

Ensaio ecotoxicológico com *Eisenia fétida* para avaliação de áreas supostamente contaminadas com derivados de petróleo no município de João Monlevade/MG

Ecotoxicological tests with *Eisenia fétida* for the evaluation of areas allegedly contaminated with oil derivatives in municipality of João Monlevade/MG

Pruebas ecotoxicológicas con *Eisenia fétida* para la evaluación de áreas presuntamente contaminadas con derivados del petróleo en el municipio de João Monlevade/MG

Recebido: 05/03/2020 | Revisado: 07/03/2020 | Aceito: 15/04/2020 | Publicado: 20/04/2020

Gilmar Soares Lemos

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

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: gilmarsoareslemos@gmail.com

Mônica Santos Souza e Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2276-1033>

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: monicastssouza@yahoo.com.br

Natália de Vasconcelos Soares Aleixo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0001-5515>

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: nataliavasconcelossoares@yahoo.com.br

Evaneide Nascimento Lima

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

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: evaneide.lima@uemg.br

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta

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

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: jussara.cotta@uemg.br

Resumo

A contaminação do solo pode ocorrer por disposição inadequada de resíduos sólidos, por diversas atividades industriais, e esta pode atingir direta ou indiretamente os corpos d'água,

fauna, vegetação e o ar. A contaminação do solo por derivados de petróleo tem sido intensamente estudada, mediante a preocupação em relação aos riscos ambientais, principalmente quando se trata de comercialização de petróleo e logística de produção e distribuição de seus derivados. Para avaliação dos efeitos de substâncias químicas sobre os ecossistemas terrestres os testes ecotoxicológicos podem ser empregados como uma ferramenta de monitoramento de contaminação de uma determinada área e para demonstrar a eficácia durante um processo de remediação. Em tais estudos, a espécie de minhoca *Eisenia fetida* é amplamente utilizada como organismo-teste. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar a aplicabilidade de bioensaios de ecotoxicidade utilizando *Eisenia fetida* para avaliação da toxicidade de solos de locais supostamente contaminados por derivados de petróleo da cidade de João Monlevade-MG. No teste de comportamento, apenas nas amostras do solo P1 pode ser considerado propício à sobrevivência desta espécie. A análise do percentual de mortalidade da *Eisenia fetida* no ensaio de letalidade mostrou-se que estatisticamente os resultados não possuem diferença significativa. Na análise da biomassa final, os solos P2, P3 e P4 foram considerados iguais estatisticamente e solo P5 (controle) foi diferente dos demais. Nos solos P4 foi possível observar uma mudança na coloração das minhocas, indicando um possível efeito sub-letal, causado pela presença de agentes tóxicos no solo. O teste de reprodução apontou que os solos P1 e P5 foram os únicos propícios à reprodução, o que pode ser evidenciado pela presença de casulos e filhotes. Os resultados sugerem que *Eisenia fetida* constitui-se em um bioindicador sensível para avaliação da contaminação dos ecossistemas terrestres por petróleo e derivados.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; *Eisenia fétida*; Solos contaminados.

Abstract

Soil contamination can occur due to inadequate disposal of solid waste, by various industrial activities, and this can directly or indirectly affect water bodies, fauna, vegetation and the air. The contamination of the soil by petroleum derivatives has been intensively studied, due to the concern in relation to environmental risks, mainly when it comes to the sale of oil and the logistics of production and distribution of its derivatives. To assess the effects of chemical substances on terrestrial ecosystems, ecotoxicological tests can be used as a tool for monitoring contamination in a given area and to demonstrate the effectiveness during a remediation process. In such studies, the earthworm species *Eisenia fetida* is widely used as a test organism. Thus, the objective of this work was to analyze the applicability of ecotoxicity bioassays using *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soils supposedly contaminated by oil

derivatives in the city of João Monlevade. In the behavior test, only samples of soil P1 can be considered conducive to the survival of this species. The analysis of the mortality percentage of *Eisenia fetida* in the lethality test showed that statistically the results have no significant difference; in the analysis of final biomass, soils P2, P3 and P4 were considered statistically equal and soil P5 (control) was different from the others. In P4 soils, it was possible to observe a change in the color of earthworms, indicating a possible sub-lethal effect, caused by the presence of toxic agents in the soil. The reproduction test showed that the P1 and P5 soils were the only ones favorable to reproduction, which can be evidenced by the presence of cocoons and young. The results suggest that *Eisenia fetida* is a sensitive bioindicator for assessing the contamination of terrestrial ecosystems by oil and oil products.

Keywords: Ecotoxicology; Fetid *Eisenia*; Contaminated soils.

Resumen

La contaminación del suelo puede ocurrir debido a la eliminación inadecuada de los desechos sólidos, por diversas actividades industriales, y esto puede afectar directa o indirectamente los cuerpos de agua, la fauna, la vegetación y el aire. La contaminación del suelo por derivados del petróleo se ha estudiado intensamente, debido a la preocupación en relación con los riesgos ambientales, principalmente cuando se trata de la comercialización de petróleo y la logística de producción y distribución de sus derivados. Para evaluar los efectos de las sustancias químicas en los ecosistemas terrestres, las pruebas ecotoxicológicas pueden usarse como una herramienta para monitorear la contaminación en un área determinada y demostrar la efectividad durante un proceso de remediación. En tales estudios, la especie de lombriz *Eisenia fetida* se usa ampliamente como organismo de prueba. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la aplicabilidad de los bioensayos de ecotoxicidad utilizando *Eisenia fetida* para evaluar la toxicidad de los suelos supuestamente contaminados por derivados del petróleo en la ciudad de João Monlevade. En la prueba de comportamiento, solo las muestras de suelo P1 pueden considerarse propicias para la supervivencia de esta especie. El análisis del porcentaje de mortalidad de *Eisenia fetida* en la prueba de letalidad mostró que estadísticamente los resultados no tienen diferencias significativas; En el análisis de la biomasa final, los suelos P2, P3 y P4 se consideraron estadísticamente iguales y el suelo P5 (control) fue diferente de los demás. En suelos P4, fue posible observar un cambio en el color de las lombrices de tierra, lo que indica un posible efecto sub-letal, causado por la presencia de agentes tóxicos en el suelo. La prueba de reproducción mostró que los suelos P1 y P5 fueron los únicos favorables para la reproducción, lo que puede evidenciarse por la presencia

de capullos y crías. Los resultados sugieren que *Eisenia fetida* es un bioindicador sensible para evaluar la contaminación de los ecosistemas terrestres por el petróleo y los productos derivados del petróleo.

Palabras clave: Ecotoxicología; *Eisenia fétida*; Suelos contaminados.

1. Introdução

O Brasil vem se desenvolvendo economicamente de forma acelerada provocando um aumento em seu contingente industrial. Consequentemente houve um aumento no consumo de petróleo e seus derivados, somando também a disposição inadequada de resíduos industriais, originando contaminações em diversos compartimentos ambientais tais como solo, ar e recursos hídricos. É relevante citar a ausência de uma fiscalização ambiental atuante bem como a carência de uma legislação ambiental condizente com a realidade.

A cidade de João Monlevade-MG, no final da década de 60, atingiu um elevado grau de desenvolvimento regional e tornou-se um atrativo industrial de várias empresas prestadoras de serviços para oferecer suporte a usina siderúrgica. Com isso o maior número de frotas de caminhões, carros e postos de abastecimentos de combustíveis, derivados de petróleo, proporcionaram uma situação propícia à contaminação do solo. Nesse contexto, optou-se em estudar, através de ensaios ecotoxicológicos, amostras de solos supostamente contaminados com derivados de petróleo provenientes da cidade.

Ensaio ecotoxicológicos são importantes na avaliação da qualidade do solo, sendo considerados ensaios rápidos e de baixo custo, podendo ser uma alternativa tanto para determinar os níveis aceitáveis de compostos químicos tóxicos como também para auxiliar no planejamento e execução de estratégias de processos de biorremediação (Dores-Silva, Cotta, Landgraf e Rezende, 2019; Cotta, Lemos & Lima, 2020).

Assim nesse trabalho serão aplicados ensaios ecotoxicológicos para testar a qualidade dos solos e a toxicidade de substâncias químicas, no qual será avaliado o efeito dos contaminantes derivados de petróleo pela minhoca da espécie *Eisenia fétida*, furgamente chamadas de vermelha-da-Califórnia ou minhoca de esterco.

O uso indevido do solo acarreta várias agressões que podem ser provenientes de atividades como a agricultura, a mineração, o desmatamento e a queimada, mecanização do solo, vazamentos em tanques de combustíveis derivados do petróleo entre outros. Nas cidades, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são consideradas possíveis fontes geradoras de contaminação por derivados de petróleo, podendo estes

entrarem em contato com o solo. Esses agravantes são responsáveis pela degradação do solo e de ecossistemas inteiros.

Embora alguns solos funcionem como filtros naturais, tendo a capacidade de depuração e imobilização de grande parte das impurezas nele depositadas, retendo e reciclando estes resíduos, elevadas quantidades de compostos tóxicos que são dispostos indiscriminadamente provocam a contaminação do solo e podem ser transferidos para os cursos de água e aquíferos por apresentarem baixa capacidade de degradação.

É cabível enfatizar que a proteção constitucional ao meio ambiente, estabelecida no art. 225, abrange os recursos naturais, inclusive o solo. Sobre o solo como recurso natural Milaré (2005, p.291) explica:

Diante de tanta atividade escondida, as formas de degradação do recurso solo parecem, aos olhos superficiais, não ser tão nefastas; não podemos perceber o dinamismo oculto, mas a vida dos biomas dependerá dele em grande escala, como dele dependem os habitats das espécies animais e a variedade da paisagem, as grandes florestas e as plantações de subsistência.

O autor destaca a importância do solo, não somente como uma unidade viva e dinâmica, mas como parte fundamental de um ecossistema integrado. Pelo fato de na maioria das vezes a agressão ao solo ser de natureza oculta e ocorrer de forma gradativa, os impactos ambientais gerados nesse tipo de ambiente são menos sensibilizados. Mas é preciso atentar para o fato de que o solo possui papel de suma importância para a manutenção da vida.

Solos contaminados são encontrados não apenas nas redondezas de locais de descarte de lixo e de plantas químicas, mas também nos arredores de oleodutos e postos de gasolina. Nas zonas urbanas, um dos principais poluentes dos solos é a gasolina derramada nos postos de abastecimento. Em São Paulo foi criado o Cadastro de Áreas Contaminadas da CETESB e em 2006 foram identificadas 1.822 áreas, das quais 1.352 (mais de 74%) pertenciam a postos de gasolina (CETESB, 2015). Na grande São Paulo foram 972 registros e 594 só na capital. Neste contexto, surgiu a Resolução CONAMA 273 de 29 de novembro de 2000 que dispõe sobre o licenciamento de postos revendedores, postos de abastecimento, instalações de sistemas retalhistas e postos flutuantes de combustível. Todos os postos de revenda de combustíveis, conforme a legislação brasileira, devem ser devidamente licenciados pelos órgãos ambientais competentes após cadastramento do mesmo. Em Minas Gerais, a Fundação Estadual de Meio Ambiente (FEAM) constitui o órgão responsável pela aplicação dos instrumentos legais regulamentadores.

De acordo com a resolução CONAMA 273, em caso de acidentes ou vazamentos que apresentem situações de perigo ao meio ambiente ou às pessoas, bem como na ocorrência de passivos ambientais, os proprietários, arrendatários ou responsáveis pelo estabelecimento, equipamentos, sistemas e os fornecedores de combustíveis que abastecem ou abasteceram a unidade, responderão solidariamente pela adoção de medidas para controle da situação emergencial e para o saneamento das áreas impactantes.

Atualmente a Resolução CONAMA 420 de 28 de dezembro de 2009 é a legislação específica de proteção ao solo. Esta resolução 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.

O interesse pelo estudo de solos contaminados surgiu recentemente, sendo assim, a investigação e desenvolvimento de processos e tecnologias de tratamento estão em fase inicial em busca de métodos eficientes de remediação de solo (Alves, Bandeira Borges, Prado & Pasqualetto, 2016).

Sobre remediação Mazzini (2008, p 425) explica:

[...] conjunto de medidas técnicas utilizadas para a recuperação de áreas degradadas ou contaminadas com o objetivo de eliminar, atenuar, neutralizar, imobilizar ou confinar substâncias contaminantes presentes em águas superficiais e subterrâneas, ou em solos. Pode ser realizada in-situ ou ex-situ.

A autora conceitua o termo remediação do solo como um conjunto de métodos e processos que se destinam no tratamento dos contaminantes que se encontram presentes no solo de modo a contê-los, removê-los, degradá-los, ou torná-los menos prejudiciais.

Segundo Baird (2002), as tecnologias atualmente disponíveis para a remediação de locais contaminados pertencem a uma dessas três categorias principais: retenção ou imobilização, mobilização e destruição.

Segundo Brown (2010) e Andrea (2010), as minhocas têm papel como indicadoras ambientais, ou seja, é possível determinar a qualidade do solo, seu estado de conservação, se já houve queimada ou não, por meio da observação e estudo das minhocas encontradas nele. As minhocas constituem um importante grupo de organismos indicadores de contaminação de solos por compostos químicos (Machado, 2016). Esses anelídeos possuem grande importância ecológica e econômica, devido a sua capacidade de aeração dos solos e a incorporação de matéria orgânica, mas são sensíveis e muitos exigentes quanto ao ambiente, portanto atuam

como indicadores de qualidade de solos. Como as minhocas constituem a base da cadeia alimentar de muitos animais, a contaminação desses organismos através da inserção de compostos no meio onde vivem pode acarretar conseqüências para o meio ambiente e para a fertilidade do solo causando transferência de agrotóxicos e, ou, ainda de seus metabólitos ao longo da cadeia alimentar, através do processo de biomagnificação (Papini & Andréa, 2004). As minhocas são bastante exigentes quanto à relação de umidade. Estudos e novas ferramentas estão sendo desenvolvidas para avaliar os potenciais de poluição e contaminação desses organismos no solo com compostos químicos. Bidone (2001) apud Veras; Povinelli, (2004) apresentou em seus estudos a importância da umidade para a sobrevivência das minhocas, pois necessariamente elas dependem de um teor para realizar suas atividades fisiológicas, sendo assim, preferem como “habitat” natural os solos úmidos, porosos, fofos, nitrogenados, ligeiramente alcalinos que contêm reservas de nutrientes. O experimento com minhocas para avaliação dos efeitos da exposição do solo a agentes contaminantes teve seu processo de padronização internacional iniciado a partir de 1983, quando um pesquisador utilizou a minhoca vermelha californiana (*Eisenia fetida*) para testar substâncias de pesticidas para serem colocadas em uso. De acordo com os estudos realizados, foi possível constatar que a quantidade de contaminantes dispostos no solo, não chegou a matar as minhocas, mas provocou mudanças na coloração. Esse efeito foi classificado como sub-letal, ou seja, o solo está contaminado, mas não mata os organismos nele presentes, podendo causar de alguma forma algum dano ao indivíduo (Bidone, 2001 apud Veras & Povinelli, 2004).

A implantação de testes de toxicidade utilizando organismos do solo, como a *Eisenia fetida* que interage intimamente com compostos do meio terrestre, contribui com a necessidade de controle e avaliação do grau de impacto causado pelos mais variados rejeitos dispostos no solo devido sua habilidade em acumular e excretar metais e compostos orgânicos tóxicos, além de estabelecer limites permissíveis das substâncias químicas (Pinto & Coneglian, 2008).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a aplicabilidade de bioensaios de ecotoxicidade utilizando *Eisenia fetida* para avaliação da toxicidade de solos de locais supostamente contaminados por derivados de petróleo da cidade de João Monlevade-MG.

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. Os principais autores que serviram como suporte para esta pesquisa e dão suporte a análise dos resultados são Sisino, Bulus, Rizzo, Sáfadi, & Moreira (2006) e Ramos, Castilhos & Egler (2006). A coleta de dados foi realizada a partir de observações experimentais.

2.1 Ensaios ecotoxicológicos

Os ensaios foram realizadas na Universidade do Estado de Minas Gerais, unidade João Monlevade, especificamente nos Laboratórios de Química e Águas e de Biologia. Foram utilizados para a realização dos bioensaios 5 tipos de amostras de solo, coletadas em diferentes pontos da cidade de João Monlevade. Os solos utilizados nos ensaios possuem dois tipos de textura: Arenosos (Solos Leves) e Argilosos (Solos Pesados), sendo que uma de característica arenosa e as demais, argilosas. Os solos Arenosos possuem teores de areia superiores a 70% e argila inferior a 15% e são permeáveis, leves, de baixa capacidade de retenção de água e de baixo teor de matéria orgânica. E os solos Argilosos possuem teores de argila superiores a 35%, baixa permeabilidade e alta capacidade de retenção de água. Esses solos foram coletados superficialmente em uma área de 1m², sendo que foi retirado o mesmo volume em cada área. Foram transferidos para sacos plásticos, e posteriormente peneirados para obtenção de uma amostra homogênea e representativa, retirando-se mais ou menos 10 Kg dessa mistura. As amostras ficaram armazenadas no Campus da unidade acadêmica.

Para a realização dos ensaios foram nomeados três tipos de solos: solo controle (CL), solos supostamente contaminados por derivados de petróleo (SC) e solos supostamente não contaminados por derivados de petróleo (SNC).

As amostras de solos SC foram coletadas em quatro pontos distintos da cidade, sendo: a) posto de combustível localizado próximo de uma área industrial e também próximo a um recurso hídrico (P1); b) separador de água/óleo de um lavador de peças mecânicas e automóveis localizado em uma área comercial (P2); c).garagem de veículos (P3), também localizado em uma área comercial; d) e de uma oficina mecânica (P4), localizado em bairro da periferia; sendo representados na Figura 1.

Figura 1: Local de coleta dos solos (a) P1 (posto de combustível); (b) P2 (separador de água/óleo de um lavador de peças mecânicas e automóveis); (c) P3 (garagem de veículos) e (d) P4 (oficina mecânica).



(a)



(b)



(c)



(d)

Fonte: Autoria própria (2019)

Os solos SNC, coletados especificamente para o ensaio de comportamento, foram coletados na região circunvizinha (à montante) de cada ponto de coleta dos solos SC. Este procedimento foi realizado a fim de obter solos com características próximas dos solos SC de forma que os mesmos não apresentassem possíveis contaminações. O solo controle (CL) foi coletado de um talude (P5) dentro das instalações da instituição, sendo que este estava sustentando uma pastagem com *Brachiaria sp* (Figura 2).

Figura 2: Local de coleta do solo P5 (Controle)



Fonte: Autoria própria (2019)

As minhocas *Eisenia fetida* foram adquiridas da empresa Minhobox, localizada na cidade de Juiz de Fora e foram criadas em caixas de madeira de dimensão 0,60m x 0,60m x 0,60m com esterco bovino pré curtido em uma área da instituição. As minhocas utilizadas nos ensaios foram indivíduos adultos, com clitelo desenvolvido e peso entre 300 e 600 mg.

Os ensaios de comportamento com minhocas da espécie *Eisenia fetida* foram realizados segundo o *draft* da 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)* (ISO, 2008). Os ensaios de letalidade foram realizados de acordo com a norma ISO 11268-1 – *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate* (ISO, 2012) e os ensaios de reprodução conforme a ISO 11268-2 – *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of Eisenia fetida/Eisenia andrei* (ISO, 2012).

Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se de uma estufa com fotoperíodo e termoperíodo, nas seguintes condições controladas: temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade (400 lux a 800 lux) e fotoperíodo (12 h: 12 h).

2.1.1 Ensaio de comportamento

O ensaio de comportamento teve como objetivo determinar a biodisponibilidade de substâncias químicas ou de contaminantes no solo para *Eisenia fetida*, sendo considerado um método rápido em que o comportamento de fuga é utilizado como indicador (ISO, 2002 apud Sisino et al., 2006). As minhocas foram expostas simultaneamente às amostras de solos supostamente contaminados (SC) e solos supostamente não contaminados (SNC). Para a

realização deste ensaio, utilizou-se recipientes com capacidade de 3,5 dm³ que foram divididos em duas seções. Foram colocados aproximadamente 1000g de solo SNC em um dos compartimentos e no outro, 1000g de solo SC, adicionando aproximadamente 150ml de água destilada em ambas as seções, até obtenção de um solo com umidade propícia para a sobrevivência do indivíduo.

Posteriormente, procedeu-se a seleção de minhocas adultas da espécie *Eisenia fétida* das caixas de criação com indivíduos possuidores de clitelo (estrutura reprodutora que se apresenta na epiderme sob forma de intumescência) e cujo peso úmido encontrava-se entre 300 e 600mg. Os organismos selecionados foram lavados sob um jato de água corrente e enxutos em papel absorvente. Sub-populações de 10 indivíduos foram tomados e seu peso determinado através de uma balança analítica. Em seguida, cada sub-população foi colocada na superfície da divisão entre as seções de teste. Os recipientes de ensaio foram selados com filme de PVC transparente, a fim de evitar a saída de organismos e perfurados com alfinetes para possibilitar trocas gasosas com o ambiente externo. Logo após, foram colocados na estufa (Figura 3). Ao final de 48 horas, os recipientes foram abertos, o número de organismos foram determinados em cada seção do recipiente. O número de indivíduos encontrados em cada seção compôs um conjunto de dados que foram compilados em tabela de frequências e analisados pelo teste de qui-quadrado (X^2) ($P \leq 0,05$) com a fórmula

$$X^2 = \sum \frac{[(f_o - f_e)]^2}{f_e}$$

onde fo= frequência observada e fe= frequência esperada (PEARSON 1904).

Figura 3: Preparo do ensaio de comportamento.



Fonte: Autoria própria (2019)

2.1.2 Ensaio de letalidade

O ensaio de letalidade permitiu a avaliação da toxicidade geral nas amostras de solo SC e de solo CL. Neste tipo de bioensaio foram determinados a porcentagem de indivíduos mortos e o peso final dos vivos. Foram utilizados recipientes de formato cilíndrico com capacidade de 1dm³. As tampas dos recipientes foram perfuradas para possibilitar trocas gasosas com o ambiente externo. Foram adicionados aproximadamente 1000g de cada amostra de solo nos recipientes e adicionou-se aproximadamente 150ml de água destilada até obtenção com umidade propícia para a sobrevivência dos organismos, e acondicionados uma sub-população de 10 indivíduos, previamente selecionados e pesados, sob a superfície do solo teste. Logo após, foram colocados na estufa (Figura 4).

Depois do 7º dia de exposição, os indivíduos mortos foram retirados e os indivíduos sobreviventes foram selecionados e pesados; e os recipientes de testes foram novamente colocados na estufa e mantidos até o 14º dia. No 7º dia, umidade dos corpos de prova foram reestabelecidas de forma a manter a ambiente propício aos organismos teste até o 14º dia de ensaio. Ao final de 14 dias, os recipientes foram abertos, as sub-populações foram pesadas a fim de se obter a biomassa final de cada indivíduo. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e os dados de sobrevivência não obedeceram à distribuição normal e foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Os dados de biomassa foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade com o programa de análises estatísticas SAEG (UFV).

Figura 4: Preparo dos ensaios de letalidade.



Fonte: Autoria própria (2019)

2.1.3 Ensaio de reprodução

Os ensaios de reprodução permitiram a avaliação da reprodução nas amostras de solos SC e CL. Neste tipo de bioensaio foram determinadas as quantidades de casulos e de filhotes de *Eisenia fétida*. Os recipientes utilizados possuem as mesmas dimensões daqueles usados no ensaio de letalidade. Para possibilitar trocas gasosas com o ambiente externo, as tampas também foram perfuradas. Neste ensaio, uma sub-população de 10 indivíduos, previamente selecionados e pesados, foi adicionado sob a superfície do solo teste. Os recipientes foram tampados e colocados na estufa por um tempo determinado de 56 dias (Figura 5). No 28º dia de exposição, os organismos foram retirados da estufa, pesados e os seus casulos contados. Os casulos permaneceram nos recipientes até o 56º dia do ensaio. Após esse período, os filhotes foram computados.

Figura 5: Recipiente para o ensaio de reprodução.



Fonte: Autoria própria (2019)

3. Resultados e Discussões

Na Tabela 1 encontram-se representados os resultados das características químicas e físicas dos solos SC, solos SNC e do solo CL respectivamente. A Tabela 2 exhibe os resultados obtidos nos ensaios de comportamento.

Tabela 1: pH, cátions metálicos totais trocáveis, umidade, matéria orgânica dos solos testes.

	Solos	pH ¹	Cátions trocáveis	U ² %	Teor de MO ³
			(cmolc/kg)		%
SC	P1	6,87	26,03	10,910	7,0503
	P2	6,96	16,35	11,762	11,7928
	P3	7,09	14,01	11,094	11,0091
	P4	6,76	18,41	14,163	10,9199
SNC	P1	6,63	7,92	3,6543	7,08
	P2	6,62	15,99	4,9625	14,95
	P3	6,62	15,99	4,9625	14,95
	P4	6,59	18,04	4,1854	8,17
CL	P5	6,25	9,31	3,6543	11,38

¹ potencial hidrogeniônico, ² teor de umidade (determinado em estufa à 105 – 110°C), ³ matéria orgânica (determinado por calcinação à 550°C)

Fonte: Autoria própria (2019)

Tabela 2: Número de indivíduos encontrados em cada seção teste no ensaio de comportamento após o período de 48h

Ensaio	Seções		
	SNC	SC	X ^{2*}
P1	14a	16a	0,133
P2	24a	6 b	10,8
P3	26a	4 b	16,1
P4	24a	6 b	10,8

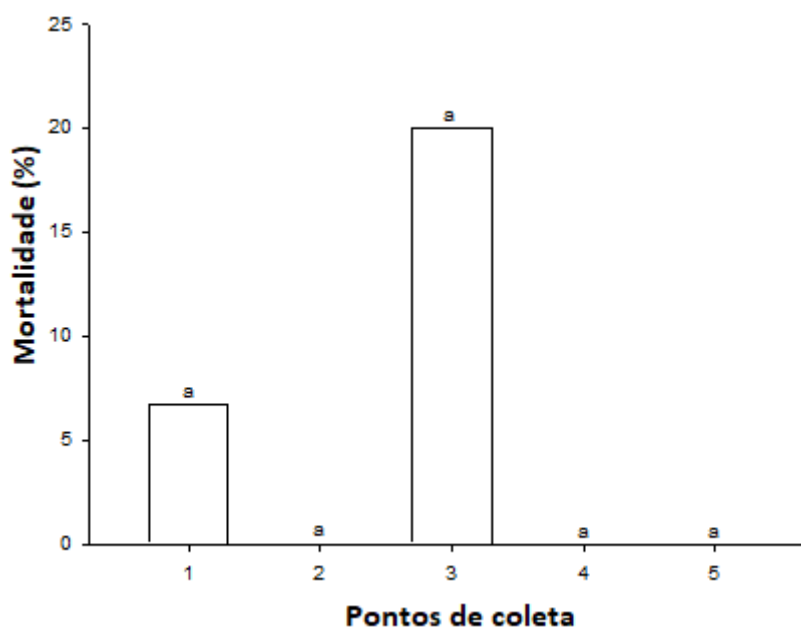
*Teste do qui-quadrado para 5% de probabilidade de ocorrência, X² = 3,841

Fonte: Autoria própria (2019)

Nota-se pela Tabela 2 que as espécies conseguem sobreviver no solo P1, pois encontram-se abaixo do valor tabelado (3,841 para 5% de probabilidade de ocorrência). Através destes resultados pode-se considerar que a reprodução da *Eisenia fetida* seria propício. Os solos P2, P3 e P4 foram considerados tóxicos, pois segundo Sisinno et al. (2006), uma amostra é avaliada como tóxica, quando há mais de 80% do total de organismos expostos no solo controle.

De acordo com os resultados de percentual de mortalidade da *Eisenia fetida*, (Gráfico 1), observa-se que não houve diferença estatística significativa neste parâmetro.

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



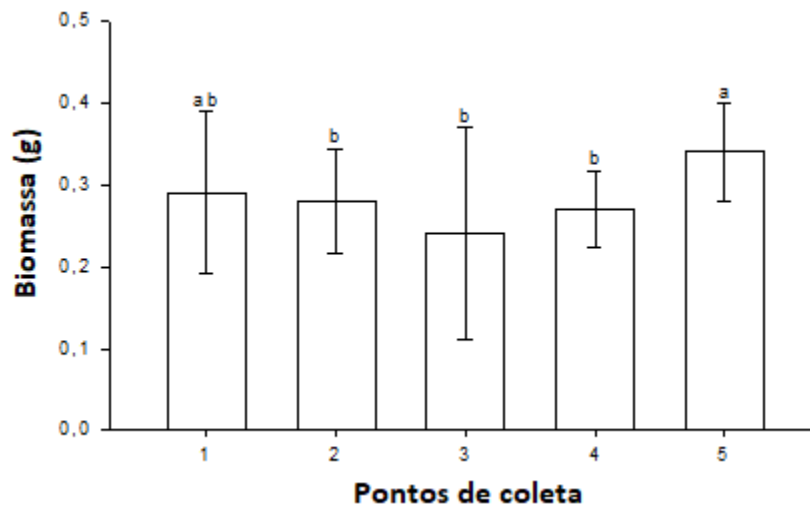
Os resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Kruskal – Wallis

Fonte: Autoria própria (2019)

Verifica-se, também, 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. Na análise da biomassa final, apresentada no Gráfico 2, foi possível observar que o solo P5 apresentou maiores valores em relação aos demais tratamentos. Possivelmente este resultado se deve ao fato do solo utilizado ser o solo controle (CL). Niemeyer e outros (2006), alcançaram resultados semelhantes ao verificar os efeitos na biomassa de *Cubaris murina* quando expostos ao solo contaminado com glifosato, nestes o peso médio final em todos os ensaios também foi menor do que no controle. Os solos P2, P3 e P4 foram semelhantes.

Durante a pesagem das minhocas do solo P4 foram observadas alterações, tais como: mudança de coloração, stress aparente com liberação de odor característico; indicando um possível efeito sub-letal, causado pela presença de agentes tóxicos no solo. Nos estudos realizados com pesticidas por pesquisadores do Centro de Tecnologia Mineral foram observados que a concentração destes contaminantes dispostos no solo não foi capaz de matar a *Eisenia fetida*, mas causou danos, como a mudança de coloração. Ramos, et al. (2006) também observou mudança de coloração da *Eisenia fetida* quando os mesmos foram expostos a certas concentrações de mercúrio metálico.

Gráfico 2: Biomassa final no ensaio de letalidade.



Os resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey nível de significância de 5% de probabilidade

Fonte: Autoria própria (2019)

No ensaio de reprodução, não foram encontrados casulos e filhotes de *Eisenia fetida* nos solos P2, P3 e P4. Sisinnio et al. (2006) afirmaram que a amostra considerada tóxica no ensaio de comportamento, obteve uma taxa de reprodução nula, pois não foram encontrados casulos, nem indivíduos jovens. Esta afirmativa pode ser comprovada nos resultados dos solos P2, P3 e P4. No solo P1 foram encontrados 9 casulos e 14 filhotes e no solo P5 foram encontrados 2 casulos e 4 filhotes, de acordo com Sissino et al. (2006) no ensaio de reprodução, as minhocas dispostas no solo controle são capazes de produzir casulos e filhotes.

4. Considerações Finais

No teste de comportamento apenas nas amostras do solo P1 pode ser considerado propício à sobrevivência desta espécie.

A análise do percentual de mortalidade da *Eisenia fetida* no ensaio de letalidade mostrou-se que estatisticamente os resultados não possuem diferença significativa; já na análise da biomassa final, os solos P2, P3 e P4 foram considerados iguais estatisticamente; e solo P5 (controle) foi diferente dos demais.

O teste de reprodução apontou que os solos P1 e P5 foram os únicos propícios à reprodução, o que pode ser evidenciado pela presença de casulos e filhotes.

Os indivíduos testados (*Eisenia fetida*) poderão ser aplicados na avaliação de risco ecológico para verificar o grau de injúria aos organismos representantes do ecossistema

afetado e sua capacidade de encontrar condições de se estabelecer novamente em uma área comprometida por contaminação química. Esta condição pode ser observada nos resultados obtidos dos ensaios ecotoxicológicos, como por exemplo, no solo P4 na qual ocorreu mudança de coloração e stress da *Eisenia fetida* com liberação de odor característico. Além disso, esses ensaios também poderão auxiliar na avaliação da capacidade de recuperação ecológica de uma área, após processo de descontaminação.

Contudo, este estudo em específico disponibiliza dados importantes que evidenciam possíveis locais de contaminação por derivados de petróleo na cidade de João Monlevade-MG. Mostrando, ainda, que a *Eisenia fetida* constitui-se em um bioindicador sensível para avaliação da contaminação dos ecossistemas terrestres por petróleo e derivados, e para possível avaliação da eficácia da biorremediação utilizando a espécie *Eisenia fetida* na eliminação da toxicidade de solos contaminados.

Referências

- Alves, O. R. Bandeira O. A., Borges, A. A., Prado, R. M., Pasqualetto, A. (2016). Biotecnologias de remediação de solos contaminados com agroquímicos. *Agrarian Academy*, Centro Científico Conhecer, 3(5):27-50.
- Andréa, M. M. (2010). O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. *Acta Zoológica Mexicana*, 26(2): 95-107.
- Baird, Collin. *Química Ambiental*. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA, nº 273, de 29 de novembro de 2000. Estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 5, 8 jan. 2001. Seção 1, p. 20-23. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=271>>. Acesso em: 14 fev. 2020.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 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. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 249, 30 dez. 2009. Seção 1, p. 81-84. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

Brown, G. G. & Domínguez, R. (2010). Papel das minhocas como indicadoras ambientais. *Acta Zoológica Mexicana*, 1(2): 1-18.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Secretaria do Estado do Meio Ambiente (2015). In: _____ Qualidade dos solos no Estado de São Paulo. Disponível em: < https://cetesb.sp.gov.br/solo/wp-content/uploads/sites/18/2013/12/Solo_Web_24-04.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2020.

Cotta, J.A.O., Lemos, G. S., Lima, E. N. (2020). Ensaio ecotoxicológico de solo contaminado por diesel submetido à degradação pela espécie *Eisenia fetida*. *Research, Society and Development*, 9(2):1-22.

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.

International Organization for Standardization, (2008). 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. Disponível em: < <https://www.sis.se/api/document/preview/910491/>> Acesso em: 14 fev. 2020.

International Organization for Standardization, (2012). ISO 11268-1 – *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*. Geneva: International Organization for Standardization. Disponível em: < <https://www.sis.se/api/document/preview/915467/>> Acesso em: 14 fev. 2020.

International Organization for Standardization, (2012). ISO 11268-2 – *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of Eisenia*

foetida/Eisenia andrei. Geneva: International Organization for Standardization. Disponível em: <
<https://www.sis.se/api/document/preview/915468/>> Acesso em: 14 fev. 2020.

Machado, B. R. (2016). *Avaliação da toxicidade ambiental do agrotóxico Glifosato em solo utilizando como bioindicador minhocas da espécie Eisenia andrei*. Trabalho de Conclusão de Curso, Pelotas:Universidade Federal de Pelotas. 63p.

Mazzini, A. L. D. de A. (2008). *Dicionário educativo de termos ambientais*. Belo Horizonte: O Lutador, 4 ed.

Milaré, Edis. (2005). *Direito do ambiente, doutrina, jurisprudência e glossário*. São Paulo: Revista dos Tribunais, 4 ed.

Niemeyer, J. C., Vilaça, D. & Da-Silva, E. M. (2006). Ensaio na Biomassa de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) Expostos ao solo com glifosato em laboratório. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(1):17-20.

Papini, S. & Andréa, M.M. (2004). Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas Simazina e Paraquat aplicados no solo. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, 8(1):67-73.

Pearson, K. (1904). *On the theory of contingency tables and its relation to association and normal correlation*. Draper's Co. Res. Mem. Biometric Ser. 1. Reprinted (1948) in Karl Pearson's Early Papers, Cambridge University Press. 230p.

Pinto, M. R.; Coneglian, C. M. In_____Pibic XVI Congresso Interno de Iniciação Científica. *Implantação de teste de toxicidade com Eisenia foetida (minhoca)*. 2008. Centro Superior de Educação Tecnológica - CESET, UNICAMP. Disponível em: <
<https://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xvicongresso/resumos/063262.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

Ramos, A. S., Castilhos, Z. C., Egler, S. G. (2006). *Avaliação ecotoxicológica de solo contaminado por mercúrio metálico utilizando o oligoqueta Eisenia foetida*. In: XIV Jornada de Iniciação Científica, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: CETEM, 2006. Disponível

em: < <http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/696/1/Alinne%20Ramos.pdf>> Acesso em: 14 fev. 2020.

Rodrigues, S. S. B. (2008). Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do herbicida Atrazina Nortox 50 SC sobre a espécie *Eisenia foetida* (Annelida: Oligochaeta). Monografia-Inconfidentes: Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes/MG – EAFI/MG. 59p.

Sisinno, C.L. S., Bulus, M. R. M., Rizzo, A. C., Sáfadi, 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.

Veras, L. R. V. & Povinelli, J. (2004). A Vermicompostagem do lodo de lagoas de tratamento de efluentes industriais consorciadas com composto de lixo urbano. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 9(3): 218-224.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Gilmar Soares Lemos – 20%

Mônica Santos Souza e Souza – 20%

Natália de Vasconcelos Soares Aleixo – 20%

Evaneide Nascimento Lima – 20%

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta – 20%