiras.
	C1	Comunidades naturais.
	C2	Organismos adicionados.

17.2.2 Apresentação dos métodos de semi-campo

A maioria dos trabalhos que utilizam métodos de ensaios de semi-campo para o ambiente terrestre enfoca sistemas montados (*Assembled Soil Systems*) (Grupo A), o segundo mais comum são os TMEs (Grupo B) e poucos usam os compartimentos em campo (*Field Enclosures*) (Grupo C). O único com padronização são os TMEs. As características das diferentes abordagens de semi-campo, em relação aos testes com espécie única e estudos em campo completos, estão resumidas na Tabela 17.2.

Tabela 17.2. Critérios de categorização de métodos de ensaios ecotoxicológicos terrestres.

Critério	Sistema		
	Grupo A	**Grupo B**	**Grupo C**
	Sistemas Montados (*Assembled systems*)	**Modelo de Ecossistemas Terrestres (TMEs)**	**Compartimentos em campo (*Field enclosures*)**
Integridade do solo	Peneirado	Intacto	Intacto
Composição de espécies do teste	Cadeia alimentar típica	Comunidade natural	Comunidade natural
Origem dos organismos-testes	Culturas de laboratório	Local de origem	Local de origem e culturas de laboratório
Integridade do sistema	Aberto ou fechado	Aberto ou fechado	Aberto
Controle ambiental	No interior ou ao ar livre	No interior ou ao ar livre	Ao ar livre
Nivel hierárquico da abordagem	Nível superior	Nível superior	Nível superior

Grupo A1: Sistemas montados em condições de laboratório

Estes são sistemas relativamente pequenos e frequentemente chamados de testes gnotobióticos (Metcalf et al., 1971; Gile, 1983; Van Wensem et al., 1991; Morgan; Knacker, 1994; Fernandez et al., 2004; Boleas et al., 2005; Pernin et al., 2006; Scott-Fordsmand et al., 2008; Chelinho et al., 2010; Domene et al., 2010). Assume-se que todos os grupos de organismos do sistema estão sob controle e são bem conhecidos para o experimento (gnostos (gr.) = conhecido). Um exemplo desse grupo de sistemas é o teste de Microcosmos Integrados

de Solos (ISM) (Tabela 17.3; Figura 17.2), também conhecido como "abordagem de Ohio" (Burrows; Edwards, 2002, 2004). Contudo, na realidade, a comunidade microbiana e de nematóides são parte da comunidade original que continua viva mesmo no solo peneirado.

Tabela 17.3. Principais características do ensaio de Microcosmos Integrados de Solos (ISM) como um exemplo do grupo de semi-campo A1.

Nome:	Ensaio de Microcosmos Integrados de Solos ISM (*Integrated Soil Microcosms*)
Diretriz/Literatura:	Burrows; Edwards (2002; 2004)
Princípio:	Testar organismos de origem natural, bem como aqueles adicionados, em solo peneirado; Possibilidade de avaliar os lixiviados.
Espécies:	Comunidades microbianas, de nematóides e de microartrópodes (parcialmente) naturais do solo; adição de plantas e invertebrados (por exemplo, minhocas).
Substrato:	Solo de campo peneirado (principalmente de áreas agrícolas).
Duração:	Geralmente entre 21-28 dias.
Parâmetro:	Ampla variedade de destinos e parâmetros de efeitos.
Experiência:	Até o momento, pesticidas e explosivos.

Nota: Para melhorar o regime de umidade, bem como a coleta dos lixiviados, pode-se aplicar uma tensão na base de cada coluna de solo (30 kPa - 35 kPa), mimetizando as condições de campo (Checkai et al., 1993).

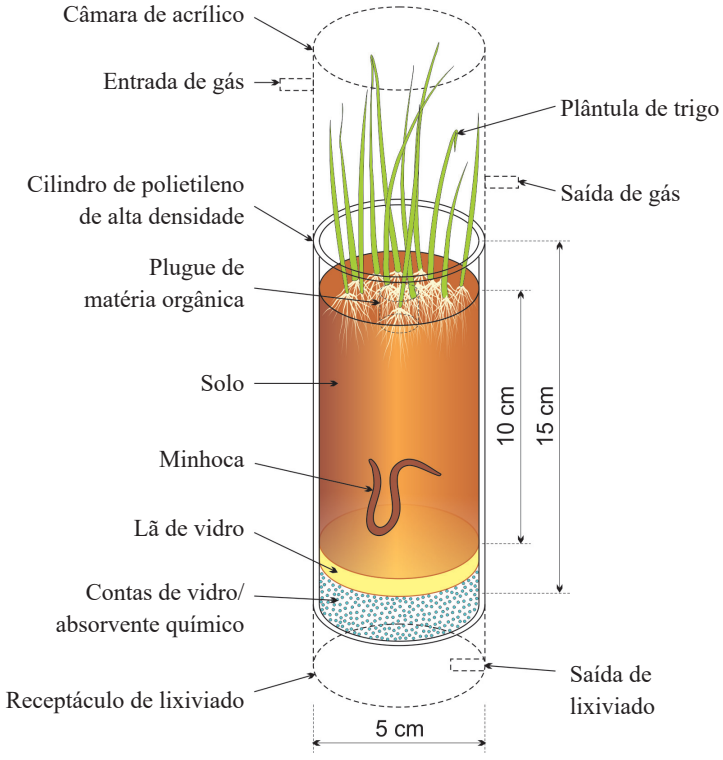


Figura 17.2. Visão esquemática do ensaio de Microcosmos Integrados de Solos (ISM) (modificado de Kuperman et al., 2002). Ilustração: Wellington Cavalcanti

Grupo A2: Sistemas modificados em condições de campo

Visto que esse sistema é raramente utilizado (por exemplo, Løkke, 1995; De Vaufleury et al., 2007), nenhum exemplo será apresentado em detalhe aqui.

Grupo B1: Colunas de solo intactas com comunidades naturais (TMEs) em condições de laboratório

O exemplo mais importante desse grupo é o Modelo de Ecossistemas Terrestres, desenvolvido por Van Voris et al. (1985). Este é o único método de semi-campo padronizado até o momento (ASTM, 1993; Umweltbundesamt, 1994; Environmental Protection Agency, 1996) (Tabela 17.4, Figuras 17.3 e 17.4). O fungicida carbendazim, além de outros agrotóxicos, bem como um produto farmacêutico veterinário têm sido estudados com TMEs na Europa

Tabela 17.4. Principais características dos Modelos de Ecossistemas Terrestres (TMEs) como exemplos de ensaios de semi-campo do grupo B1.

Nome	Modelo de Ecossistemas Terrestres (TME).
Diretriz/Literatura	Schaeffer et al. (2010).
Princípio	Interação das propriedades do solo com as comunidades naturais de microorganismos, animais e plantas.
Espécies	Comunidade natural de organismos de solo.
Substrato	Solos não perturbados provenientes de áreas de campo.
Duração	Geralmente, cerca de 16 semanas.
Parâmetro	Ampla variedade de destinos e parâmetros de efeitos.
Experiência	Em crescimento: por exemplo, com fungicidas, solos contaminados ou medicamentos em dejetos; há um estudo realizado nos trópicos (Förster et al., 2007).

Foto: Ana Paula Maccari

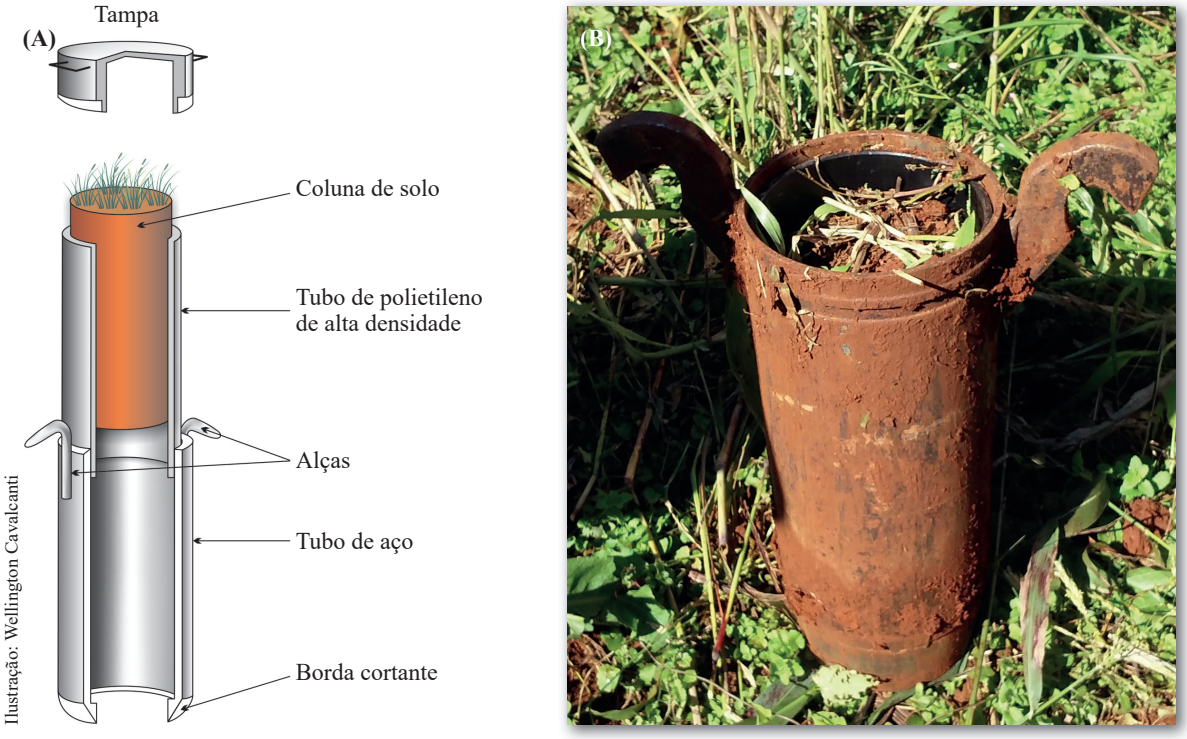


Figura 17.3. (A) Corte transversal de um Modelo de Ecossistema Terrestre (TME) e extrator da coluna intacta de solo (Figura modificada de Th. Knacker). (B) Coluna de solo para TME recém extraída do Laboratório de Ecologia do Solo da Udesc/CAV.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

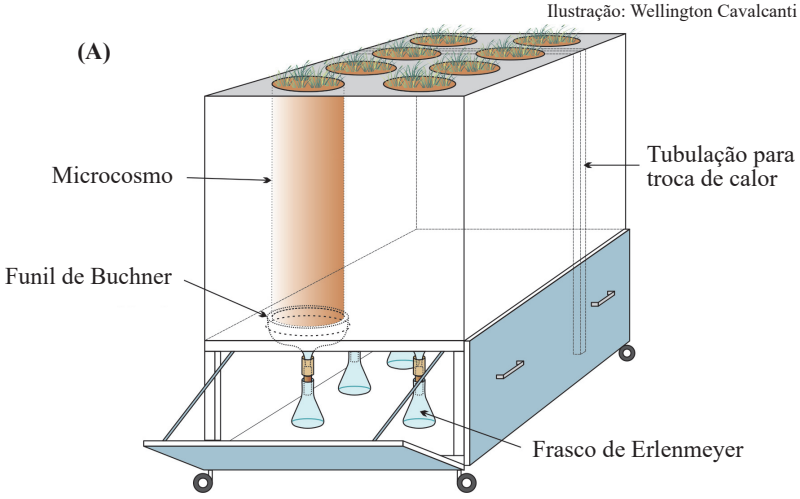


Foto: Ana Paula Maccari

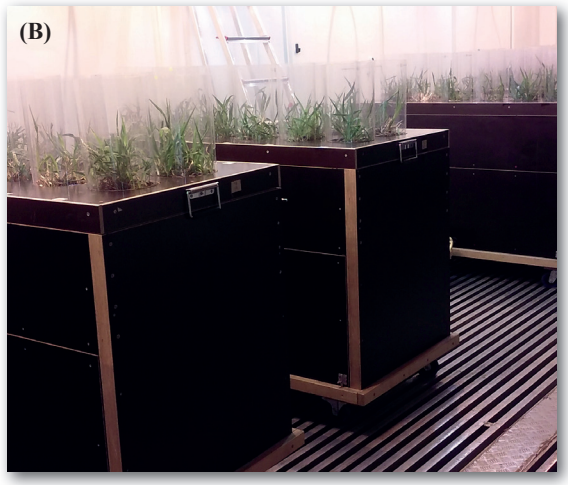


Figura 17.4. (A) Ilustração da cabine climatizada onde os TMEs são inseridos durante o ensaio. Em detalhe, os funis para coleta de lixiviados na porção inferior da cabine (Figura modificada de Thomas Knacker). (B) Experimento de TME no Laboratório de Ecologia do Solo da Udesc/CAV.

(Knacker et al., 2004; Förster et al., 2004) e no Brasil (Förster et al., 2006). No Brasil, o Laboratório de Ecologia do Solo da Udesc/CAV e Udesc/CEO realizam experimentos desse tipo para estudar o efeito de dejetos animais e agrotóxicos (Figura 17.4) (Segat, 2016; Maccari, 2018). As interações entre estresse químico e os pesticidas sobre a comunidade de organismos do solo podem ser estudadas usando esse método. Uma visão global dos efeitos dos pesticidas no contexto de semi-campo e campo, sobre organismos de solo (principalmente, mas não somente: minhocas), é apresentada em Jänsch et al. (2006). Informações mais detalhadas sobre os efeitos do carbendazim sobre as minhocas e enquitreídeos podem ser encontrados nos estudos de Römbke et al. (2004) e Moser et al. (2007), que mostraram alta sensibilidade desses dois oligoquetas a esse fungicida, nos ensaios de TMEs. Os TMEs já foram utilizados na avaliação de risco específico de áreas contaminadas (Kools et al., 2009).

Grupo B2: Colunas intactas de solo com comunidades naturais (TMEs) em condições de campo

Colunas intactas de solo (similares às anteriores, do Grupo B1) têm sido utilizadas em condições de campo, contudo, estas são consideravelmente maiores (até 47 cm de diâmetro, 40 cm de altura, 100 kg de solo de pastagem) do que aquelas mantidas em condições de laboratório. Neste caso, as colunas são armazenadas ao ar livre, em instalações que permitem controlar a umidade mediante irrigação ou de proteção da chuva (Tabela 17.5, Figuras 17.5 e 17.6). Demonstrou-se que a dinâmica populacional da maioria das espécies dominantes segue as flutuações naturais ao longo dos anos (Scholz-Starke et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, nenhum exemplo do Grupo C será apresentado, pois nunca foram utilizados com oligoquetas.

Tabela 17.5. Principais caraterísticas dos Modelos de Ecossistemas Terrestres (TMEs) como exemplos de ensaio de semi-campo do grupo B2.

Nome	Modelo de Ecossistemas Terrestres (TME)
Diretriz/ Literatura	Schäeffer et al. (2010)
Princípio	Dinâmica natural das comunidades originais do solo, coletadas de uma pastagem não perturbada
Espécies	Comunidade natural de organismos de solo
Substrato	Solos de campos não perturbados
Duração	Estabilidade comprovada de até um ano
Parâmetro	Estrutura das comunidades de Collembola, Oribatida, Enchytraeidae, Nematoda, biomassa vegetal; avaliações relacionadas aos destinos das substâncias também podem ser incluídas
Experiência	Crescente experiência, principalmente com compostos inseticidas (e alguns fungicidas)

Foto: Bernard Theißen

Figura 17.5. A área de superfície de um TME (47 cm de diâmetro) permite amostragem sequencial de até 19 sub-amostras de colunas de solo para extração de enquitreídeos ou micro-artrópodes e várias pequenas colunas de solo.

Ilustração: Wellington Cavalcanti

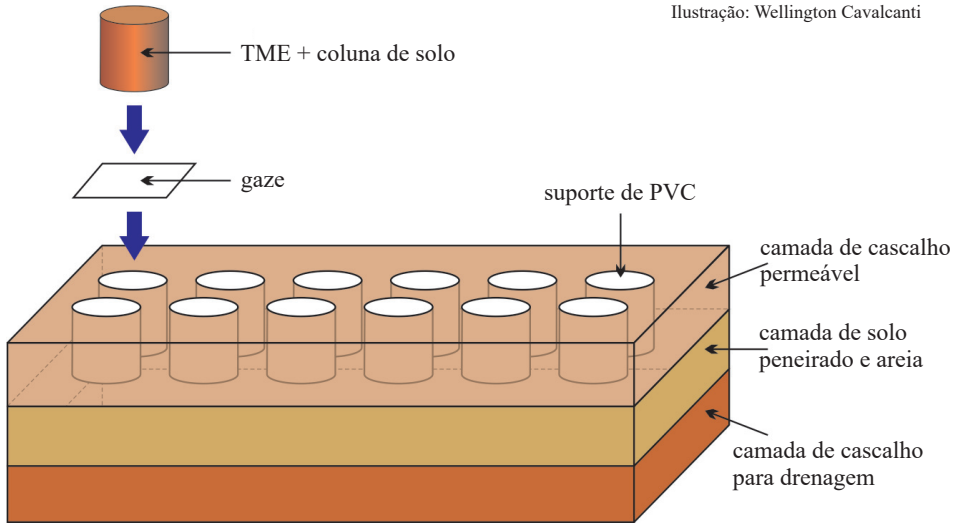


Figura 17.6. Instalação experimental ao ar livre (baseada em desenho de A. Toschki).

17.2.3 Avaliação de métodos de semi-campo

Para avaliar a viabilidade dos ensaios de semi-campo como sistemas de nível hierárquico superior (higher tier), no contexto de avaliação de risco de pesticidas, dois grupos de critérios foram usados considerando aspectos da ecologia e desempenho (Römbke et al., 1996). As seguintes compilações refletem o produto dessa discussão.

Critério ecológico

Relevância: o sistema deve incluir espécies importantes (isto é, engenheiros do ecossistema, espécies chave, espécies sensíveis) ou, em caso de sistemas de ensaios com múltiplas espécies, a composição de espécies deve representar a comunidade do habitat de interesse, tais como comunidades biológicas de áreas abertas, que são típicas para o cenário agrícola.

Parâmetros: número total, cobrindo estrutura e função.

Flexibilidade: adequados para diferentes cenários de exposição, diferentes tipos de solo e diferentes culturas agrícolas.

Sensibilidade: sensíveis a produtos químicos, mas resistentes em relação a outros fatores; o sistema deve reagir a um intervalo relevante de doses; o sistema deve conter espécies sensíveis.

Critério de desempenho

1. **Viabilidade**: boa relação custo-benefício entre recursos (custos, tempo, mão de obra) e resultados.
2. **Reprodutibilidade e repetibilidade**: robustez estatística, isto é, baixa variabilidade dos parâmetros escolhidos.
3. **Experiência**: quantidade de estudos realizados, incluindo as comparações de campo.
4. **Padronização**: diretriz / manual publicado disponível.

Como é quase impossível quantificar o grau de preenchimento desses critérios, optou-se por utilizar o conhecimento de especialistas para conduzir os processos de avaliação.

Analisando a Tabela 17.6, torna-se óbvio que não existe um único método para responder a todas as questões sobre as pesquisas ou avaliações de compostos

Tabela 17.6. Classificação simplificada dos três grupos de métodos utilizados em semi-campo [Sistemas modificados (*Assembled Systems*), Modelo de Ecossistemas Terrestres (Terrestrial Model Ecosystems), Caixas de campo (Field Enclosures)] de acordo com oito critérios ecológicos e de desempenho, como indicado pelas três cores e pelos comentários adicionais. European Union (EU); Umweltbundesamt (UBA), American Society for Testing and Materials (ASTM).

		Sistemas artificializados (*Assembled Systems*)	**Modelo de ecossistemas terrestres (*Treestrial model ecosystems*)**	**Compartimentos em campo (*Field enclosures*)**
Critérios ecológicos	Relevância	Cadeia alimentar artificial, mas sem competidores/ presas-predadores reais.	Comunidade natural.	Aumento da densidade de predadores.
	Parâmetros	Não há considerações sobre a comunidade.	Todos os parâmetros “conhecidos” podem ser medidos.	Todos os parâmetros “conhecidos” podem ser medidos.
	Felxibilidade	Nenhuma simulação de culturas é possível	Maioria dos solos, exceto os muito arenosos/densos.	Todos os solos
	Sensibilidade			
Critérios de desempenho	Viabilidade			
	Reprodutividade/ repetibilidade		Os resultados exatos não são reproduzíveis por causa da plasticidade natural	Vários estudos, mas poucas publicações.
	Experiência	Se abordagens similares estiverem combinadas	Ensaios multi-lab na Europa (*EU ringtest*)	
	Padronização	Nenhuma	Diretriz ASTM e proposta da UBA (*draft*) disponível	Diretriz IOBC disponível

Alto/bom/muitos Médio/razoável/numerosos Baixo/ruim/poucos

químicos em testes ecotoxicológicos de nível hierárquico superior (*Higher-tier tests*). Cada caso possui um método mais apropriado. Por exemplo, se o interesse está relacionado ao impacto sobre uma importante espécie predadora, o ensaio de compartimentos em campo (*field enclosures*) é a escolha mais adequada. Por outro lado, se o principal interesse está nos parâmetros estruturais e efeitos indiretos ao longo da cadeia alimentar, então os ensaios com TMEs talvez sejam os mais indicados.

De acordo com o resultado da revisão mencionada acima, é possível realizar as seguintes afirmações:

1. Várias opções metodológicas estão disponíveis para os ensaios de semi-campo, o que possibilita uma gama de ferramentas em potencial para avaliações de risco ambiental, em nível hierárquico superior (*higher tier*) dos pesticidas no solo. Até o momento, a melhor experiência foi obtida por meio do uso de TMEs, os quais têm demonstrado resultados confiáveis e reprodutíveis para os efeitos dos pesticidas sobre os organismos de solo.
2. A seleção dos métodos mais apropriados, em níveis hierárquicos superiores (*higher tier*) (laboratório, semi-campo e campo), depende das exigências da pesquisa ou avaliação de risco, e das questões regulatórias que precisam ser atendidas.
3. Quando um estudo de semi-campo é planejado, é importante considerar tanto a ecologia da espécie chave sob investigação, quanto o destino e comportamento da substância-teste.

17.3 Abordagens de campo: ensaios prospectivos de compostos químicos

Atualmente, o único ensaio de campo padronizado com invertebrados do solo é aquele realizado com minhocas ISO 11268-3, que utiliza a comunidade natural de minhocas (ISO, 2014; Tabela 17.7). Este método ISO é utilizado

Tabela 17.7. Principais características do ensaio com minhocas em campo, de acordo com os requerimentos da União Européia.

Nome	Efeitos de poluentes em minhocas em situações de campo.
Diretriz/Literatura	ISO 11268-3 (ISO, 1999); Kula et al. (2006)
Princípio	Testar as comunidades naturais de minhocas em uma parcela projetada sob condições agrícolas reais.
Espécies	Comunidade natural de minhocas, em particular Aporrectodea caliginosa, Lumbricus terrestris (como importantes representantes dos grupos ecológicos de endogéicos e anécicos em regiões temperadas).
Substrato	Áreas de campo, que podem ser tanto áreas agrícolas como pastagens ou pomares.
Duração	Até 12 meses, em alguns casos até mais (com pelo menos quatro datas de avaliação).
Parâmetro	Abundância, biomassa, composição de espécies de minhocas.
Experiência	Crescente experiência, principalmente, com inseticidas (e alguns fungicidas).
Experiência	Parte do processo de registro da União Européia; possivelmente útil também para outros invertebrados (por exemplo, enquitreídeos e colêmbolos).

apenas para avaliar agrotóxicos. Por este motivo, ele pode vir a ser recomendado pela OECD num futuro próximo. Por enquanto, entretanto, foram feitas recomendações para melhorar a viabilidade e praticidade desse teste (Kula et al., 2006). Na Comunidade Européia, o ensaio de campo com minhocas é regularmente requerido na avaliação de pesticidas que demostraram riscos em ensaios laboratoriais. No entanto, como o resultado da avaliação pode ser complexo (por exemplo, os efeitos podem variar consideravelmente entre os tempos das amostragens ou entre as espécies), algumas orientações adicionais são fornecidas pelas autoridades responsáveis por avaliar os resultados (De Jong et al., 2006). Atualmente, discute-se a viabilidade do mesmo modelo para a realização de ensaios com outros invertebrados (Römbke et al., 2009).

Resumidamente, parcelas de 10 m x 10 m são preparadas no local de estudo, onde geralmente são realizadas aplicações de um controle (água) e cinco tratamentos (= diferentes taxas de aplicações do pesticida testado), cada um com quatro repetições. Em cada repetição, quatro amostras são retiradas em cinco datas ao longo de um ano. Um número mínimo de minhocas (100 ind. m^{-2} no controle) deve ocorrer; caso contrário, o estudo não é considerado válido. Além disto, a aplicação de uma substância referência (até o momento, carbendazim na concentração de 6 kg a10 kg i.a. carbendazim/ha) deve mostrar diferença significativa em relação ao controle reduzindo a abundância ou biomassa em pelo menos 50% (ISO, 2014).

Nas Figuras 17.7 e 17.8 são apresentadas importantes atividades deste teste: a aplicação da substância teste (Figura 17.7) e a amostragem de minhocas pela combinação de extração manual e aplicações de formol (Figura 17.8). A seguir, resultados típicos de ensaios em diferentes níveis (laboratório e campo) são apresentados na forma de um estudo de caso.

Os resultados de três ensaios de toxicidade (toxicidade aguda e crônica em ensaios laboratoriais, bem como em um estudo de campo) e de um de ensaio de fuga, com minhocas, são comparados para demonstrar os prós e contras desses ensaios (Tabela 17.8). O trabalho é baseado numa tese de doutorado, cujos experimentos foram conduzidos no estado do Amazonas (Garcia, 2004). Entretanto, cabe salientar que resultados similares foram encontrados em

Tabela 17.8. Comparação dos resultados de ensaios padrão com minhocas, conduzidos em condições tropicais, com o fungicida carbendazim e o inseticida lambda-cialotrina, aplicados em solo artificial tropical e em condições de campo (modificado de ISO, 1999).

Ensaio com minhocas	Parâmetro	Carbendazim	Lambda-cialotrina
		mg i.a. kg^{-1} solo seco	
Laboratório: Agudo de mortalidade	CL50	> 1000	23.9
Laboratório: Crônico de reprodução	CENO	3.16	6.2
Laboratório: Fuga	CENO	< 1.0	< 0.32
Campo: Abundância da espécie nativa *A. amazonicus*	CEO	1.33	?

Foto: Jörg Römbke

Figura 17.7. Aplicação de um pesticida em uma parcela experimental, localizada em pastagens próxima à cidade de Frankfurt (Alemanha).

Fotos: Jörg Römbke

Figura 17.8. Amostragem de minhocas por extração manual (A), seguida de extração por formol (B), em área de pastagens próxima à cidade de Frankfurt (Alemanha).

estudos com pesticidas na Europa e nos Estados Unidos. Os dois pesticidas utilizados nesses ensaios (o inseticida lambda-cialotrina e o fungicida carbendazim) demonstraram menor toxicidade nos ensaios de mortalidade (14 d) do que nos ensaios de reprodução (56 d). No caso do carbendazim a diferença foi > 300 vezes, excepcionalmente alta, normalmente essa diferença é de aproximadamente 10 vezes. Curiosamente, nos ensaios de fuga, que tem curta duração (2 d), observou-se maior sensibilidade das minhocas do que nos ensaios de toxicidade crônica para ambos pesticidas. Embora este ensaio seja normalmente mais sensível que o de mortalidade, outros experimentos frequentemente mostram resultados de toxicidade na mesma ordem de grandeza que os ensaios de toxicidade crônica (Hund-Rinke et al., 2005). Nos dois ensaios de campo, realizados em um seringal abandonado, não foram observados efeitos destes dois pesticidas sobre a comunidade de minhocas em geral. Contudo, os indivíduos da espécie *Andiorrhinus amazonius* (Glossoscolecidae), abundantes no local, reagiram negativamente à presença de concentrações do carbendazim, com resultados comparáveis aos resultados dos ensaios de reprodução e fuga em laboratório. Nenhum efeito consistente sobre as minhocas foi observado em campo, na presença de lambda-cialotrina.

17.4 Abordagens de campo: monitoramento retrospectivo

O monitoramento de minhocas e/ou enquitreídeos poderia ser considerado como parte da Avaliação de Risco Ambiental de áreas contaminadas (retrospectiva). No entanto, até hoje essa abordagem raramente tem sido utilizada (por exemplo, Spurgeon; Hopkin, 1996; Römbke et al., 2002). Por outro lado, baseando-se nas boas experiências obtidas para os ecossistemas aquáticos, uma nova abordagem foi proposta: a Tríade. De acordo com Jensen e Mesman (2006) essa é uma abordagem robusta, originalmente desenvolvida para avaliar a qualidade de sedimentos (Long; Chapman, 1985). Porém, há menos experiências com este tipo de abordagem em sistemas terrestres (Rutgers et al., 2000; Semenzin et al., 2008).

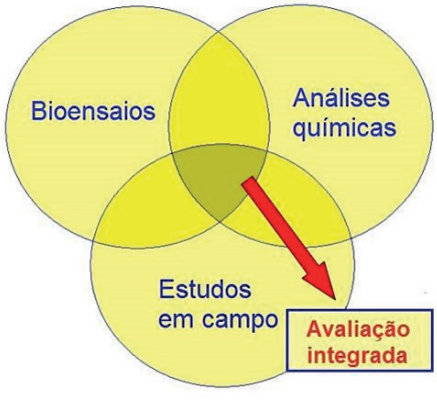


Figura 17.9. Representação esquemática da Tríade, mostrando o importante papel do monitoramento e da natureza integrada dessa abordagem.

A abordagem da Tríade consiste em três linhas de evidência (Lines of Evidence - LoE) (Figura 17.9): química, (eco)toxicológica e ecológica (Jensen; Mesman, 2006). Isto inclui um sistema de níveis hierárquicos, onde quanto maior o nível, mais o estudo se aproxima da situação real do local de estudo. No primeiro nível, a pesquisa é simples, ampla e genérica. A medida que se avança nos níveis, mais específicos e complexos são os ensaios e análises (Tabela 17.9).

Enquanto os resultados da análise química, ou de ensaios ecotoxicológicos, podem ser avaliados nos seus respectivos níveis (isto é, LoEs individuais), existem problemas específicos no caso dos estudos de monitoramento: em primeiro lugar, geralmente não existe um controle apropriado. Uma possível solução seria o monitoramento da ocorrência de espécies no local específico,

Tabela 17.9. Linhas de evodência e exemplos de ensaios e análises.

Linhas de evidência	Exemplos
Análises químicas	Concentração dos metais pesados no solo do local.
Ensaios ecotoxicológicos (bioensaios)	Ensaios de fuga ou de reprodução.
Estudos ecológicos em campo	Monitoramento da composição das comunidades de oligoquetas, índice de maturidade dos nematóides ou uma análise da cadeia alimentar.

em comparação à uma comunidade referência. No entanto, neste caso, deve-se conhecer a composição "normal" deste grupo no solo e/ou região. Para solos da Europa Central, estas informações são compiladas em bases de dados (por exemplo, na Holanda, França e Alemanha), mas, em outras regiões do mundo, informações básicas como as da comunidade de oligoquetas, ainda são bastante limitadas. No Brasil, o conhecimento sobre a biodiversidade de oligoquetas, em especial as minhocas, tem aumentado significativamente (Brown et al., 2013). Diretrizes padronizadas para a amostragem de oligoquetas e outros importantes grupos de invertebrados do solo (ISO, 2006a, 2006b; 2007a, 2007b) que facilitam esses monitoramentos já estão disponíveis. Combinando as três LoEs com as ferramentas elaboradas da avaliação integrada, a Tríade é a abordagem mais apropriada para uma avaliação de risco abrangente de áreas específicas.

17.5 Método funcional adequado para todos os níveis de ensaio (especialmente para aqueles em níveis hierárquicos superiores – *higher tiers*)

Os ensaios ecotoxicológicos são usados para obter informações sobre os efeitos de contaminantes no solo, e são propostos para complementar as análises químicas convencionais. Além dos ensaios com espécies únicas dos grupos de organismos importantes (por exemplo, minhocas, enquitreídeos ou colêmbolos), ensaios funcionais poderiam ser utilizados para avaliar a atividade e resposta de toda a comunidade de organismos do solo, e assim a função de habitat do solo. Eles são potencialmente úteis para a avaliação de efeitos de compostos químicos sobre o ecossistema terrestre (Paulus et al., 1999; Larink; Sommer, 2002; Filzek et al., 2004; Förster et al., 2004; André et al., 2009, Niemeyer et al., 2010), bem como para o monitoramento do solo em longo prazo (Van Gestel et al., 2003; Gongalsky et al., 2004; Hamel et al., 2007). Dados para esses propósitos devem ser obtidos por métodos padronizados, uma vez que eles podem servir de base para decisões futuras (por exemplo, quando uma dada área deve ser remediada ou não). Na realidade, a ausência de métodos padronizados é uma das principais razões pela qual os métodos funcionais têm sido tão raramente utilizados na avaliação de solos contaminados ou nas avaliações visando o monitoramento dos solos.

Figura 17.10. *Bait-laminas* preenchidos com isca antes da exposição no solo.

Figura 17.11. Bait-laminas inseridas no solo de um sistema de integração lavoura-pecuária-floresta no Cerrado. A imagem também mostra uma faca utilizada para facilitar a abertura das fendas em solos de difícil penetração.

O ensaio com *bait-laminas* é uma abordagem utilizada para medir a atividade alimentar de organismos de solo in situ (Von Törne, 1990; Kratz, 1998). *Bait-laminas* são pequenas tiras plásticas, perfuradas, com uma mistura de material orgânico natural ou artificial (= isca) no interior dos orifícios das tiras, as quais são inseridas no solo (Figuras 17.10 e 17.11) de maneira a expor o material orgânico aos organismos do solo (por exemplo, minhocas, Collembola, Diplopoda, Enchytraeidae). A fauna de solo é considerada a principal responsável pelo consumo do material da isca, enquanto que a microbiota consome <4% do material (Helling et al., 1998). Em princípio, o consumo da isca é avaliado pela contagem de orifícios vazios após um determinado período de exposição. O número de orifícios vazios (isto é, as áreas em que a isca foi removida), bem como a distribuição vertical do consumo, são avaliadas e assume-se que isso reflete a atividade alimentar dos animais edáficos. Este método está descrito na norma ISO 18311 (ISO, 2016).

A maior vantagem do método de *bait-lamina* é sua simplicidade (Römbke, 2014). Praticamente nenhum treinamento, técnica especial ou equipamentos são necessários. Ao contrário das avaliações de outros parâmetros funcionais, tais como a decomposição de matéria orgânica, determinada pelo método de sacos contendo serapilheira (*litterbags* em inglês) (Kula; Römbke, 1998; Knacker et al., 2003; OECD 2006) (Figura 17.12), o método *bait-lamina* não perturba o solo, precisa apenas de períodos curtos de exposição (de poucos dias a poucas semanas) e é rapidamente avaliado. As condições ambientais (por exemplo, clima e umidade do solo) podem vir a influenciar fortemente os resultados (Kratz; Pieper, 1999), portanto, o método deve ser aplicado, preferencialmente, para comparar a atividade biológica de parcelas próximas umas das outras (por exemplo, áreas contaminadas versus áreas referência). No caso de monitoramento de solos com *bait-lamina*, os valores de referência regionais e/ou específicos ainda precisam ser determinados.

Em regiões de clima temperado, a viabilidade do ensaio com *bait-lamina* para avaliar a influência do uso do solo, ou da presença de compostos químicos, na atividade alimentar das comunidades do solo já foi demonstrada várias vezes (Geissen; Brümmer, 1999, Paulus et al., 1999; Beyaert; Fox, 2008). Esse método tem sido cada vez mais utilizado nos trópicos (Geissen et al., 2001; Garcia, 2004; Römbke et al., 2006a, Niemeyer et al., 2010, 2018; Podgaiski et al., 2011; Musso et al., 2014; Silva et al., 2016).

Como complemento às medidas de respiração microbiana e decomposição da serapilheira do solo, a atividade alimentar é considerada importante por ser um dos vários parâmetros aplicáveis na avaliação do estado biológico do solo (Environment Agency, 2003; Bispo et al., 2009). O ensaio com *bait-lamina* foi utilizado com sucesso em dois estudos de caso nos quais foi realizada uma avaliação de risco ambiental de solos contaminados (Jensen; Mesman, 2006; Römbke et al., 2006b). Como resultado desses trabalhos, os autores recomendaram incluir o ensaio com *bait-lamina* no conjunto de ferramentas de avaliação de áreas com risco específico, em particular nas abordagens em Tríade. Além disso, tanto no contexto do Programa Europeu de Monitoramento de

Solos, quanto para os membros do EU Working Group, o método foi recomendado para esse propósito (Bispo et al., 2009) e tem sido utilizado em conjunto com outros indicadores (Stone et al., 2016). No Brasil, Niemeyer et al. (2007) também incluiu esse método na avaliação de risco ecológico em área contaminada por metais. Finalmente, também foi proposto o uso desse método como um parâmetro adicional em ensaios crônicos de longa duração em laboratório, em particular no ensaio de rerprodução de minhocas. O *bait-lamina* e/ou *litter-bag* podem ser usados em associação com experimentos de TME, como aquele realizado pelo Laboratório de Ecologia do Solo da UDESC/ CAV e Udesc/CEO (Figura 17.12).

Figura 17.12. *Bait-laminas* e *litterbag* expostas ao TME no Laboratório de Ecologia do Solo, Udesc/CAV.

Referências

ANDRÉ, A.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Bait–lamina assays as a tool to access the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2368-2377, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.03.023.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1197-12**: standard guide for conducting a terrestrial soil-core microcosm test. West Conshohocken, 1993.

BEYAERT, R. P.; FOX, C. A. Assessment of soil biological activity. In: CARTER M. R.; GREGORICH E. G. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 527-547.

BISPO, A.; CLUZEAU, D.; CREAMER, R.; DOMBOS, M.; GRAEFE, U.; KROGH, P. H.; SOUSA, J. P.; PERES, G.; RUTGERS, M.; WINDING, A., RÖMBKE, J. Indicators for monitoring soil biodiversity. **Integrated Environmental Assessment Management**, v. 5, p. 717-719, 2009. DOI: 10.1897/IEAM-2009-064.1.

BOLEAS, S.; ALONSO, C.; PRO, J.; FERNÁNDEZ, C.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS.3) and influence of manure co-addition. **Journal of Hazardous Material**, v. 122, p. 233-241, 2005. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.03.003.

BROWN, G. G.; CALLAHAM JR, M. A.; NIVA, C. C.; FEIJOO, A.; SAUTTER, K. D.; JAMES, S. W.; FRAGOSO, C.; PASINI, A.; SCHMELZ, R. M. Terrestrial oligochaete research in Latin America: the importance of the Latin American meetings on oligochaete ecology and taxonomy. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 2-12, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.006.

BURROWS, L. A.; EDWARDS, C. A. The use of integrated soil microcosms to predict effect of pesticides on soil ecosystems. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, n. 3-4, p. 245-249, 2002. DOI: 10.1016/S1164-5563(02)01153-6.

BURROWS, L. A.; EDWARDS, C. A. The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 13, n. 1-2, p. 143-161, 2004. DOI: 10.1023/B:ECTX.0000012411.14680.21.

CHECKAI, R.; WENTSEL, R.; PHILLIPS, T.; YON, R. L. Controlled environment soil-core microcosm unit for investigating fate, migration, and transformation of

chemicals in soils. **Journal of Soil Contamination**, v. 2, p. 229-243, 1993. DOI: 10.1080/15320389309383441.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A. F.; VIEGAS, C. A.; SOUSA, J. P. Cleanup of atrazine contaminated soils: ecotoxicological efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 568-578, 2010. DOI: 10.1007/s11368-009-0145-2.

DE JONG, F. M. W.; VAN BEELEN, P.; SMIT, C. E.; MONTFORTS, M. H. M. M. **Guidance for summarising earthworm field studies**: a guidance document of the Dutch Platform for the Assessment of Higher Tier Studies. 2006. Material de arquivo. (RIVM report 601506006/2006).

DE VAUFLEURY, A.; KRAMARZ, P. E.; BINET, P.; CORTET, J.; CAUL, S.; ANDERSEN, M. N., PLUMEY, E.; COEURDASSIER. M.; KROGH, P. H. Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms. **Pedobiologia**, v. 51, p. 185-194, 2007. DOI: 10.1016/j.pedobi.2007.04.005.

DOMENE, X.; CHELINHO, S.; SOUSA, J. P. Effects of nonylphenol on a soil community using microcosms. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 556-567, 2007. DOI: 10.1016/j.pedobi.2007.04.005.

ENVIRONMENT AGENCY. **Review of sublethal ecotoxicological tests for measuring harm in terrestrial ecosystems**. Bristol, 2002. 192 p. (R & D Technical Report P5-063/TR1).

FERNANDEZ, C.; ALONSO, C.; BABIN, M. M.; PRO, J.; CARBONELL, C.; TARAZONA, J. V. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems (MS.3). **Science of theTotal Environment**, v. 323, p. 63-69, 2004. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2003.10.015.

FILZEK, P. D. B.; SPURGEON, D. J.; BROLL, G.; SVENDSEN, C.; HANKARD, P. K.; PAREKH, N.; STUBBERUD, H. E.; WEEKS, J. M. Metal effects on soil invertebrate feeding: Measurements using the bait lamina method. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 807-816, 2004. DOI: 10.1007/s10646-003-4478-0.

FÖRSTER, B.; GARCIA, M. V. B.; FRANCIMARI, O.; RÖMBKE, J. Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazonia, Brazil). **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S171-S179, 2006. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.011.

FÖRSTER, B.; VAN GESTE, C. A. M.; KOOLHAAS, J. E. E.; NENTWIG, G.; RODRIGUES, J. M. L.; SOUSA, J. P.; JOES, S. E.; KNACKER, T. Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME): an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on organic matter breakdown and soil fauna feeding activity. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 129-141, 2004. DOI: 10.1023/B:ECTX.0000012410.99020.97.

FRASER, L. H.; KEDDY, P. The role of experimental microcosms in ecological research. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 478-481, 1997. DOI: 10.1016/S0169-5347(97)01220-2.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. Bonn: Zentrum für Entwicklungsforschung, Universität Bonn, 2004. 281 p. (Ecology and development series, 19).

GEISSEN, V.; BRÜMMER, G. W. Decomposition rates and feeding activities in deciduous forests in relation to soil chemical parameters after liming and fertilisation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 335-342, 1999. DOI: 10.1007/s003740050562.

GEISSEN, V.; JUNGE, B.; SKOWRONEK, A. Einfluss unterschiedlicher Nutzung auf bodenökologische Kennwerte tropischer Böden der Feuchtsavanne Benins. **Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft**, v. 96, n. 1, p. 329-330, 2001.

GILE, J. D. 2,4-D - Its distribution and effects in a ryegrass ecosystem. **Journal of Environmental Quality**, v. 12, p. 406-412, 1983.

GONGALSKY, K. B.; POKARZHEVSKII, A. D.; FILIMONOVA, Z. H. V.; SAVIN, F. A. Stratification and dynamics of bait lamina perforation in three forest soils along a north south gradient in Russian. **Applied Soil Ecology**, v. 25, p. 111-122, 2004. DOI: 10.1016/j.apsoil.2003.09.001.

HAMEL, C.; SCHELLENBERG, P. M.; HANSON, K.; WANG, H. Evaluation of the "bait lamina test" to access soil microfauna feeding activity in mixed grasslands. **Applied Soil Biology**, v. 36, p. 199-204, 2007. DOI: 10.1016/j.apsoil.2007.02.004.

HELLING, B.; PFEIF, G.; LARINK, O. A comparison of feeding activity of collembolan and enchytraeid in laboratory studies using the bait-lamina test. **Applied Soil Ecology**, v. 7, p. 202-212, 1998. DOI: 10.1016/S0929-1393(97)00065-6.

HUND-RINKE, K.; LINDERMANN, M.; SIMON, M. Experiences with novel approaches in Earthworm Testing Alternatives. **Journal of Soils & Sediments**, v. 5, p. 233-239, 2005. DOI: 10.1065/jss2005.06.142.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-3**: soil quality: effects of pollutants on earthworms: part 3: guidance on the determination of effects in field situations. Geneva, Switzerland, 1999.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-3**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 3: guidance on the determination of effects in field situations, Geneve, 2014.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 18311**: soil quality: method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms: bait-lamina test. Geneve, 2016.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 23611-1**: soil quality: sampling of soil invertebrates: part 1: hand-sorting and formalin extraction of earthworms. Geneve, 2006a.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 23611-2**: soil quality: sampling of soil invertebrates: part International 2: sampling and extraction of microarthropods (Collembola and Acarina). Geneve, 2006b.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 23611-3**: soil quality: sampling of soil invertebrates: part 3: sampling and soil extraction of enchytraeids. Geneve, 2007a.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 23611-4**: soil quality: sampling of soil invertebrates: part 4: sampling, extraction and identification of free-living stages of nematodes. Geneve, 2007a.

JÄNSCH, S.; FRAMPTON, G.K.; ROEMBKE, J.; VAN DEN BRINK, P. J.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: a review and comparison with laboratory toxicity data. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 2490-2501, 2006.

JENSEN, J.; MESMAN, M. **Ecological risk assessment of contaminated land**: decision support for site specific investigations. Bilthoven, 2006. 136 p. (RIVM report, 711701047).

KNACKER, T.; FÖRSTER, B.; RÖMBKE, J.; FRAMPTON, G. K. Assessing the effects of plant protection products on organic matter breakdown in arable fields: litter decomposition test systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1269-1287, 2003. DOI: 10.1016/S0038-0717(03)00219-0.

KNACKER, T.; VAN GESTEL, C. A. M.; JONES, S. E.; SOARES, A. M. V. M.; SCHALLNAß, H-J.; FÖRSTER, B.; EDWARDS, C. A. Ring-testing and field validation of a terrestrial model ecosystem (TME): an instrument for testing potentially harmful substances: conceptual approach and study design. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 5-23, 2004. DOI: 10.1023/B:ECTX.0000012402.38786.01.

KOOLS, S. A. E.; BOIVIN, M. E. Y.; VAN DER WURFF, A. W. G.; BERG, M. P.; VAN GESTEL, C. A. M., VAN STRAALEN, N. M. Assessment of structure and function in metal polluted grasslands using Terrestrial Model Ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 51-59, 2009. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.03.016.

KRATZ, W.; PIEPER, S. Der Beitrag des Köderstreifentests bei der Entwicklung von bodenbiologischen Bodengüteklassen nach dem Bundes-Bodenschutzgesetz. **Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft**, v. 91, n. 2, p. 654-657, 1999.

KRATZ, W. The bait lamina test: general aspects, applications and perspectives. **Environmental Science & Pollution Research**, v. 5, p. 94-96, 1998. DOI: 10.1007/BF02986394.

KULA, C.; HEIMBACH, F.; RIEPERT, F.; RÖMBKE, J. Technical recommendations for the update of the ISO Earthworm Field Test Guideline (ISO 11268-3). **Journal of Soils Sediment**, v. 6, p. 182-186, 2006. DOI: 10.1065/jss2006.06.167.

KULA, C.; RÖMBKE, J. Evaluation of soil ecotoxicity test with functional endpoints for risk assessment of plant protection products: State of the art. **Enviromental Science and Pollution Research**, v. 5, p. 94-96, 1998. DOI: 10.1007/BF02986376.

KUPERMAN, R.; KNACKER, T; CHECKAI, R.; EDWARDS, C. Multispecies and multiprocess assays to assess the effects of chemicals on contaminated sites. p. 45-60. In: Sunahara, G. I. et al. (Ed.). **Environmental analysis of contaminated sites**. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

LARINK, O.; SOMMER, R. Influence of coated seeds on soil organisms tested with Bait lamina. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p. 287-290, 2002. DOI: 10.1016/S1164-5563(02)01161-5.

LIESS, M.; BROWN, C.; DUQUESNE, S.; DOHMEN,P.; HART, A.; HEIMBACH, F.; KREUGER, J.; LAGADIC, L.; REINERT, W.; MAUND, S.; STRELOKE, M.; TARAZONA, J. (Ed.). **Effects of pesticides in the field (EPIF)**. Pensacola: SETAC Publ., 2005. 113 p.

LØKKE, H. Effects of pesticides on meso- and microfauna in soil. **Danish Environmental Protection Agency**, n. 8, 185 p., 1995.

LONG, E. R.; CHAPMAN, P. M. A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity, and infaunal community composition in Puget Sound. **Marine Pollution Bulletin**, v. 16, p. 405-415, 1985. DOI: 10.1016/0025-326X(85)90290-5.

MACCARI, A. P. **Avaliação ecotoxicológica de cama de aves em solos do estado de Santa Catarina**. 2018. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

METCALF, R. L.; SANGHA, G. K.; INDER, P. K. Model ecosystem for the evaluation of pesticide biodegradability and ecological magnification. **Environmental Science & Technology**, v. 5, p. 709-713, 1971. DOI: 10.1021/es60055a004.

MORGAN, E.; KNACKER T. The role of laboratory terrestrial model ecosystems in the testing of potentially harmful substances. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 213-233, 1994. DOI: 10.1007/BF00117989.

MOSER, T.; RÖMBKE, J.; SCHALLNASS, H-J.; VAN GESTEL, C. A. M. The use of the multivariate Principal Response Curve (PRC) for community level analysis: a case study on the effects of carbendazim on enchytraeids in Terrestrial Model Ecosystems (TME). **Ecotoxicology**, 16, 573-583, 2007. DOI: 10.1007/s10646-007-0169-6.

MUSSO, C.; MIRANDA, H. S.; SOARES, A. M.; LOUREIRO, S. Biological activity in Cerrado soils: evaluation of vegetation, fire and seasonality effects using the “bait-lamina test”. **Plant and Soil**, v. 383, p. 49-58, 2014. DOI: 10.1007/s11104-014-2233-3.

NIEMEYER, J. C.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Desenvolvimento de um esquema para avaliação de risco ecológico em ambientes tropicais: estudo de caso da contaminação por metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 263-267, 2007.

NIEMEYER, J. C.; DE SANTO, F. B.; GUERRA, N.; RICARDO FILHO, A. M.; PECH, T. M. Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. **Chemosphere**, v. 198, p. 154-160, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.127.

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, n. 8, p. 1557-1571, 2010. DOI: 10.1007/s11368-010-0255-x.

ODUM, E. The mesocosm. **BioScience**, v. 34, p. 558-562, 1984.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Guidance document on the breakdown of organic matter in litterbags**. Paris, 2006. (OECD. Series on testing and assessment, 56).

PAULUS, R.; RÖMBKE, J.; RUF, A.; BECK, L. A comparison of the litterbag-, minicontainer- and bait-lamina-methods in an ecotoxicological field experiment with diflubenzuron and btk. **Pedobiologia**, v. 43, p. 120-133, 1999.

PERNIN, C.; AMBROSI, J. P.; CORTET, J.; JOFFRE, R.; LE PETIT, J.; TABONE, E.; TORRE, F.; KROGH P. H. Effects of sewage sludge and copper enrichment on both soil mesofauna community and decomposition of oak leaves (*Quercus suber*) in a mesocosm. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 39-50, 2006. DOI: 10.1007/s00374-005-0059-0.

PODGAISKI, L. R.; SILVEIRA, F. S.; MENDONÇA JR., M. S. Avaliação da atividade alimentar dos invertebrados de solo em Campos do Sul do Brasil – Bait-Lamina Test. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 3, p. 108-113, 2011.

RÖMBKE, J.; BAUER, C.; MARSCHNER, A. Hazard assessment of chemicals in soil: proposed ecotoxicological test strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 3, p. 78-82, 1996. DOI: 10.1007/BF02985494

RÖMBKE, J.; EISENTRÄGER, A.; HUND-RINKE, K.; JÄNSCH, S.; NEUMANN-HENSEL, H.; SCHALLNASS, H-J. **Erprobung und Vorbereitung einer praktischen Nutzung ökotoxikologischer Testsysteme**. Limburg: SIDUS-Verlag, 2006b. 372 p.

RÖMBKE, J.; JONES, S. E.; VAN GESTEL, C. A. M.; KOOLHAAS, J.; RODRIGUES, J.; MOSER, T. Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME): an instrument for testing potentially harmful substances: effects of Carbendazim on earthworms. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 105-118, 2004. DOI: 10.1023/B:ECTX.0000012410.99020.97.

RÖMBKE, J.; HÖFER, H.; GARCIA, M. V. B.; MARTIUS, C. Feeding activities of soil organisms at four different forest sites in Amazonia using the bait lamina method. **Journal of Tropical Ecology**, v. 22, p. 313-320, 2006a. DOI: 10.1017/S0266467406003166.

RÖMBKE, J.; MOLTMANN, J. F. **Applied ecotoxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 282 p.

RÖMBKE, J.; NOTENBOOM, J.; POSTHUMA, L. The effects of zinc on Enchytraeids: the Budel case study. **Natura Jutlandica Occasional Papers**, n. 2, p. 54-67, 2002.

RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R.; KNAEBE, S. Field studies for the assessment of pesticides with soil mesofauna, in particular enchytraeids, mites and nematodes: design and first results. **Soil Organisms**, v. 81, p. 237-264, 2009.

RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. M; PELOSI, C. Effects of organic pesticides on enchytraeids (Oligochaeta) in agroecosystems: laboratory and higher-tier tests. **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 20, 2017. DOI: 10.3389/fenvs.2017.00020.

RÖMBKE, J. The feeding activity of invertebrates as a functional indicator in soil. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1-2, p. 43-46, 2014. DOI: 10.1007/s11104-014-2195-5.

RUTGERS, M.; FABER, J. H.; POSTMA, J. F.; EIJSACKERS, H. **Site-specific ecological risks**: a basic approach to the function-specific assessment of soil pollution. Wageningen: The Netherlands Integrated Soil Research Programme, 2000. (Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek, 28).

SCHOLZ-STARKE, B.; NIKOLAKIS, A.; LEICHER, T.; LECHELT-KUNZE, C.; HEIMBACH, F.; THEISSEN, B.; TOSCHKI, A.; RATTE, H. T.; SCHÄFFER, A.; ROSS-NICKOLL, M. Outdoor Terrestrial Model Ecosystems are suitable to detect pesticide effects on soil fauna: design and method development, **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1932-1948, 2011. DOI: 10.1007/s10646-011-0732-z.

SCHOLZ-STARKE, B.; EGERER, S.; SCHÄFFER, A.; TOSCHKI, A.; ROßIG, M. Higher-tier multi-species studies in soil: prospects and applications for the environmental risk assessment of pesticides. In: LARRAMENDY, M. L. (Ed.). **Ecotoxicology and Genotoxicology**: non-traditional terrestrial models. Londres: Royal Society of Chemistry, 2017. p. 31-58. (Issues in toxicology, 32).

SCHÄFFER, A.; VAN DEN BRINK, P. J.; HEIMBACH, F.; HOY, S. P.; DE JONG, F. M.W.; RÖMBKE, J.; ROß-NICKOLL, M.; SOUSA, J. P. **Guidance from the SETAC Europe Workshop**: Semi-field Methods for the Environmental Risk Assessment of Pesticides in Soil (PERAS). Boca Raton: CRC Press, 2010. 105 p.

SCOTT-FORDSMAND, J. J.; MARALDO, K.; VAN DEN BRINK, P. The toxicity of copper contaminated soil using a gnotobiotic Soil Multi-species test System (SMS). **Environment international**, v. 34, p. 524-530, 2008. DOI: 10.1016/j.envint.2007.11.008.

SEGAT, J. C. **Avaliação ecotoxicológica da aplicação de dejeto liquido de suínos em solos subtropicais**. 2016. Tese (Doutorado em Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

SEMENZIN, E.; CRITTO, A.; RUTGERS, M.; MARCOMINI, A. Integration of bioavailability, ecology, and ecotoxicology by three lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. **Science & Total Environment**, v. 389, p. 71-86, 2008. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.032.

SHEPPARD, S. C. Toxicity testing using microcosms. In: TARRADELLAS, J.; BITTON, G.; ROSSEL, D. (Ed.). **Soil Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishing, 1997. p. 345-373.

SILVA, D. M. D.; JACQUES, R. J. S.; SILVA, D. A. A. D.; SANTANA, N. A.; VOGELMANN, E.; ECKHARDT, D. P.; ANTONIOLLI, Z. I. Effects of pig slurry application on the diversity and activity of soil biota in pasture areas. **Ciência Rural**, v. 46, p. 1756-1763, 2016. DOI: 10.1590/0103-8478cr20141869.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. **Applied Soil Ecology**, v. 4, p. 147-160, 1996. DOI: /10.1016/0929-1393(96)00109-6.

STONE, D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B. G.; ORGIAZZI, A.; CREAMER, R. E. Selection of biological indicators appropriate for European soil monitoring. **Applied Soil Ecology**, v. 97, p. 12-22, 2016. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.08.005.

UMWELTBUNDESAMT. **UBA-Workshop on terrestrial model ecosystems**. Berlin, Germany: UBA-Texte 54/94, 1994.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines**: OPPTS 850.2450: Terrestrial (Soil-Core) Microcosm Test. [S.l.], 1996. (EPA712-C-96-122). Public draft.

VAN GESTEL, C. A. M.; KRUIDENIER, M.; BERG, M. P. Suitability of wheat straw decomposition, cotton strip degradation and bait-lamina feeding tests to determine soil invertebrate activity. **Biology & FertIlity of Soils**, v. 37, p. 115-123, 2003. DOI: 10.1007/s00374-002-0575-0.

VAN VORIS, P.; TOLLE, D. A.; ARTHUR, M. F. **Experimental terrestrial soil-core microcosm test protocol**. Washington: United States Environmental Protection Agency, 1985. (EPA/600/3-85/047 PNL-5450, UC-11).

VAN WENSEM, J.; JAGERS OP AKKERHUIS, G. A. J. M.; VAN STRAALEN, N. M. Effect of the fungicide triphenyltin hydroxide on soil mediated litter decomposition. **Pesticide Science**, v. 32, p. 307-316, 1991. DOI: 10.1002/ps.2780320305.

VERHOEF, H. A. The role of soil microcosms in the study of ecosystem processes. **Ecology**, v. 77, p. 685-690, 1996. DOI: 10.2307/2265492.

VON TÖRNE, E. Assessing feeding activities of soil living animals. I. Bait lamina test. **Pedobiologia**, v. 34, p. 89-101, 1990a.

Elaboração de relatórios sobre ensaios com oligoquetas

18

Cristina Lúcia Silveira Sisinno

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), um relatório técnico e/ou científico é um documento que descreve formalmente os resultados ou progressos de pesquisa técnica e/ou científica (ABNT, 2015).

O relatório técnico-científico apresenta, sistematicamente, informações suficientes para um leitor qualificado, indicando conclusões e, muitas vezes também, recomendações. É estabelecido em função e sob a responsabilidade de uma instituição ou pessoa a quem será submetido.

O grau de sigilo atribuído a um relatório técnico-científico tem como base a natureza de seu conteúdo, tendo em vista a conveniência de limitar sua divulgação (por exemplo, reservado, confidencial, etc.).

Um relatório completo inclui os seguintes itens:

1. **Informações preliminares ou pré-texto**
   - Capa (primeira e segunda, isto é, frente e verso).
   - Folha de rosto (ou ficha de identificação do relatório).
   - Prefácio (apresentação).
   - Resumo.
   - Lista de símbolos, unidades, abreviaturas, etc.
   - Lista de ilustrações.
   - Sumário.
2. **Texto**
   - Introdução.
   - Desenvolvimento.
   - Conclusões e/ou recomendações.
3. **Informações pós-liminares ou pós-texto**
   - Anexos.
   - Agradecimentos.
   - Referências bibliográficas.
   - Glossário.
   - Índice(s).
   - Folha de identificação do relatório.

- Lista de destinatários e forma de acesso ao relatório.
- Terceira e quarta capas.

Quando relatórios de ensaios ecotoxicológicos são elaborados no meio acadêmico, sua estrutura muitas vezes precisa obedecer aos critérios da instituição de ensino ou pesquisa, atendendo a um modelo padronizado institucionalmente que muitas vezes pode incluir itens como ficha catalográfica, dedicatória e epígrafe.

Porém, sem a obrigatoriedade de um formato acadêmico, é importante elaborar uma estrutura que permita mostrar as informações produzidas de forma clara e concisa, a fim de que elas sejam bem assimiladas pelos técnicos das empresas que contrataram os serviços e técnicos dos órgãos ambientais, caso os resultados técnicos tenham sido produzidos para atendimento legal.

O laudo técnico é uma forma mais simples de expressão de resultados experimentais e com frequência está resumido em uma única página. Normalmente contém o mínimo de informações necessárias, tais como: dados sobre a identificação da amostra; a referência dos métodos usados; o tipo de ensaio; a espécie utilizada; as datas de início e final do ensaio; os resultados do ensaio, com descrição do intervalo de confiança e método estatístico utilizado (muitas vezes descritos em uma tabela); e as assinaturas dos responsáveis técnicos. Normalmente no laudo também há um campo que permite o registro de informações como qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de ensaio; modificações e eventuais ocorrências durante a realização do ensaio.

O relatório de ensaio pode ser considerado um documento mais completo, onde normalmente são encontradas várias informações relacionadas ao estudo. Comumente são incluídas também fotos e gráficos, além de tabelas.

Alguns dos itens que podem constituir a estrutura de um relatório técnico com ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas são os seguintes:

1. **Capa**

Deve constar o título do relatório com o serviço realizado, o nome da instituição requisitante do serviço e o nome da instituição executora com o endereço completo, o local de emissão do relatório, a data, e o número de registro do relatório.

2. **Sumário**

Constitui-se na organização da estrutura do relatório com os itens abordados e sua paginação.

3. **Introdução**

Na introdução são citados o tipo de serviço solicitado e o nome do solicitante com o seu endereço completo.

Resumidamente são descritos o método utilizado, o efeito observado, o tipo de amostra analisada, o tipo de contaminação (caso seja conhecida) e o objetivo do serviço (monitoramento sem obrigação legal; atendimento legal; etc.).

Na introdução também podem ser citadas as relações do serviço realizado com outros trabalhos, por exemplo, no caso de complementação de dados, de continuidade das análises (monitoramento).

A introdução não deve repetir ou parafrasear o resumo, nem dar detalhes sobre o desenho experimental, o método ou os resultados, nem antecipar as conclusões e as recomendações.

4. **Materiais e métodos** (dados sobre a amostra, as condições do ensaio e os procedimentos realizados)

   4.1. Dados sobre a amostra:

É importante identificar a amostra que foi analisada com os seus respectivos dados. Deve ser descrito o código com a identificação numérica ou alfa/numérica da amostra enviado pelo requisitante da análise e/ou criado pelo laboratório de análise.

No caso de amostras ambientais deve-se descrever:

- O tipo de amostra (solo; resíduo sólido; lodo).
- O local de coleta (área contaminada; indústria do setor metalúrgico; ETE – Estação de Tratamento de Esgoto de determinada empresa, etc.).
- O ponto de coleta (no setor de disposição de resíduos; no setor de galvanoplastia; no fundo da lagoa aerada).
- A profundidade de coleta da amostra.
- A data e hora da coleta.
- O responsável pela coleta (sempre que o laboratório de análise não realizar a coleta, é importante solicitar ao responsável pela coleta o preenchimento e envio de uma Cadeia de Custódia, cujos dados serão confirmados entre ambas as partes).
- Tipo de preservação (se houver).
- Caracterização da amostra: textura (percentual de areia, silte e argila); pH; percentual de carbono orgânico, capacidade de retenção de água e capacidade de troca catiônica.
- Identificação do tipo de contaminação (caso seja conhecida, por exemplo, metais, substâncias orgânicas, etc.) e estimativa de tempo da contaminação da amostra.

No caso de substâncias químicas, deve-se descrever:

- O nome.
- O nome comercial.
- A formulação.
- O número do lote.
- A origem.

- O estado físico.
- Suas propriedades físicas e químicas e outras informações de interesse toxicológico.

Outros dados gerais aplicados a amostras ambientais ou substâncias químicas são a identificação do tipo de recipiente de acondicionamento e volume aproximado, além da data de recebimento da amostra no laboratório.

4.2. Análises realizadas

Deve-se citar, inicialmente, a referência completa do método (procedimentos e instruções técnicas internas; métodos nacionalmente e internacionalmente reconhecidos) e as datas de início e final do ensaio (período do ensaio).

O tipo de pré-tratamento (se houver, no caso de amostras ambientais), o método de aplicação (no caso de substância química aplicada ao substrato testado), o método de preparação das amostras e do solo controle (natural ou artificial) devem ser descritos.

Análises complementares que são realizadas antes do ensaio ecotoxicológico propriamente dito podem ser descritas, tais como: procedimentos para a determinação da capacidade de retenção de água, de pH e de granulometria.

Também devem ser citadas as condições de realização do ensaio (período, luminosidade, temperatura, número de organismos utilizados, etc.) e a descrição da espécie utilizada, com informações sobre a idade, o peso, as condições de cultivo, o tipo de alimento fornecido e a fonte de aquisição (cultivo próprio ou aquisição por terceiros).

O método e as modificações realizadas do método (por exemplo, quantidade de organismos e condições de temperatura diferentes das citadas no método) devem ser descritos. Descrever também as condições em que foram realizados ensaios em paralelo (caso houver).

Normalmente, também são registradas informações sobre qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de ensaio e modificações e eventuais ocorrências durante a realização do ensaio.

5. **Resultados e discussão**

Devem ser descritos os resultados para cada recipiente (replicata), cada concentração testada e para o controle, com inclusão dos valores de média, desvio-padrão, intervalo de confiança e método estatístico utilizado. O resultado da mortalidade dos organismos no controle deve indicar o critério de validação do ensaio.

No caso do ensaio de comportamento de fuga com minhocas deve-se relatar a letalidade dos adultos, além da avaliação com respeito à função de habitat limitada ou não, calculada estatisticamente.

No caso de ensaios onde o endpoint é o efeito na reprodução, devem ser relatados: a letalidade dos adultos; a massa dos organismos adultos vivos no início

do ensaio e ao final de 4 semanas (ensaio com minhocas); o número de juvenis ao final do ensaio.

Na discussão é realizada a análise resultados obtidos.

6. **Conclusões e/ou recomendações**

As conclusões devem estar descritas, de forma clara e ordenada e referem-se às considerações obtidas sobre os resultados do trabalho, ou levantadas ao longo da discussão do assunto. Dados quantitativos não devem aparecer nas conclusões.

As recomendações são declarações concisas de ações, julgadas necessárias a partir das conclusões obtidas, a serem usadas no futuro.

7. **Referências bibliográficas**

- Citar a fonte completa do método utilizado.
- Citar outras referências bibliográficas pertinentes.

8. **Responsabilidade Técnica**

Os laudos e relatórios precisam ser assinados pelo Responsável Técnico pelo serviço executado na empresa. Esse responsável deve estar registrado no seu respectivo Conselho de Classe Profissional (como profissional e como responsável técnico).

Além da assinatura devem estar citados o nome completo, a graduação, a titulação ou cargo e o número de registro profissional dos responsáveis pela análise.

9. **Outras informações**

Tanto os laudos como os relatórios precisam ter um número de registro rastreável, incluindo também as seguintes informações: data de emissão, número de revisão e número de páginas (inicial e final).

Alguns laboratórios possuem textos próprios, que são inseridos nos laudos/relatórios, onde estão descritas informações sobre a confidencialidade dos resultados; restrição dos resultados apenas à amostra analisada; política de reprodução dos relatórios e outras ferramentas relacionadas à segurança dos dados produzidos.

Nos anexos dos relatórios técnicos também podem ser encaminhadas cópias de certificados de qualidade, como por exemplo, o certificado de Acreditação na ISO/IEC 17025 e o de reconhecimento pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) em Boas Práticas de Laboratório (BPL). Cópias da Cadeia de Custódia e do Formulário de Recebimento da Amostra, preenchidos e assinados muitas vezes são encaminhados como anexo.

A Cadeia de Custódia registra o caminho da amostra desde a coleta até o momento da análise, indicando os responsáveis neste trâmite. Normalmente é elaborada na forma de uma ficha, onde são registrados todos os dados referentes a coleta, tipo de amostras coletadas e análises solicitadas. A Cadeia de

Custódia será assinada e datada no momento da coleta pelo responsável por essa operação. Ao ser enviada para análise, a troca de custódia da amostra será registrada, com a assinatura do novo responsável pela custódia das amostras (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999).

No Formulário de Recebimento da Amostra são registradas informações como: integridade do recipiente de acondicionamento da amostra, quantidade suficiente de amostra, preservação adequada ou não, recebimento dentro do tempo de validade da análise, etc.

Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10719**: a apresentação de relatórios técnico-científicos. Rio de Janeiro, 2015.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Amostragem de solo. In. _____. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo, 1999. cap. 6300. Disponível em: <www.cetesb.gov.br>. Acesso em: 25 jul. 2011.

Embrapa
Florestas

Apoio:

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

agrisus
FUNDAÇÃO AGRISUS
agricultura sustentável

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

ISBN 978-85-7035-939-1
9 788570 359391 >

CGPE: 15669