

O USO DE MINHOCAS COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO DE SOLOS

Mara Mercedes de ANDRÉA

Instituto Biológico, CPDPA, Laboratório de Ecologia de Agroquímicos. Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, São Paulo-SP, 04014-002, Brasil. andrea@biologico.sp.gov.br.

Andréa, M. M. de. 2010. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, Número Especial 2: 95-107.

RESUMO. O nicho ecológico das minhocas as caracteriza como organismos muito importantes no solo e como bioindicadores ambientais. Suas características, especialmente das espécies *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) e *E. andrei* Bouché, 1972, as qualificaram para testes de toxicidade para fins de registro de agrotóxicos, junto aos órgãos regulamentadores de diversos países. Além da relativa facilidade de criação de *E. fetida* e *E. andrei*, as condições desses testes são internacionalmente aceitas e permitem padronização de estudos e comparações internacionais; informam sobre toxicidade relativa às espécies endêmicas; permitem avaliações preliminares em relação a intervalos de doses do poluente para os testes; fornecem estimativas sobre o CENO (concentração sem efeito observável) para exposição contínua, e ajudam no estabelecimento de condições para testes de efeitos subletais e sub-crônicos. Este artigo apresenta resultados e questionamentos de vários estudos ecotoxicológicos com minhocas como bioindicadores de contaminação ambiental. As pesquisas mostraram que a bioacumulação de agrotóxicos, metais, derivados do petróleo, antibióticos e compostos de uso veterinário em minhocas varia conforme a espécie, o composto, concentração, tempo de contato e características do solo. Outras respostas das minhocas em reação a poluentes foram observadas, tais como: variações na produção e peso de casulos; efeitos fisiológicos e deformações, e reações comportamentais de espiralamento, mudanças na capacidade de escavação, agitação e rejeição ao solo contaminado. Verifica-se que o potencial de informações bioindicadoras de poluição provenientes de estudos com minhocas é bastante grande, mas as análises devem levar em conta as espécies, categorias ecológicas, as condições ambientais e as analogias com outros organismos, usos, abusos e misturas de agrotóxicos e outros poluentes.

Palavras chave: Agrotóxicos, metais pesados, outros poluentes, bioindicadores, ecotoxicologia.

Andréa, M. M. de. 2010. El uso de las lombrices de tierra como bioindicadoras de la contaminación de los suelos. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, Número Especial 2: 97-107.

RESUMEN. El nicho ecológico de las lombrices de tierra las caracteriza como organismos del suelo muy importantes que se pueden utilizar como bioindicadores ambientales. Las características de las lombrices de tierra, principalmente de *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *E. andrei* Bouché, 1972 las califica para realizar las pruebas de toxicidad requeridas para el registro de plaguicidas en muchos países. Además de la facilidad de cría de *E. fetida* y *E. andrei*, las condiciones de estas pruebas son aceptadas internacionalmente, permitiendo la estandarización de los estudios y comparaciones en el ámbito internacional. Los resultados de estas pruebas dan información sobre la relativa toxicidad de una

Recibido: 16/05/2008; aceptado: 08/01/2010.

sustancia para especies endémicas, permitiendo evaluaciones preliminares de los intervalos de dosis de la sustancia en cuestión, estimaciones de los NOEC (concentraciones de efecto no observado) en caso de una exposición continua, y permiten establecer las condiciones de las pruebas para evaluar los efectos subletales y subcrónicos. En este artículo se presentan y discuten algunos resultados de varios estudios ecotoxicológicos en los que lombrices de tierra fueron utilizadas como bioindicadores de contaminación ambiental. Los investigadores mostraron que la bioacumulación de plaguicidas, metales, derivados de aceites, antibióticos y otras drogas de uso veterinario varían de acuerdo a la especie de lombriz de tierra, compuesto, concentración, tiempo de exposición y las características del suelo. Otras respuestas de las lombrices de tierra a los contaminantes fueron observadas, incluyendo variaciones en el peso y formación de los capullos, anormalidades y efectos fisiológicos, así como reacciones en el comportamiento como enroscamiento, cambios en la capacidad de formación de galerías, agitación y alejamiento del contaminante. La información que se puede obtener en los estudios con lombrices de tierra como bioindicadores es muy amplia, pero se deben de considerar las especies, las categorías ecológicas, las condiciones ambientales y las analogías con otros organismos, los usos de los plaguicidas y otras mezclas de contaminantes.

Palabras clave: Plaguicidas, metales pesados, otros contaminantes, ecotoxicología.

INTRODUÇÃO: FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

A atividade antrópica introduz diversos compostos xenobióticos no ambiente, sejam eles agrotóxicos e fertilizantes de uso agrícola, ou metais, derivados de petróleo, e outros subprodutos e resíduos provenientes de atividade industrial. Grande parte desses compostos atinge o ambiente por aplicação ou descarga direta, ou de forma indireta, por volatilização, percolação e dispersão, expondo e comprometendo a saúde dos organismos ali presentes assim como do próprio ambiente.

O conhecimento do grau e das formas de poluição por meio de monitoramento ambiental é fundamental, tendo em vista o potencial de persistência, ou o de transformação em outros compostos e de complexação dos xenobióticos com moléculas naturais. Entretanto, o monitoramento é feito por meio de análises dispendiosas que dependem de conhecimento específico de métodos, de aparelhos e materiais caros e de pessoal especializado para condução dessas análises. O monitoramento também depende da constância na coleta e na análise de grandes quantidades das matrizes ambientais, pois o grau de contaminação pode ser pequeno, mas com potencial significativo de perturbação tanto do ambiente, quanto de interação com os organismos ali presentes, com conseqüências ecológicas em todas as teias alimentares envolvidas com aquele ambiente.

Dada a importância do solo como fonte de água e nutrientes para plantas e outros organismos, como agente tamponador de mudanças de temperatura e do fluxo de água entre a atmosfera e as águas subterrâneas, atuando como reservatório de nutrientes e como habitat para organismos decompositores na ciclagem e disponibilização de nutrientes, a poluição do ecossistema edáfico pode ter conseqüências importantes para todas as formas de vida e na qualidade de alimentos, da água e da atmosfera (Wild 1993).

Neste ecossistema o componente vivo, isto é, a teia alimentar é complexa e pode ser afetada pela atividade antrópica (Ingham 2006). Dentre os organismos de solo, as minhocas compreendem de 40% a 90% da biomassa de macrofauna da maioria dos ecossistemas tropicais (Fragoso *et al.* 1999). Sua importância é imensa visto que têm papel destacado na formação do solo (Righi 1997); na decomposição de resíduos de plantas e ciclagem de nutrientes da matéria orgânica; na formação do húmus e de agregados de solo, onde a atividade biológica é mais intensa; no melhoramento da estrutura, fertilidade, porosidade e capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água, ar e também no transporte de microrganismos e nutrientes do solo por meio dos canais formados por sua escavação e seus deslocamentos no solo (Ingham 2006). Nos processos de digestão das minhocas o solo é misturado com muco, que ajuda na agregação de partículas, e a deposição de bolotas fecais, que contêm grandes concentrações de nutrientes, ajuda na formação do húmus e na fertilidade do solo (Shipitalo & Bayon 2004). Também atuam no controle de patógenos que podem ser inibidos por produtos de seu metabolismo ou servir de alimentos, e ainda, na degradação de poluentes (Ingham 2006). Conforme resumiram Shuster *et al.* (2002), as minhocas são ímpares por sua habilidade em integrar os processos físicos, químicos e biológicos do ecossistema edáfico.

Por meio de seus deslocamentos e de ingestão de solo ou serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com poluentes que atingem ou são aplicados no solo e nele podem permanecer adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo (Spadotto *et al.* 2004). Elas podem ainda se expor e absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula (Vijver *et al.* 2003; Castellanos & Hernandez 2007). A partir desse contato, as minhocas podem se intoxicar, morrer, ou sobreviver, incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (Curry 2004).

A determinação das concentrações de poluentes em organismos como bioindicadores-sentinelas é útil porque fornece informações sobre a biodisponibilidade dos poluentes e o padrão de contaminação (Beeby 2001, Nicholson & Lam 2005). O potencial bioindicativo de organismos dos níveis tróficos mais baixos tem sido crescentemente estudado para avaliações dos possíveis perigos ambientais associados com a transferência e biomagnificação dos poluentes ao longo das diferentes teias alimentares (Vasseur & Cossu-Leguille 2006). Portanto, o nicho ecológico e a importante posição trófica das minhocas, que se situam nos níveis mais baixos das teias alimentares terrestres, servindo de alimento para vários animais e como rota de transferência e biomagnificação de contaminantes ao longo dessas teias, além do conhecimento já acumulado sobre seus hábitos alimentares e habitats, fazem das minhocas excelentes bioindicadores de ecotoxicidade de substâncias químicas no solo, pois elas indicam a bioacumulação potencial ao longo dessas teias (Paoletti 1999, Nahmani *et al.* 2007, Castellanos & Hernandez 2007).

TESTES DE TOXICIDADE

Conforme Linthurst *et al.* (1995), os testes de toxicidade fornecem medidas diretas da biodisponibilidade dos poluentes ou agentes tóxicos e podem ajudar a estabelecer as ligações entre a contaminação local e os efeitos ecológicos adversos. Avaliam exposições agudas, sub-crônicas e crônicas e medem os efeitos biológicos resultantes dessas exposições, tais como, mortalidade, desempenho reprodutivo, crescimento e mudanças comportamentais. Por sua grande importância no solo, sua ampla distribuição e por todas as razões previamente citadas, as minhocas, principalmente as espécies *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) e *E. andrei* Bouché, 1972, foram escolhidas para diversos testes de toxicidade para fins de registro de agrotóxicos junto aos órgãos regulamentadores de diversos países, inclusive do Brasil.

Assim, os testes da OECD (Organização Européia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico), da EPA (Agência Americana de Proteção do Ambiente) e da ISO (Organização Internacional para Padronização) entre outros, adotaram a espécie *E. fetida* para os testes de toxicidade aguda desde, respectivamente 1984, 1991 e 1993, e posteriormente para os testes de reprodução e rejeição ou evitamento de agrotóxicos. No Brasil, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Desenvolvimento dos Recursos Naturais Renováveis) solicita apenas o teste de toxicidade aguda (ABNT, 2007) e aceita resultados obtidos por meio das metodologias dos testes das organizações internacionais.

Entretanto, com o decorrer do tempo desde a proposição e adoção desses testes, muitas críticas foram elaboradas a partir de resultados de vários estudos. O teste de toxicidade aguda, por exemplo, é criticado principalmente porque se baseia em dados de mortalidade após apenas 14 dias de contato de apenas uma espécie de minhoca (geralmente *E. fetida*) com um substrato totalmente artificial (mistura de proporções fixas de turfa de esfagno, caulim e areia industrial, com pH ajustado em 6 por adição de carbonato de cálcio) tratado com o poluente. Além da turfa de esfagno ser pouco freqüente no Brasil, a composição desse substrato e o pH não representam, por exemplo, as condições naturais de solos brasileiros. Também esta espécie de minhoca não ocorre naturalmente na América Latina. Em relação à composição do substrato, Garcia *et al.* (2004) já apresentaram novas opções de solo artificial tropical.

Os resultados obtidos por este teste só informam sobre doses que causam mortalidade, que são úteis para as propostas de registro de moléculas agrotóxicas, mas nada informam sobre efeito de doses pequenas e exposições por tempo mais longo. Também não resultam em definição de níveis tóxicos para o ambiente, nem em dados para previsão do efeito da substância tóxica nas situações de campo e não indicam se pode ocorrer indução de resistência das minhocas a partir de exposições de longo prazo (Linthurst *et al.* 1995, Reinecke & Reinecke 2004). Lowe & Butt (2007) afirmam que somente os testes que medem efeitos subletais fornecem dados mais sensíveis e ecologicamente relevantes.

A escolha da *E. fetida* como única espécie também tem sido criticada pelo seu habitat, por ser comprovadamente menos sensível que outras espécies e não ser representativa de ambientes rurais (Paoletti 1999, Eijsachters 1998, 2004, Ribera *et al.* 2001, Reinecke & Reinecke 2004). As críticas se baseiam principalmente no fato das espécies *Eisenia fetida* e *E. andrei* serem tipicamente epigêicas que vivem na serapilheira e em esterco, com pouca atuação direta na estrutura e características de solos minerais (Shipitalo & Bayon 2004, Castellanos & Hernandez 2007). Além disso, os resultados obtidos com *E. fetida* não permitem extrapolação direta para outras espécies e ela não pode servir como única espécie representativa do ambiente edáfico (Lowe & Butt 2007).

Por outro lado, estes testes fornecem outras vantagens, tais como: a relativa facilidade de criação das *Eisenias*; as condições desses testes são internacionalmente aceitas; permitem padronização de estudos e comparações internacionais; fornecem estimativas sobre toxicidade relativa às espécies endêmicas; permitem avaliações preliminares em relação a intervalos de doses do poluente sob estudo, e fornecem estimativas iniciais sobre o CENO (concentração sem efeito observável) para exposição contínua. Assim, conforme ressaltam Reinecke & Reinecke (2004), embora estejam surgindo novas tendências nos testes de ecotoxicologia, os testes de toxicidade com minhocas ainda são recomendados e solicitados.

ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE MINHOCAS COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO

Independentemente dos testes de toxicidade, a grande maioria dos autores concorda que as minhocas *E. fetida* e *E. andrei*, assim como outras minhocas, fazem bem o papel de bioindicadores sensíveis e oferecem inúmeras possibilidades de estudos de contaminação ambiental tanto por agrotóxicos, como por metais, derivados do petróleo, antibióticos, produtos veterinários, e outros poluentes (Sisínno *et al.* 2005, Loureiro *et al.* 2005, entre outros).

Eijsachters (2004) e Lowe & Butt (2007) destacam a importância da avaliação da toxicidade de poluentes em minhocas de diferentes ecótipos para uma avaliação das possibilidades ecotoxicológicas, visto que cada ecótipo tem diferentes efeitos no solo. Resultados de estudos com espécies endogêicas se relacionam melhor com as possíveis alterações no ambiente edáfico.

Além disso, vários trabalhos relatam resultados sobre a influência das características dos solos sobre a absorção e a toxicidade de agrotóxicos e metais para minhocas, pois se sabe que as características físico-químicas dos solos influenciam diretamente o comportamento de diferentes poluentes e têm grande influência na biodisponibilidade de poluentes para os organismos edáficos (van Gestel 1992, Spadotto *et al.* 2004). Ellis *et al.* (2007), por exemplo, verificaram que quanto maior a adsorção

do composto ao substrato, menor é a mortalidade das minhocas. Por outro lado, as minhocas também influenciam os processos de dissipação de vários poluentes no solo (Farenhorst *et al.* 2000, Singer *et al.* 2001, entre outros). Por isso e conforme as recomendações internacionais (van Gestel & Weeks 2004), considera-se que a biodisponibilidade é um aspecto fundamental no controle da assimilação não só de compostos nutrientes, mas também de contaminantes por minhocas em estudos ecotoxicológicos, e deve ser sempre medida por meio de determinações da concentração do poluente no solo e nas minhocas, tanto no início, como no final dos testes.

As pesquisas têm demonstrado há tempos que tratamentos de solos com doses subletais dos poluentes e os estudos de longo prazo com minhocas fornecem respostas de bioindicação de diferentes compostos. Esses estudos avaliam principalmente a bioacumulação dos poluentes nas minhocas a partir de condições controladas (substrato, período de tempo, espécies, etc.) e podem indicar o perigo de contaminação e biomagnificação nas diferentes teias alimentares (Reinecke & Reinecke 2004).

As minhocas têm sido estudadas como bioindicadores de agrotóxicos há tempos e muitas respostas relevantes para o meio ambiente foram alcançadas a partir desses estudos (Paoletti 1999). Por exemplo, já em 1992 Springett & Gray (1992) mostraram que repetidas aplicações de diferentes agrotóxicos, mesmo em baixos níveis, exerceram efeito sobre as taxas de crescimento da minhoca *Aporrectodea caliginosa*. Brunninger *et al.* (1994, 1995) e Viswanathan (1997) verificaram que tratamento de solo artificial com doses subletais do herbicida terbutilazina e do inseticida carbofuran produziram diferentes efeitos fisiológicos e reprodutivos nas minhocas *E. andrei*. O herbicida estimulou, mas o inseticida inibiu o crescimento e a produção de casulos. A respiração de várias espécies de minhocas foi estimulada por baixas concentrações de carbofuran, mas inibida por altas doses após três ou quatro semanas de exposição, dependendo da espécie. Já altas concentrações de terbutilazina estimularam a respiração.

Dalby *et al.* (1995) mostraram a mudança no peso de *Aporrectodea trapezoides*, *A. rosea*, *A. caliginosa* e *A. longa* por influência do inseticida dimetoato e dos herbicidas glifosato e 2,4-DB. Por outro lado, Farenhorst *et al.* (2003) verificaram que o herbicida atrazina não afetou o peso de minhocas *Lumbricus terrestris*. Outros trabalhos verificaram que o fator de bioacumulação do inseticida lindano foi praticamente o mesmo independentemente do tempo de contato das minhocas com o solo tratado (Viswanathan *et al.* 1988); mas, do glifosato, foi maior quanto maior o tempo de contato (Papini & Andréa 2002).

A influência da solubilidade em água sobre a toxicidade de dois diferentes pesticidas, assim como suas influências em enzimas e na deformidade de espermatozoides de *E. fetida* foram demonstradas por Luo *et al.* (1999). Hodge *et al.* (2000) verificaram que não ocorre rejeição de *A. caliginosa* a solo tratado com os inseticidas clorpirifós e diazinon e que mesmo taxas de aplicações sete vezes maiores do que

as recomendadas para clorpirifós não produziram efeito na densidade de minhocas juvenis. Farenhorst *et al.* (2000) mostraram que minhocas *L. terrestris* adicionadas a solos agrícolas após o tratamento com atrazina diminuíram significativamente a meia-vida do herbicida e que sua atividade de alimentação influenciou os processos de dissipação do herbicida nos solos.

Os herbicidas simazina (Papini & Andréa 2001) e glifosato (Papini & Andréa 2002) tiveram a mesma magnitude de bioacumulação independentemente da quantidade presente. Mas, o herbicida paraquat (Papini *et al.* 2006) foi crescentemente bioacumulado por *E. fetida* de acordo com o aumento da concentração no solo. Simazina e paraquat foram mais bioacumulados a partir de substrato com menos matéria orgânica e mais argila (Andréa & Papini 2005, Papini *et al.* 2006). Em condições de solo agrícola brasileiro, Andréa *et al.* (2004) demonstraram que minhocas *E. fetida* bioacumularam, mas não alteraram a dissipação do herbicida glifosato. Valores de bioacumulação do inseticida e vermífugo avermectin se estabilizaram entre 9 e 18 dias de exposição e foram maiores quanto maior a dose de tratamento do solo; mas, pelo menos 80% da quantidade bioacumulada foram liberados em apenas um dia (Sun *et al.* 2005). Xiao *et al.* (2006) verificaram, entre outras coisas, que crescimento, número de minhocas juvenis por casulo e a atividade da celulase de minhocas *E. fetida* podem servir de parâmetros sensíveis de toxicidade do herbicida acetoclor.

As minhocas também respondem ao contato com outros poluentes. A biomassa e o número de novos espécimes de *E. fetida* aumentaram durante 18 semanas em substrato composto de lama de esgoto de estação de tratamento de água de fábrica de papel (Benitez *et al.* 1999a). Mas, elas perderam a capacidade de reprodução após nove semanas de contato com essa lama de esgoto (Benitez *et al.* 1999b). Lock & Janssen (2002) verificaram que a sensibilidade de *E. fetida* e *Eisenia veneta* são semelhantes para toxicidade crônica ao níquel. Langdon *et al.* (1999) sugerem que minhocas *Lumbricus rubellus* podem desenvolver resistência ao arsênico, e que isto é notável até por reações comportamentais como: enrolamento, rejeição, fuga para a superfície ou suspensão de alimentação.

Estudos de Eijsackers *et al.* (2001) concluíram que a biodegradação de HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) é aumentada pela colonização e atividade das minhocas em solo que recebeu despejo de sedimentos contaminados. Singer *et al.* (2001) demonstraram que minhocas *Amyntas gracilis* contribuíram para biorremediação de solos contaminados com PCB (bifenilas poli cloradas). O metil terc-butil éter (MTBE; um poluente do petróleo) foi mais tóxico à *Perionyx excavatus* do que à *E. andrei*, mas produziu várias deformações nesta última (An 2005). Alguns metais insolúveis como Cd, Pb e Zn (Becquer *et al.* 2005) e o vermífugo avermectin (Sun *et al.* 2005) também foram crescentemente bioacumulados por diferentes espécies de minhocas de acordo com o aumento da concentração no solo. Gao *et al.* (2007a,b) verificaram que dois produtos de uso veterinário, um anti-helmíntico e um antibió-

tico, produziram diferentes respostas enzimáticas e morfológicas nas minhocas, que representariam avisos precoces para contaminação do solo. A toxicidade do cobre diminuiu após adição de EDTA no meio (Arnold *et al.* 2007), mas a absorção de chumbo e a mortalidade das minhocas foram maiores após aplicação do EDTA (Jones *et al.* 2007). A reprodução de minhocas foi mais sensível à exposição a substratos com mercúrio do que a sobrevivência (Gudbrandsen *et al.* 2007). A minhoca anécica *L. terrestris* acumulou mais Mn do que a endogêica *A. caliginosa*. Por outro lado, Arnaud *et al.* (2000) alertam sobre mudanças bioquímicas em minhocas induzidas por diferentes substratos, independentemente da contaminação.

Mais recentemente, vários trabalhos apontam a necessidade ou a possibilidade do uso de biomarcadores de minhoca nos estudos ecotoxicológicos. Biomarcadores são definidos como mudanças biológicas mensuráveis, desde os níveis bioquímicos e moleculares até os comportamentais, em resposta a contaminantes (Castellanos & Hernandez 2007). Os biomarcadores informam sobre as mudanças que ocorrem nos níveis mais baixos de organização biológica e podem fornecer previsões sobre as conseqüências ecológicas desde o início da poluição e por concentrações subletais (Asensio *et al.* 2007). Desta forma, verifica-se que muitos dos trabalhos já citados, que relatam resultados sobre efeitos fisiológicos, deformações e reações comportamentais já estudavam biomarcadores. Muitos outros ainda podem ser citados, como por exemplo, por terem estudado enzimas das minhocas como biomarcadores para elucidar os mecanismos de ação do poluente (Ribera *et al.* 2001).

O estudo de Zang *et al.* (2000) indica o ensaio cometa de células como método sensível para triagem de danos de substâncias químicas sobre o DNA das minhocas. Xiao *et al.* (2006) apontam o crescimento, o número de minhocas juvenis por casulo e a atividade da enzima celulase como parâmetros para avaliação de acetocloro em minhocas *E. fetida*. Resumindo, conforme afirmam Castellanos & Hernandez (2007) em recente revisão sobre esse assunto em contaminação por agrotóxicos, a inclusão de abordagens com biomarcadores nos testes ecotoxicológicos aumentaria o significado dos resultados em termos de biodisponibilidade, efeitos subletais e previsão sobre os efeitos indiretos de agrotóxicos e os efeitos em outras populações a longo-prazo.

Heimbach (1997), Reinecke & Reinecke (2004) e Lowe & Butt (2007) apontaram várias recomendações e novas abordagens para os estudos ecotoxicológicos com minhocas, envolvendo testes de campo, solos agrícolas e o uso de biomarcadores. Ainda há estudos que utilizam minhocas em microcosmos (Forster *et al.* 1996) e mesocosmos (Svendsen & Weeks 1997, Römbke *et al.* 2004) que são sistemas que utilizam pequenas amostras de um ecossistema, conservando e controlando muitas de suas características físico-químicas e a biota, para simular os processos e as interações dos diferentes componentes. Microcosmos e mesocosmos são úteis como intermediários entre experimentos com bioensaios e no ecossistema (Linhurst *et al.* 1995).

CONCLUSÕES

As pesquisas com minhocas como bioindicadores de contaminação têm se aprofundado, mas respostas mais abrangentes podem ser obtidas. Conforme Eijsackers (1998) e Reinecke & Reinecke (2007) afirmam, o risco ecológico requer uma abordagem interdisciplinar e a incorporação de biomarcadores sensíveis das minhocas em estudos de ecotoxicidade pode resultar em respostas promissoras para previsão de riscos tóxicos em níveis tróficos mais elevados. Para isso, vários cuidados devem ser tomados com o planejamento dos estudos e com a interpretação dos resultados, de tal forma que se saiba se o efeito foi, de fato, do poluente, ou apenas do intervalo de tempo, da concentração usada, do modo de aplicação, das características do solo ou do substrato utilizado. Por isso deve-se estudar mais de um parâmetro para que a resposta não deixe em dúvida que o efeito foi produzido pelo poluente. Deve-se ainda verificar se o efeito é de curto ou longo prazo, pois isto tem conseqüências na avaliação de possível biomagnificação ao longo das teias alimentares. O planejamento do estudo deve ainda considerar as respostas às variáveis puramente ambientais e sazonais.

Finalmente, Eijsackers (2004) e Van Gestel & Weeks (2004) apresentaram análises críticas e ainda atuais, abrangendo o seguinte questionamento: os biomarcadores de minhoca seriam aplicáveis a outros organismos? Os compostos têm efeitos similares nas diferentes espécies ou em diferentes idades das minhocas? A mistura de compostos produz efeitos diferentes dos produzidos por compostos isolados? Ocorrem interações sinérgicas ou antagonísticas entre os diferentes poluentes possivelmente presentes no ambiente? Sempre que possível esses estudos devem levar em conta esses fatores, assim como se devem utilizar condições que se aproximem de situações de atividades agrícolas no planejamento de estudos e nas análises, de tal forma que os resultados obtidos possam progredir e fornecer previsões de efeitos ecotoxicológicos.

LITERATURA CITADA

- An, Y. J. 2005. Assessing soil ecotoxicity of methyl tert-butyl ether using earthworm bioassay; closed soil microcosm test for volatile organic compounds. *Environmental Pollution*. 134: 181-186.
- Andréa, M. M., S. Papini, T. B. Peres, S. Bazarin, V. L. T. Savoy & M. B. Matallo. 2004. Glyphosate: Influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. *Planta Daninha*. 22: 95-100.
- Andréa, M. M. & S. Papini. 2005. Influence of soil properties on bioaccumulation of ¹⁴C-simazine in earthworms *Eisenia fetida*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 40: 55-58.
- Arnaud, C., M. Saint-Denis, J. F. Narbonne, P. Soler & D. Ribera. 2000. Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 67-73.
- Arnold, R. E., M. E. Hodson & S. Comber. 2007. Does speciation impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia fetida*? *European Journal of Soil Biology*. 43: S230-S232.
- Asensio, V., P. Kille, A. J. Morgan, M. Soto & I. Marigomez. 2007. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *European Journal of Soil Biology*. 43: S233-S238.

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).** 2007. NBR15537 - *Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas*. 19/11/2007.
- Becquer, T., J. Dai, C. Quantin & P. Lavelle.** 2005. Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1564-1568.
- Beeby, A.** 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution*. 112: 285-298.
- Benitez, E., R. Nogales, C. Elvira, G. Masciandaro & B. Ceccanti.** 1999a. Enzyme and earthworm activities during vermicomposting of carbaryl-treated sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*. 28: 1099-1104.
- Benitez, E., R. Nogales, C. Elvira, G. Masciandaro & B. Ceccanti.** 1999b. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia fetida*. *Bioresource Technology*. 67: 287-303.
- Brunniger, B., R. Viswanathan & F. Beese.** 1994. Terbutylazine and carbofuran effects on growth and reproduction within three generations of *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*. 18: 83-88.
- Brunniger, B., R. Viswanathan & F. Beese.** 1995. CO₂ production in three earthworm species exposed to terbutylazine and carbofuran in food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 32:68-72.
- Castellanos, L. R. & J. C. A. Hernandez.** 2007. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science*. 32: 360-371.
- Curry, J. P.** 2004. Factors affecting the abundance of earthworms in soils. Pp. 91-113. In: C. A. Edwards (Ed.). *Earthworm ecology*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Dalby, P. R., G. H. Baker & S. E. Smith.** 1995. Glyphosate, 2,4-DB and dimethoate: effects on earthworm survival and growth. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 1661-1662.
- Eijsackers, H.** 1998. Earthworms in environmental research: still a promising tool. Pp. 295-323. In: C. A. Edwards (Ed.). *Earthworm ecology*. CRC Press, Boca Raton.
- Eijsackers, H.** 2004. Earthworms in environmental research. Pp. 321-342. In: C.A. Edwards (Ed.). *Earthworm ecology*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Eijsackers, H., C. A. M. Van Gestel, S. De Jonge & D. Slijkerman.** 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted dredged peat sediments and earthworms: a mutual interference. *Ecotoxicology*. 10: 35-50.
- Ellis, S. R., M. E. Hodson & P. Wege.** 2007. The influence of different artificial soil types on the acute toxicity of carbendazim to the earthworm *Eisenia fetida* in laboratory toxicity tests. *European Journal of Soil Biology*. 43: S239-S245.
- EPA (United States Environmental Protection Agency).** 1996. *Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.6200*. Earthworm Subchronic Toxicity Test. EPA, Washington D.C.
- Farenhorst, A., E. Topp, B. T. Bowman & A. D. Tomlin.** 2000. Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 23-33.
- Farenhorst, A., E. Topp & B. T. Bowman.** 2003. Impact of herbicide application rates and crop residue type on earthworm weights. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 70: 477-484.
- Forster, B., M. Eder, E. Morgan & T. Knacker.** 1996. A microcosm study of the effects of chemical stress, earthworms and microorganisms and their interactions upon litter decomposition. *European Journal Soil Biology*. 32: 25-33.
- Fragoso, C., P. Lavelle, E. Blanchart, B. K. Senapati, J. J. Jiménez, M. A. Martínez, T. Decaëns & J. Tondoh.** 1999b. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. Pp. 27-55. In: P. Lavelle, L. Brussaard and P.F. Hendrix (Eds). *Earthworm management in tropical agroecosystems*. CABI, Wallingford.

- Gao, Y., Z. Sun, Z. Liu, X. Sun, Y. Li, Y. Bao & G. Wang.** 2007a. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*. 43: S246-S251.
- Gao, Y., Z. Sun, Z. Liu, X. Sun, Y. Li & Y. Bao.** 2007b. Toxic effect of olaquinox antibiotic on *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*. 43: S252-S255.
- Garcia, M. V. B., J. Römke & C. Martius.** 2004. Proposal for an artificial soil substrate for toxicity tests in tropical regions. In: 25th Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Portland.
- Gudbrandsen, M., L. E. Sverdrup, S. Aamodt & J. Stenersen.** 2007. Short-term pre-exposure increases earthworm tolerance to mercury. *European Journal of Soil Biology*. 43: S261-S267.
- Heimbach, F.** 1997. Field tests on the side effects of pesticides on earthworms: influence of plot size and cultivation practices. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 671-676.
- Hodge, S., K. M. Webster, L. Booth, V. Hepplethwaite & K. O'Halloran.** 2000. Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 425-428.
- Ingham, E. R.** 2006. *The soil biology primer*. Disponível em: <http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil_biology/fw&soilhealth.html> Acesso em: 4 Setembro 2006.
- ISO (International Organization for Standardization).** 1993. ISO 11268-1 *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)* – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. 13p.
- Jones, L., M. O'Reilly & A. J. Morgan.** 2007. Responses of a non-target organism to metalliferous field soils amended by a phytoremediation-promoting chelator (EDTA): The earthworm, *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*. 43: S289-S296.
- Langdon, C. J., T. G. Pearce, S. Black & K. T. Semple.** 1999. Resistance to arsenic-toxicity in a population of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Soil Biology and Biochemistry*. 31: 1963-1967.
- Linthurst, R. A., P. Bourdeau & R. C. Tardiff.** 1995. Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems In: *SCOPE 53. Methods to study chemical effects*. Scientific Committee on Problems of the Environment Report #53. M.S. Swaminathan Research Foundation, Chennai, India. Disponível em: <<http://www.icsu-scope.org/downloadpubs/scope53/chapter03.html>> Acesso em: 4 Outubro 2007.
- Lock, K. & C. R. Janssen.** 2002. Ecotoxicity of nickel to *Eisenia foetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere*. 46: 197-200.
- Loureiro, S., A. M. V. M. Soares & A. J. A. Nogueira.** 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*. 138: 121-131.
- Lowe, C. N. & K. R. Butt.** 2007. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *European Journal of Soil Biology*. 43: S281-S288.
- Luo, Y. L., Y. Zang, Y. Zhong & Z. Kong.** 1999. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. *Chemosphere*. 39: 2347-2356.
- Nahmani, J., M. E. Hodson & S. Black.** 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution*. 145: 402-424.
- Nicholson, S. & P. K. S. Lam.** 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*. 31: 212-132.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development).** 1984. *OECD Guideline for Testing of Chemicals*. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 9p.
- Paoletti, M. G.** 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74: 137-155.

- Papini, S. & M. M. Andréa.** 2001. Bioacumulação de herbicidas em minhocas. In: *IV Jornada Científica da AUGM sobre Meio Ambiente*. Campinas, SP. p.124.
- Papini, S. & M. M. Andréa.** 2001. Dissipação de simazina em solo por ação de minhocas (*Eisenia fetida*). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 25: 593-599.
- Papini, S. & M. M. Andréa.** 2002. Dissipação do glifosato em solo e bioacumulação em minhocas. In: *Resumos da Fertbio 2002*. SBCS, Rio de Janeiro. CD-Rom.
- Papini, S., T. Langenbach, L. C. Luchini & M. M. Andréa.** 2006. Influence of substrate on bioaccumulation of ¹⁴C-paraquat in compost worms *Eisenia fetida*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 41: 523-530.
- Reinecke, A. J. & S. A. Reinecke.** 2004. Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. Pp. 299-320. In: C.A. Edwards (Ed.). *Earthworm ecology*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Ribera, D., J. F. Narbonne, C. Arnaud & M. Saint-Denis.** 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 1123-1130.
- Righi, G.** 1997. Minhocas da América Latina: diversidade, função e valor. In: *XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*. SBCS, Rio de Janeiro. CD-ROM. 28 pp.
- Römke, J., C. A. M. van Gestel, S. E. Jones, J. E. Koolhaas, J. M. L. Rodrigues & T. Moser.** 2004. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME) – An instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on earthworms. *Ecotoxicology* 13: 105-118.
- Shipitalo, M. J. & R.-C. Bayon.** 2004. Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity. Pp. 183-200. In: C.A. Edwards (Ed.). *Earthworm ecology*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Shuster, W. D., S. Subler & E. L. McCoy.** 2002. The influence of earthworm community structure on the distribution and movement of solutes in a chisel-tilled soil. *Applied Soil Ecology*. 21: 159-167.
- Singer, A. C., W. Jury, E. Luepromchai, C.-C. Yahng & D. E. Crowley.** 2001. Contribution of earthworms to PCB bioremediation. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 765-776.
- Sisinho, C., M. Bulus, A. C. I. Rizzo & J. Moreira.** 2005. Avoidance test using earthworms as a complement for metal contaminated site evaluation: preliminary results. In: *XIII International Conference on Heavy Metals in the Environment – ICHMET*. Comunicação Técnica CT2005-038-00. Rio de Janeiro, RJ.
- Spadotto, C. A., M. A. F. Gomes, L. C. Luchini & M. M. Andréa.** 2004. *Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações*. Embrapa Meio Ambiente, Documentos No. 42. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Springett, J. A. & R. A. J. Gray.** 1992. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in laboratory culture. *Soil Biology and Biochemistry*. 24: 1739-1744.
- Sun, Y., X. Diao, Q. Zhang & J. Shen.** 2005. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*. 60: 699-704.
- Svendsen, C. & J. M. Weeks.** 1997. A simple low-cost field mesocosm for ecotoxicological studies on earthworms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117C: 31-40.
- van Gestel, C. A. M.** 1992. The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms: a review. Pp. 44-54. In: P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards and F. Heimbach (Eds.). *Ecotoxicology of earthworms*. Intercept Press, Andover.
- van Gestel, C. A. M. & J. M. Weeks.** 2004. Recommendations of the 3rd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 100-105.

- Vasseur, P. & C. Cossu-Leguille.** 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*. 62: 1033-1042
- Vijver, M. G., J. P. M. Vink, C. J. H. Miermans & C. A. M. van Gestel.** 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 125-132.
- Viswanathan, R.** 1997. Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms. *Chemosphere*. 35:323-334.
- Viswanathan, R., S. Ray, I. Scheunert & F. Korte.** 1988. Investigations on accumulation and biotransformation by earthworms of lindane occurring as soil contaminant. Pp.759-765. *In: R. Abbou (Ed.). Hazardous waste: detection, control, treatment.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Wild, A.** 1993. *Soils and the environment: an introduction.* Cambridge University Press. Cambridge.
- Xiao, N., B. Jing, F. Ge & X. Liu.** 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*. 62: 1366-1373.
- Zang, Y., Y. Zhong, Y. Luo & Z. M. Kong.** 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*. 108: 271-278.