

Research, Society and Development, v. 9, n. 2, e106922122, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i2.2122>

Ensaio ecotoxicológico de solo contaminado por diesel submetido à degradação pela espécie *Eisenia fétida*

Ecotoxicological tests of diesel contaminated soil subjected to degradation by *Eisenia fétida*

Ensayos ecotoxicológicos de suelo contaminado por diesel sometido a la degradación por la especie *Eisenia fétida*

Recebido: 17/11/2019 | Revisado: 19/11/2019 | Aceito: 21/11/2019 | Publicado: 26/11/2019

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6914-1176>

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: japcotta@hotmail.com

Gilmar Soares Lemos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6776-3182>

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: gilmarsoareslemos@gmail.com

Evaneide Nascimento Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8644-1760>

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: evaneide.lima@uemg.br

Resumo

Os problemas relacionados a áreas contaminadas vêm crescendo cada vez mais, no qual se pode citar a disposição inadequada de resíduos de óleo e vazamento de tanques de armazenamento de combustíveis. Muitas vezes, essas áreas encontram-se próximas a ecossistemas, causando impactos negativos ao ambiente. O objetivo deste trabalho foi realizar ensaios preliminares segundo o draft da ISO, que baseia-se no ensaio de comportamento para testar a qualidade de solos e a toxicidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) com a espécie *Eisenia fétida*. Esses ensaios são utilizados para avaliar a eficiência de um processo de biorremediação e/ou na avaliação da contaminação de áreas. A eficiência de um processo de biorremediação e/ou na avaliação da contaminação de áreas tem sido realizada apenas com o auxílio de parâmetros químicos, sem a inserção da avaliação ecotoxicológica. Assim o ensaio ecotoxicológico pode ser aplicado como um método rápido para determinar a

biodisponibilidade de contaminantes no solo para *Eisenia fétida*, em que o comportamento de fuga é usado como indicador. Amostras de solo dopadas com diferentes concentrações de óleo diesel foram analisadas por meio do ensaio de comportamento. A toxicidade do diesel pela espécie foi posteriormente confirmada pelos ensaios de letalidade. Os resultados mostraram que teores maiores que 0,01% são letais para a minhoca da espécie *Eisenia fétida*. Para teores maiores que 0,05%, as espécies fugiram da seção que continha o solo contaminado para a seção onde estava o solo controle, indicando que este primeiro pode ser considerado tóxico acima desse valor. Nota-se ainda que, ao adicionar matéria orgânica, houve um aumento da resistência da minhoca quanto à quantidade de diesel.

Palavras chave: Ensaio de comportamento; Letalidade; Biorremediação.

Abstract

Problems related to contaminated areas are growing increasingly, such as inadequate disposal of oil residues and leakage of fuel storage tanks, and often these areas are close to ecosystems, causing negative impacts on the environment. The objective of this work was to carry out preliminary tests according to the ISO draft, which is based on the behavioral test to test the soil quality and toxicity of Aromatic Polycyclic Hydrocarbons (APHs) with the species *Eisenia fétida*. These assays are used to evaluate the efficiency of a bioremediation process and / or to assess contamination of areas. The efficiency of a bioremediation process and / or the assessment of contamination of areas has been performed only with the aid of chemical parameters, without the insertion of ecotoxicological evaluation. Thus the ecotoxicological test can be applied as a rapid method to determine the bioavailability of soil contaminants for *Eisenia fétida*, where leakage behavior is used as an indicator. Soil samples doped with different concentrations of diesel oil were analyzed by the behavior test. The toxicity of diesel by the species was later confirmed by the lethality tests. The results showed that contents higher than 0.01% are lethal for *Eisenia fétida* earthworm. For contents higher than 0.05%, the species escaped from the section containing the contaminated soil to the control soil, indicating that the soil may be considered toxic above this value. It is also noted that the addition of organic matter increased the resistance of the earthworm to the amount of diesel.

Keywords: Behavior test; Lethality; Bioremediation.

Resumen

Los problemas relacionados con las áreas contaminadas están creciendo cada vez más, como la eliminación inadecuada de los residuos de petróleo y las fugas de los tanques de

almacenamiento de combustible, y a menudo estas áreas están cerca de los ecosistemas, causando impactos negativos en el medio ambiente. . El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo pruebas preliminares de acuerdo con el borrador ISO, que se basa en la prueba de comportamiento para evaluar la calidad del suelo y la toxicidad de los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs) con la especie *Eisenia fetida*. Estos ensayos se utilizan para evaluar la eficiencia de un proceso de biorremediación y/o para evaluar la contaminación de áreas. La eficiencia de un proceso de biorremediación y/o la evaluación de la contaminación de áreas se ha realizado solo con la ayuda de parámetros químicos, sin la inserción de una evaluación ecotoxicológica. Por lo tanto, la prueba ecotoxicológica se puede aplicar como un método rápido para determinar la biodisponibilidad de los contaminantes del suelo para *Eisenia fetida*, donde el comportamiento de fuga se utiliza como un indicador. Las pruebas de comportamiento analizaron muestras de suelo impurificadas con diferentes concentraciones de gasóleo. La toxicidad del diésel por parte de la especie fue confirmada posteriormente por las pruebas de letalidad. Los resultados mostraron que contenidos superiores al 0.01% son letales para la lombriz *Eisenia fétida*. Para contenidos superiores al 0.05%, la especie escapó de la sección que contiene el suelo contaminado al suelo de control, lo que indica que el suelo puede considerarse tóxico por encima de este valor. También se observa que la adición de materia orgánica aumentó la resistencia de la lombriz a la cantidad de diesel.

Palabras clave: Ensayo de comportamiento; Letalidad; Biorremediación.

1. Introdução

Neste trabalho foi feito ensaios ecotoxicológicos e obtida à concentração letal de diesel no solo para a espécie *Eisenia fétida*. Esses ensaios auxiliaram no enriquecimento para o estudo dessa espécie como biorremediadora de solos contaminados por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) utilizando a vermicompostagem. Foi realizado ensaios preliminares para testar a qualidade de solo e a toxicidade de substâncias químicas, no caso, diesel (composto derivado de petróleo contendo compostos de alto peso molecular, entre eles os HPAs), com a espécie. Nos ensaios foram utilizados solos dopados com diferentes concentrações de diesel, e posteriormente os mesmos solos dopados misturados com 50% de esterco como substrato.

Estudos de avaliação de risco ambiental, ecológico e à saúde humana podem ser realizados em áreas contaminadas, mas ainda são considerados em desenvolvimento e pouco aplicados no Brasil (Sisinno, Bulus, Rizzo, Sáfadi, & Moreira, 2006). Algumas áreas

contaminadas por substâncias químicas de importância para a saúde e ambiental têm sido frequentemente estudadas e cresce o interesse dos órgãos responsáveis no controle do impacto causado por essas áreas, uma vez que a identificação e o cadastramento dessas áreas permitem que ações preventivas ou corretivas relacionadas à possível contaminação do solo, ar, águas superficiais e subterrâneas e biota sejam estabelecidas, e os riscos minimizados.

Os frequentes derramamentos de petróleo nos solos brasileiros vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas para o tratamento de solos impactados por hidrocarbonetos. A biorremediação é uma alternativa atraente no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo; porém, a eficiência do processo é frequentemente governada pela habilidade da população microbiana nativa em assimilar e metabolizar o contaminante. No entanto, na prática, é comum se observar taxas de biodegradação menores do que aquelas estimadas em ensaios laboratoriais. De uma forma geral, o problema reside tanto na diferença da atividade microbiana encontrada quando da ampliação de escala, quanto na queda da biodisponibilidade dos contaminantes ao longo do tempo. Consequentemente, a determinação da biodisponibilidade dos substratos, e não apenas do potencial intrínseco de biodegradação, é um fator importante na estimativa da máxima biodegradação passível de ser atingida em uma área impactada.

Geralmente, a confirmação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação é realizada por meio da avaliação de resultados obtidos na quantificação de parâmetros químicos, como, por exemplo, concentração residual de hidrocarbonetos. Quando avaliado dessa forma, um processo de biorremediação não é considerado eficiente, uma vez que a concentração residual do contaminante poderá alcançar valores de referência superiores aos estabelecidos na legislação ambiental pertinente. Por outro lado, essa concentração residual pode representar apenas a fração não biodisponível do contaminante.

O entendimento das limitações associadas à biodisponibilidade dos contaminantes em solos impactados e relacionadas à degradação do poluente ao longo do tempo é atualmente considerado como uma etapa essencial na determinação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação. Vários autores, como Rizzo, Sisino, Cunha, Salgado, Barrocas, Taketani, & Giese (2014), têm destacado a importância de estimativas práticas da fração biodisponível do contaminante como parte integrante de estudos preliminares à etapa de aplicação de um processo de biorremediação. Tais estimativas são úteis não só na quantificação da fração do contaminante que realmente estará susceptível ao ataque microbiano, mas também como ferramenta a ser associada a estudos de avaliação de risco.

Atualmente, diferentes metodologias vêm sendo estudadas visando à real estimativa da fração biodisponível de compostos presentes em solos impactados. Dentre as metodologias avaliadas estão a aplicação de testes químicos baseados em técnicas de extração não exaustivas, e os ensaios com bioindicadores, na qual destaca-se os ensaios ecotoxicológicos.

No Brasil, não há exigência dos órgãos ambientais sobre o uso de um indicador biológico para a avaliação de uma área contaminada ou para comprovação da eficiência de um processo de bioremediação. A avaliação da qualidade dos solos e o acompanhamento do processo de redução da concentração dos contaminantes nesse meio têm sido realizados apenas com o auxílio de parâmetros químicos, nos quais os contaminantes de interesse, de acordo com cada caso de contaminação, são comparados com os valores de referência da Resolução CONAMA n° 420, de 2009. Esta 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 (Rizzo, *et al.*, 2014).

Entretanto, por meio dos ensaios ecotoxicológicos são verificados os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade dos compostos aos componentes vivos de um ecossistema. Dessa forma, esses ensaios podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes nas matrizes para os organismos vivos (Khalil, A. M., 2016; Gong & Perkins, 2016), o que apenas a análise química de cada composto, separadamente, não é capaz de avaliar.

Quando pretende-se realizar a avaliação da contaminação de solos por ensaios ecotoxicológicos, normalmente são utilizados métodos internacionais, como ISSO (*International Organization for Standardization*), OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) e EPA (*Environmental Protection Agency – USA*) (Sisinno, *et al.*, 2006). Esses métodos foram desenvolvidos para determinar a toxicidade de compostos adicionados em solo artificial, na qual vários interferentes são eliminados. O grande desafio na adaptação desses ensaios para a complementação da avaliação de áreas contaminadas é a substituição do substrato artificial pelas amostras de solos trazidas dessas áreas, a avaliação dos possíveis interferentes que afetam os resultados, assim como a escolha dos organismos-teste para solos com determinadas características (Sisinno, *et al.*, 2006). A NBR 15469 de 12/2015, “Ecotoxicologia: coleta, preservação e preparo de amostras, estabelece os procedimentos para coleta, preservação e preparo de amostras, serem utilizadas em ensaios ecotoxicológicos”. As condições específicas são descritas nas normas dos respectivos ensaios

e aplica-se a amostras como águas, efluentes, sedimentos, solos, resíduos sólidos, óleos e derivados.

Uma vantagem dos ensaios ecotoxicológicos é que estes detectam apenas contaminantes biodisponíveis, sendo úteis para integrar os efeitos de todos os contaminantes biodisponíveis. É importante destacar, também, que estudos realizados após processo de remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos indicaram que ainda poderá existir uma toxicidade residual causada por baixas concentrações de contaminantes ou subprodutos da biorremediação, demonstrada apenas por meio dos ensaios ecotoxicológicos. Assim, indicadores biológicos têm se tornado cada vez mais importantes na avaliação de risco ecológico e na eficiência da remediação.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios preliminares segundo o draft da ISO, que baseia-se no ensaio de comportamento para testar a qualidade de solos e a toxicidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) com a espécie *Eisenia fétida*. Esses ensaios são utilizados para avaliar a eficiência de um processo de biorremediação e/ou na avaliação da contaminação de áreas.

1.1. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Dentre os principais constituintes do dossel estão os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), na qual representam um importante grupo de micropoluentes orgânicos (xenobióticos) devido à alta capacidade de distribuição no ambiente (Pereira Netto, Moreira, Dias, Arbilla, Ferreira, Oliveira & Barek, 2000), sendo encontrados em matrizes ambientais como uma mistura extremamente complexa contendo numerosos isômeros em uma faixa extensa de concentração (Gorshkov, Marinaite, Baram & Sokov, 2003; Verweij, Booij, Satumalay, Van der Molen & Van Der Oost, 2004). HPAs são considerados indicadores de contaminação por combustíveis, por não se degradarem no ambiente. Embora existam centenas de HPAs no ambiente, somente 17 HPAs, a saber: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(e)pireno, benzo(b)fluoranteno ou b(e) acefenantrileno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno são selecionados pela US Environmental Protection Agency (US EPA) e o National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) como poluentes prioritários, devido à sua alta carcinogenicidade, mutagenicidade e persistência no ambiente (Anyakora, Ogbeche, Palmer & Coker, 2005), sendo monitorados rotineiramente para fins reguladores. Ambas as agências

citadas são do governo norte-americano, pois no Brasil não há legislação ambiental e/ou ocupacional a respeito dos HPAs.

Comparado-se os HPAs com menos de 4 anéis com os que contêm 4 ou mais, estes últimos são menos voláteis e menos solúveis em água. Os HPAs permanecem no ambiente por um longo tempo. Por essa razão, é importante monitorar os HPAs tendo 4 ou mais anéis em amostras ambientais contaminadas por combustíveis. A persistência de HPAs no ambiente solo, assim, está relacionada com o número de anéis benzênicos na molécula do HPA e este fato fica aparente porque os compostos com alta massa molar são menos susceptíveis à degradação, lixiviação e volatilização. Devido às suas propriedades físico-químicas, especialmente os HPAs de alta massa molar são dificilmente degradáveis e tendem a se acumular em diferentes compartimentos ambientais (Koh, *et al.*, 2004; Pereira Netto, *et al.*, 2000; Quantin, Joner, Portal & Berthelin, 2005; Rhodes, Farwell, Hewitt, Mackinnon & Dixon, 2005; Verweij, *et al.*, 2004).

Os HPAs são adsorvidos nas partículas sólidas do solo, pois apresentam baixa solubilidade em água e alta hidrofobicidade (Miège, Dugay & Hennion, 1998). No solo, muitos HPAs são fortemente adsorvidos na matéria orgânica, o que os torna relativamente indisponíveis para o processo de degradação. Os HPAs podem, então, permanecer no solo por muitos séculos, possuindo um longo tempo de residência, apesar dos HPAs de baixa massa molar serem praticamente perdidos por processos de degradação, volatilização e lixiviação. O efeito de sorção geralmente aumenta com o número de anéis benzênicos e o aumento da massa molecular dos HPAs, visto que isto implica forte lipofilicidade. Além disso, tem sido mostrado que a degradabilidade e a capacidade de serem extraídos diminui conforme aumenta o tempo que este permanece em contato com o solo, fenômeno chamado de envelhecimento (aging). O envelhecimento é principalmente um resultado de lenta difusão para dentro da matéria orgânica do solo, mas há outros mecanismos envolvidos, incluindo a formação de ligação residual e interação física com os microporos do solo. O processo de sorção e envelhecimento limita, por um lado, a degradabilidade dos contaminantes; por outro lado, este processo reduz a toxicidade do solo contaminado, baixando a fração disponível aos organismos vivos.

1.2. As minhocas: em especial Eisenia fétida

As minhocas são saprófitas, isto é, alimentam-se de matéria orgânica morta, especialmente vegetal, que normalmente transportam para dentro das suas galerias. As

minhocas são classificadas como oligoquetos terrestres e as que apresentam interesse para a decomposição da matéria orgânica podem ser agrupadas de acordo com sua coloração: vermelha e cinzenta. Do grupo pigmentado cinzento destaca-se a minhoca de esterco ou *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae), é um dos organismos bioindicadores que está intimamente ligada ao processo de humificação, ciclagem de nutrientes e a circulação de ar e água no solo. É uma espécie epigêica que habita os horizontes superficiais do solo com elevado teor de matéria orgânica. A escolha da minhoca é um aspecto importante na evolução da tecnologia de vermicompostagem. Dentre mais de 3.000 espécies conhecidas no mundo todo (Sharma, Pradhan, Satya & Vasudevan, 2005), a *Eisenia fétida* é a mais utilizada pelo fato de sua ampla distribuição, pela larga faixa de tolerância à variação de temperatura e por viver em resíduos orgânicos com diferentes graus de umidade, além de ser bastante resistente ao manuseio. São amplamente utilizadas na vermicompostagem, porque além de se alimentarem de resíduos orgânicos, têm elevada capacidade reprodutiva e apresentam crescimento rápido (Aquino & Nogueira, 2001; Dominguez, Velando, Ferreiro, 2005; Pereira, *et al.*, 2005).

As minhocas são consideradas uma importante fonte de estudos ecotoxicológicos devido sua habilidade em acumular e excretar metais e compostos orgânicos tóxicos. São utilizadas como bioindicadores de solos contaminados com pesticidas organoclorados (Morrison, Robertson & Alexander, 2000), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Bundy, *et al.*, 2002; Tang, Liste & Alexander, 2002) e metais tóxicos (Pereira, Marco & Arruda, 2003). A Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), em 1984, a Environmental Protection Agency (EPA), em 1992, e a International Organization for Standardization (ISO), em 1993, adotaram a espécie *Eisenia fetida* como bioindicador da toxicidade do solo. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) editou a norma NBR 15537/2007, visando padronizar o método de ensaios de ecotoxicidade aguda de agrotóxicos utilizando *Eisenia fétida* como organismo teste (Andréa, 2010). A sua habilidade em promover a concentração de metais como Cd, Cu, Pb, Zn e Ca nos seus tecidos também foi avaliada por Shahmansouri, Pourmoghadas, Parvaresh e Alidadi (2005). Os autores relatam que diferentes espécies de minhocas apresentam sensibilidades diferentes com relação ao efeito tóxico dos metais. Baseado em sua importância ecológica e resistência à toxicidade, as minhocas podem ser consideradas como uma importante fonte de informação para a avaliação de risco de contaminação ambiental (Gupta, Tewari, Srivastava, Murthy & Chandra, 2005; Lukkari, Taavisainen, Vaisanen & Haimi, 2004).

2. Metodologia

Acerca do enfoque, esta pesquisa pode ser compreendida como de cunho quantitativo, pois gráficos e tabelas foram gerados durante a execução da investigação. A pesquisa quantitativa se centra na objetividade. Influenciada pelo positivismo, considera que a realidade só pode ser compreendida com base na análise de dados brutos, recolhidos com o auxílio de instrumentos padronizados e neutros. A pesquisa quantitativa recorre à linguagem matemática para descrever as causas de um fenômeno, as relações entre variáveis, e outros. Quanto aos procedimentos técnicos, a pesquisa pode ser classificada como experimental, uma vez que, para alcançar os objetivos, análises químicas foram essenciais. De modo geral, o experimento representa o melhor exemplo de pesquisa científica. Essencialmente, o delineamento experimental consiste em determinar uma matriz de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz na matriz. Os principais autores que serviram como suporte para esta pesquisa e dão suporte a análise dos resultados são Dores-Silva, Cotta, Landgraf e Rezende (2019), Rizzo, *et al.*, 2014, Khalil, A. M., 2016; Gong & Perkins, 2016 e Sisino, *et al.*, (2006). A coleta de dados foi realizada a partir de observações experimentais.

2.1 Descrição experimental

Todas as atividades foram realizadas na Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade João Monlevade. Amostras de solos foram avaliadas utilizando-se ensaios de comportamento com a espécie *Eisenia fétida* (Oligochaeta, Lumbricidae), segundo o *draft* da ISO *Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals* (ISO, 2002). As minhocas foram adquiridas pela empresa Minhobox, localizada na cidade de Juiz de Fora-MG. O meio de criação de populações de *Eisenia fétida* foi empregado como substrato do controle negativo no ensaio realizado.

O solo foi dopado com diferentes concentrações de diesel: 2,0% (tratamento 1), 1,5% (tratamento 2), 1,0% (tratamento 3), 0,5% (tratamento 4), 0,1% (tratamento 5), 0,05% (tratamento 6), 0,01% (tratamento 7), 0,005% (tratamento 8), 0,001% (tratamento 9), 0,0005% (tratamento 10) em v/m e homogeneizado (Figura 1). O diesel foi adquirido de um posto do município de João Monlevade-MG. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo mantidas em condições controladas de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade (400

lux a 800 lux) e fotoperíodo (12h:12h). As minhocas utilizadas foram indivíduos adultos, ou seja, com clitelo desenvolvido.

Figura 1: Dopagem do solo com diesel



Fonte: Própria

O ensaio de comportamento ‘*Avoidance*’, caracterizado como métodos rápido e de procedimento simples, proporciona determinar a biodisponibilidade de substâncias químicas ou de contaminantes no solo, onde os organismos manifestam um comportamento de fuga, que é utilizado como indicador (ISO 17512-1, 2007). O ensaio já padronizado como o *Soil quality - Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemical on behavior. Part 1: Test with earthworms (2007)* faz referência à utilização de minhocas das espécies *Eisenia fétida* como organismos-teste.

O princípio desse ensaio é a exposição das minhocas simultaneamente às amostras de solo não contaminado (controle) e contaminado (dopado com diferentes teores de diesel). As duas amostras são colocadas no mesmo recipiente (em jardineiras), em seções distintas, separadas por uma divisória, formando dois compartimentos. Pesa-se 1000 g do solo a ser testado e adiciona-se 90 ml de água destilada e foi cuidadosamente homogeneizada. Após a introdução das amostras em cada lado da divisória, a mesma foi retirada. Preparado os recipientes de teste e os meios de avaliação, proceder-se-á a seleção de minhocas adultas da espécie *Eisenia fétida* das caixas de cultivo com indivíduos de no mínimo 2 meses de idade, possuidores de clitelo (estrutura reprodutora que se apresenta na epiderme sob forma de intumescência) e cujo peso úmido encontrava-se entre 200 e 300 mg. Antes do teste de comportamento, os animais selecionados foram lavados cuidadosamente sob um jato de água corrente e enxutos em papel absorvente. Subpopulações de 10 indivíduos foram tomados, pesados em balança analítica e transferidos para cada recipiente de teste e colocados na

superfície da linha de divisória, anotando-se o peso correspondente às subpopulações acrescidas (Figura 2).

Figura 2: Montagem dos experimentos



Fonte: Própria

Os recipientes de teste foram tampados com filme de PVC transparentes perfurados com alfinetes para possibilitar trocas gasosas com o ambiente externo e tiveram sua abertura superior obstruída, a fim de evitar a saída de animais. Ao final de 48 horas, o número de organismos é determinado em cada seção do recipiente. A amostra é considerada tóxica, com a função de habitat do solo limitada (ISO 17512-1, 2007) se foram encontrados mais de 80% do total de organismos expostos na amostra do solo controle.

No ensaio de letalidade foram determinados a porcentagem de indivíduos mortos e o peso final dos vivos. Os indivíduos adultos foram selecionados, pesados e expostos por um período de 14 dias aos solos dopados com 1,0%, 0,5%, 0,1%, 0,05% de diesel (v/m). Depois do 7º dia de exposição, os indivíduos mortos foram retirados e os sobreviventes mantidos até o 14º dia, quando, então, foram separados para que o percentual de mortalidade obtido fosse comparado com o controle. Ao final de 14 dias as subpopulações foram pesadas a fim de se obter a biomassa final de cada indivíduo. A diferença entre o peso inicial e o peso final compôs um conjunto de dados o qual foi submetida a uma análise e interpretação fatorial.

Foram realizados ensaios de comportamento acrescentando-se aos solos esterco bovino como substrato na proporção de 1:1v/v, ou seja, 50%. Utilizou o mesmo princípio anteriormente citado, ou seja, a exposição das minhocas simultaneamente às amostras de solo

não contaminado com substrato (controle) e contaminado com substrato (dopado com diferentes teores de diesel). Os teores de diesel no solo acompanharam os valores anteriores em v/m.

Os ensaios realizados com *Eisenia fétida* podem ser aplicados na complementação da avaliação de áreas contaminadas por HPAs. De acordo com os resultados de Hund-Rinke e Wiechering (2001), os ensaios de comportamento com amostras naturais mostram significativamente maior sensibilidade do que os ensaios com amostras contaminadas artificialmente. Entretanto, deve-se ressaltar que variáveis relacionadas à composição do solo a ser testado precisam ser sempre bem avaliadas, se o objetivo dos ensaios for à avaliação da toxicidade com amostras naturais, sem a necessidade de mistura com o solo artificial.

Esses ensaios poderão auxiliar na avaliação da capacidade de recuperação ecológica de uma área, após processo de descontaminação. Atualmente, a efetiva descontaminação de uma área é avaliada apenas por análises químicas, entretanto, não se pode afirmar que as concentrações remanescentes dos contaminantes ainda não sejam tóxicas para as espécies do solo ou mesmo que o uso de substâncias durante o processo de remediação da área não possa ter afetado seu equilíbrio ecológico (Sisinni, *et al.*, 2006).

3. Resultados e discussão

As hipóteses checadas no ensaio de comportamento foram H_0 (as espécies não distinguem entre o solo não contaminado e contaminado) versus H_1 (as espécies distinguiram e têm preferência por um dos solos). Onde:

$$X^2 = \frac{\sum(f_0 - f_e)^2}{f_e}$$

Rejeita-se a hipótese quando X^2 calculado é maior ou igual a X^2 tabelado, e aceita-se a hipótese quando X^2 calculado é menor ou igual a X^2 tabelado. Sendo que X^2 tabelado é igual a 3,841 para 5%.

A Tabela 1 mostra o número de indivíduos encontrados em cada seção dos tratamentos do ensaio de comportamento após o período de 48h e a Tabela 2 os valores do X^2 calculado para cada tratamento.

Tabela 1: Número de indivíduos encontrados em cada seção dos tratamentos do ensaio de comportamento após o período de 48h.

Tratamentos	Solo não contaminado			Solo contaminado		
	R1*	R2*	R3*	R1*	R2*	R3*
1	2 (1)	10	9	8 (8)	0	1 (1)
2	1	10 (1)	10	9 (9)	0	0
3	0	10	9	10 (10)	0	1
4	6 (6)	10	10	4	0	0
5	0	10	9	10	0	1 (1)
6	10	8	9	0	2	1
7	5	7	5	5	3	5
8	2	7	2	8	3	8
9	6	6	5	4	4	5
10	4	3	6	6	7	4

(): indivíduos mortos. *triplicata

Tabela 2: Valores do X^2 calculado para cada tratamento.

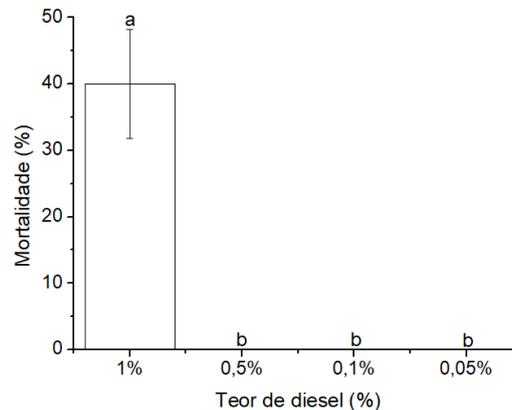
Replicata	Tratamentos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	3,6	6,4	10	0,4	10	10	0	3,6	0,4	0,4
R2	10	10	10	10	10	3,6	1,6	1,6	0,4	1,6
R3	6,4	10	6,4	10	6,4	6,4	0	3,6	0	0,4
Média	6,7	8,8	8,8	6,8	8,8	6,7	0,53	2,93	0,27	0,8

Teste do qui – quadrado para 5% de probabilidade de ocorrência, $X^2 = 3,841$

Se X^2 calculado $\geq X^2$ tabelado: Rejeita-se H_0 e se X^2 calculado $< X^2$ tabelado: Aceita-se H_0 . Nota-se através da Tabela 2 que as espécies não distinguem entre o solo não contaminado (controle) e o solo contaminado quando se tem teores de diesel menores que 0,01%. A amostra é considerada tóxica (com a função de habitat do solo limitada) se forem encontrados mais de 80% do total de organismos expostos no solo controle.

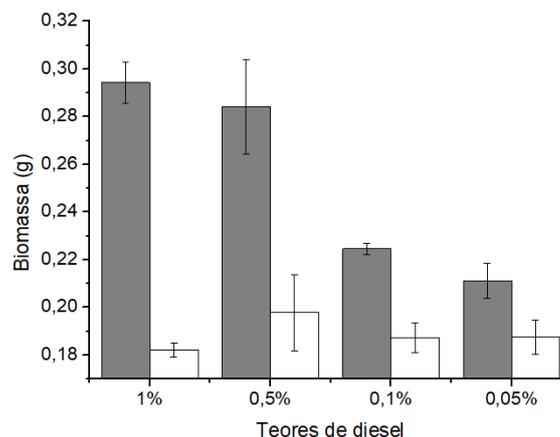
O Gráfico 1 demonstra a análise do percentual de mortalidade da *Eisenia fétida* no ensaio de letalidade. Os resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Kruskal – Wallis nível de significância de 5% de probabilidade.

Gráfico 1: Percentual de mortalidade da *Eisenia fétida* no ensaio de letalidade.



Assim fica evidente que existe uma diferença significativa entre as medianas da mortalidade das espécies para o tratamento com solo com 1% de diesel em relação aos demais tratamentos. A biomassa no início e após 14 dias, respectivamente, no ensaio de letalidade são apresentados no Gráfico 2.

Gráfico 2: Biomassa no início e após 14 dias, respectivamente, no ensaio de letalidade.



Verifica-se que em todos os tratamentos houve perda de biomassa final. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues (2008) no estudo com o herbicida Atrazina Nortox 50 SC, onde ocorreu a redução do peso das minhocas em todos os tratamentos. Pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% de probabilidade percebe-se que há

diferenças estatísticas entre todos os tratamentos em relação à perda de biomassa com exceção ao tratamento com solo dopado com 0,1% de diesel em comparação ao dopado com 0,05%.

Na utilização da compostagem, assim como da vermicompostagem para a descontaminação de solo contaminado, os resíduos orgânicos incluindo esterco, resíduo de processamento de alimento, lodo de esgoto, resíduos orgânicos industriais, entre outros, são frequentemente adicionados para suplementarem a quantidade de nutrientes e realizar a degradação orgânica no solo. A adição de resíduo orgânico pode facilitar a remoção de contaminantes orgânicos, porque eles têm um importante papel na suplementação de nutrientes e de fonte de carbono no solo contaminado. Os resíduos orgânicos podem conter uma abundante quantidade de matéria orgânica e nitrogênio, elevando assim o potencial de biorremediação (Namkoong, Hwang, Park & Choi, 2002). A razão entre solo contaminado e resíduo orgânico deve ser determinada porque uma razão inapropriada pode retardar ou inibir a atividade microbiana.

A Tabela 3 mostra o número de indivíduos encontrados em cada seção dos tratamentos do ensaio de comportamento com solo com adição de substrato (esterco bovino) após o período de 48h e a Tabela 4 os valores do X^2 calculado para cada tratamento.

Tabela 3: Número de indivíduos encontrados em cada seção dos tratamentos do ensaio de comportamento com solo com adição de substrato (esterco bovino) após o período de 48h

Tratamentos	Solo não contaminado			Solo contaminado		
	R1*	R2*	R3*	R1*	R2*	R3*
1	10	9	9	0	1 (1)	1 (1)
2	9	10	10	1	0	0
3	10 (1)	10	10	0	0	0
4	9 (1)	10	10	1 (1)	0	0
5	7	2	3	3	8	7
6	2 (1)	2	2	8	8	8
7	1	4	0	9	6	10
8	0	4	6	10	6	4
9	7	5	2	3	5	8
10	7	4	1	3	6	9

(): indivíduos mortos. *triplicata.

Tabela 4: Valores do X^2 calculado para cada tratamento.

Replicata	Tratamentos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	10	6,4	10	6,4	1,6	3,6	6,4*	10*	1,6	1,6
R2	6,4	10	10	10	3,6	3,6	0,4	0,4	0	0,4
R3	6,4	10	10	10	1,6	3,6	10*	0,4	3,6	6,4*
Média	7,6	8,8	10	8,8	2,3	3,6	5,6	3,6	1,7	2,8

Teste do qui – quadrado para 5% de probabilidade de ocorrência, $X^2 = 3,841$. *Número de indivíduos no solo contaminado é maior que no solo não contaminado.

Pela Tabela 4, observa-se que as espécies não distinguem entre o solo não contaminado + esterco (controle) e o solo contaminado + esterco quando se tem teores de diesel menores que 0,1%. Levando em conta que houve uma diluição da concentração de diesel ao acrescentar esterco ao solo, nota-se que na realidade o teor de diesel, nesse tratamento, equivale a 0,05%. Em alguns tratamentos onde o teor diesel é menor que 0,1% encontraram-se valores de X^2 maiores que 3,841, rejeitando-se assim a hipótese. Mas percebe-se, nesses casos, que o número de indivíduos encontrados no solo contaminado + esterco é maior que no solo não contaminado + esterco (controle).

Este trabalho foi a base para os estudos de Dores-Silva, 2019 quanto à concentração letal para a espécie *Eisenia fétida* para enriquecer no estudo de biorremediação de solos contaminados por diesel utilizando essa espécie. Segundo Dores-Silva, 2019, as atividades das minhocas contribuem para a biodegradação de contaminantes orgânicos, como os HPAs. O efeito da adição de minhocas foi altamente significativo em matéria de perda de HPAs no solo, e que a atividade das minhocas aumenta a remoção de HPAs, estimulando a quantidade e a atividade da biomassa microbiana do solo e melhora a sua aclimação e adaptação microbiana. No estudo, a determinação da concentração dos HPAs foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo a metodologia analítica estabelecida por Cotta, Landgraf e Rezende (2009), e percebe-se que houve uma remoção de todos os HPAs durante o processo de biorremediação. Neste estudos especificamente, fica evidente à relação entre a massa molar dos HPAs e a capacidade do processo de vermicompostagem para promover a biodegradação. Evidencia que a vermicompostagem tem

grande potencial para ser utilizada como ferramenta à biorremediação de solos impactados pelos HPAs.

A remoção de hidrocarbonetos do solo tem sido investigada utilizando glicose, serradura, esterco, biossólido e composto com bioestimulantes (Namkoong *et al.*, 2002). Os bioestimulantes são fontes de nutrientes para minhocas na vermicompostagem e contém micro-organismos que podem acelerar a remoção de hidrocarbonetos (Namkoong *et al.*, 2002). A liberação de nutrientes é lenta, reduzindo, assim, possíveis prejuízos e a contaminação do meio ambiente (Contreras-Ramos, A'lvarez-Bernal & Dendooven, 2006; Contreras-Ramos, A'lvarez-Bernal & Dendooven, 2008).

Alguns estudos, no entanto, têm relatado o uso de biossólido ou vermicomposto e/ou de minhocas para remediar os HPAs em solos contaminados. Contreras-Ramos *et al.* (2008) estudaram a remoção de três HPAs, fenantreno, antraceno e benzo[a]pireno em solo esterilizado e não esterilizado com ou sem biossólido ou vermicomposto, e com ou sem minhocas, da espécie *Ensenia fétida*, durante uma incubação aeróbia a 22,2°C durante 70 dias. A remoção de fenantreno foi mais rápida no solo adicionando-se minhocas, que em solos sem minhocas após 7 dias. Os experimentos demonstraram que o desaparecimento de fenantreno, antraceno e b[a]pireno nos solos é acelerado pela presença de minhocas. A remoção dos HPAs aumentou no solo não-esterilizado com adição de minhocas. No estudo de Contreras-Ramos *et al.* (2008) houve uma maior remoção desses HPAs no solo esterilizado com minhocas do que no solo não-esterilizado sem minhocas, mostrando que as minhocas têm maior capacidade de remoção que os microrganismos que vivem neste solo. Estes resultados sugerem que as minhocas e/ou os microrganismos que vivem em seu trato intestinal podem desempenhar um papel importante na remoção de HPAs. Verificaram também que a adição de biossólido e vermicomposto em menor grau acelera a remoção de HPAs do solo.

4. Considerações finais

Com estes estudos, afirma-se que teores maiores que 0,01% sejam letais para a minhoca da espécie *Eisenia fétida*. Para teores maiores que 0,05%, as espécies deslocaram da seção que continha o solo contaminado para a seção onde estava o solo controle, indicando que o solo pode ser considerado tóxico, apresentando sua função de habitat limitada. Nota-se ainda que, ao adicionar matéria orgânica, houve um aumento da resistência da minhoca quanto à quantidade de diesel. A adição de matéria orgânica não decomposta ao meio favorece na degradação orgânica no solo, bem como, serve de nutriente para as minhocas. A

adição de resíduo orgânico pode facilitar a remoção de contaminantes orgânicos, porque estes têm um importante papel na suplementação de nutrientes e de fonte de carbono no solo contaminado, além de servir de alimentos para as minhocas. Os resíduos orgânicos podem conter uma abundante quantidade de matéria orgânica e nitrogênio, elevando assim o potencial de biorremediação.

A biorremediação configura-se como uma das técnicas menos impactantes de remediação do solo contaminado por hidrocarbonetos, uma vez que o solo não é destruído e pode retornar novamente ao ambiente. Entretanto, esta técnica requer o acompanhamento de uma série de fatores capazes de influenciar na atividade microbológica responsável pela degradação dos compostos no solo. Um dos fatores que merece destaque no monitoramento é a biodisponibilidade dos contaminantes, visto que sua redução é talvez o objetivo mais apropriado a ser atingido no final de um processo de remediação. Essa redução na biodisponibilidade é bem demonstrada por meio de vários ensaios com bioindicadores.

Assim os resultados aqui mostrados indicaram que o ensaio de comportamento é um indicador rápido da toxicidade do solo contaminado e pode ser aplicado para fins de avaliar a capacidade de recuperação de área contaminada.

Percebe-se, também, que é comum obter resultados por meio de análises químicas tradicionais e que são operacionalmente definidos, e esses não se correlacionam com os resultados de bioensaios, que indicam de maneira mais acurada, os efeitos tóxicos de poluentes. Isto é relevante no caso de contaminações ambientais por hidrocarbonetos e tem influência direta no caso de processos de tratamento naturais do solo, como a biorremediação.

Espera-se que, além do incremento da biorremediação como técnica de tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, a aplicação de ensaios com indicadores biológicos passe a ser mais utilizada como uma das ferramentas mais adequadas para avaliar a biodisponibilidade dos contaminantes e seus riscos associados.

5. Referências

Andrea, M. M. (2010). O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. *Acta Zoológica Mexicana*, 26(2): 95-107.

Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H. (2005). Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A*, 1073(1):323–330.

Aquino, M. A.; Nogueira, E. M. (2001). *Fatores limitantes da vermicompostagem de esterco suíno e de aves e influência da densidade populacional das minhocas na sua reprodução*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 10p.

Bundy, J.G., Lenz, E.M., Osborn, D., Weeks J.M., Lindon, J. C., Nicholson, J. K. (2002). Metabolism of 4-fluoroaniline and 4-fluorobiphenyl in the earthworm *Eisenia veneta* characterized by high-resolution NMR spectroscopy with directly coupled HPLC-NMR and HPLC-MS. *Xenobiotica*, 32(6):479-490.

Contreras-Ramos, S.M., Álvarez-Bernal, D., Dendooven, L. (2006). *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution*, 141(1):396–401.

Contreras-Ramos, S.M., Álvarez-Bernal, D., Dendooven, L. (2008). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). *Soil Biology & Biochemistry*, 40(1):1954–1959.

Cotta, J. A. O., Landgraf, M. D., Rezende, M. O. O. (2009). Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. *Química Nova*, 32(1):2026–2033.

Dominguez, J., Velando, A., Ferreiro, A. (2005). Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché(1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? *Pedobiologia*, 49(1):81-87.

Dores-Silva, P.R., Cotta, J.A.O., Landgraf, M.D., Rezende, M.O.O. (2019). The application of the vermicomposting process in the bioremediation of diesel contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(7):598-604.

Gong, P., Perkins, E. J. (2016). Earthworm toxicogenomics: A renewed genome-wide quest for novel biomarkers and mechanistic insights. *Applied Soil Ecology*, 104(1):12-24.

Gorshkov, G., Marinaite, I. I., Baram, G. I., Sokov, I. A. (2003). Application of High-Performance Liquid Chromatography on Short Narrow-bore Columns to the Determination of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(8):768–774.

Gupta, S. K., Tewari, A., Srivastava, R., Murthy, R. C., Chandra, S. (2005). Potential of *Eisenia fetida* for sustainable and efficient vermicomposting of fly ash. *Water, Air, & Soil Pollution*, 163(1): 293-302.

Hund-Rinke, K. & Wiechering, H. (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. *Journal Soils & Sediments*, 1(1):15-20.

International Organization for Standardization, (2007). ISO17512-1: Soil quality: *Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemical on behavior. Part 1: test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia Andrei)*. Geneva: International Organization for Standardization.

Khalil, A. M. (2016). Physiological and genotoxic responses of the earthworm *Aporectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 74(3): 8-15.

Koh, C. H., Khim, J.S., Kannan, K., Villeneuve, D.L., Senthilkumar, K., Giesy, J.P. (2004). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-TCDD equivalents (TEQs) in sediment from the Hyeongsan River, Korea. *Environmental Pollution*, 132:489–501.

Lukkari, T., Taavisainen, M., Vaisanen, A., Haimi, J. (2004). Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(1):340-348.

Miège, C., Dugay, J., Hennion, M. C. (1998). Optimization and validation and supercritical fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge's by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatograph A*, 823(1):219-230.

Morrison, D.E., Robertson, B.K., Alexander, M. (2000). Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and dieldrin in soil. *Environmental Science Technology*, 34(1):709-713.

Namkoong, W., Hwang, E. Y., Park, J.S., Choi, J.Y. (2002). Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119(1):23-31.

Pereira, E. W. L., Azevedo, C. M. S. B., Liberalino Filho, J., Nunes, G. H. S., Torquato, J. E., Simões, B. R.(2005). Produção de vermicomposto em diferentes proporções de esterco bovino e palha de carnaúba. *Caatinga*, 18(2):112-116.

Pereira Netto, A. D., Moreira, J. C., Dias, A. E. X. O., Arbilla G., Ferreira, L. F. V., Oliveira, A. S., Barek, J. (2000). Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química Nova*, 23(6), 765-773.

Pereira, M.G., Marco A. Z., Arruda, M. Z.A. (2003). Vermicompost as a natural adsorbent material: Characterization and potentialities for cadmium adsorption. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, 14(1):39-47.

Quantin, C., Joner, E.J., Portal, J.M., Berthelin, J. (2005). PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environmental Pollution*, 134(1):315–322.

Rhodes, S., Farwell, A., Hewitt, L. M., Mackinnon, M., Dixon, D. G. (2005). The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1):247–258.

Rizzo, A. C. L., Sisino, C. L. S., Cunha, C. D., Salgado, A. M., Barrocas, P. R. G., Taketani, R. G., Giese, E. C. (2014). Aplicação de ensaios biológicos na avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo em solos impactado. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI. 55p.

Rodrigues, Sara de Souza Bittencourt. (2008). Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do

herbicida Atrazina Nortox 50 SC sobre a espécie *Eisenia foetida* (Annelida: Oligochaeta).
Inconfidentes: Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes/MG.

Shahmansouri, M. R., Pourmoghadas, H., Parvaresh, A.R., Alidadi, H. (2005). Heavy metals bioaccumulation by iranian and australian earthworms (*Eisenia fetida*) in the sewage sludge vermicomposting. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 2(1):28-32.

Sharma, S., Pradhan, K., Satya, S., Vasudevan, P. (2005). Potentiality of earthworms for waste management and in other uses – a review. *The Journal of American Science*, 1(1):4-16.

Sisinno, C.L. S., Bulus, M. R. M., Rizzo, A. C., Sáfiadi, R., Moreira, J. C. (2006). Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(2):137-140.

Tang, J., Liste, H.H., Alexander, M. (2002). Chemical assays of availability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 48(1):35-42.

Verweij, F., Booij, K., Satumalay, K., Van der Molen, N., Van Der Oost, R. (2004). Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp. *Chemosphere*, 54(1):1675–1689.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta – 50%

Gilmar Lemos Soares – 30%

Evaneide Nascimento Lima – 20%