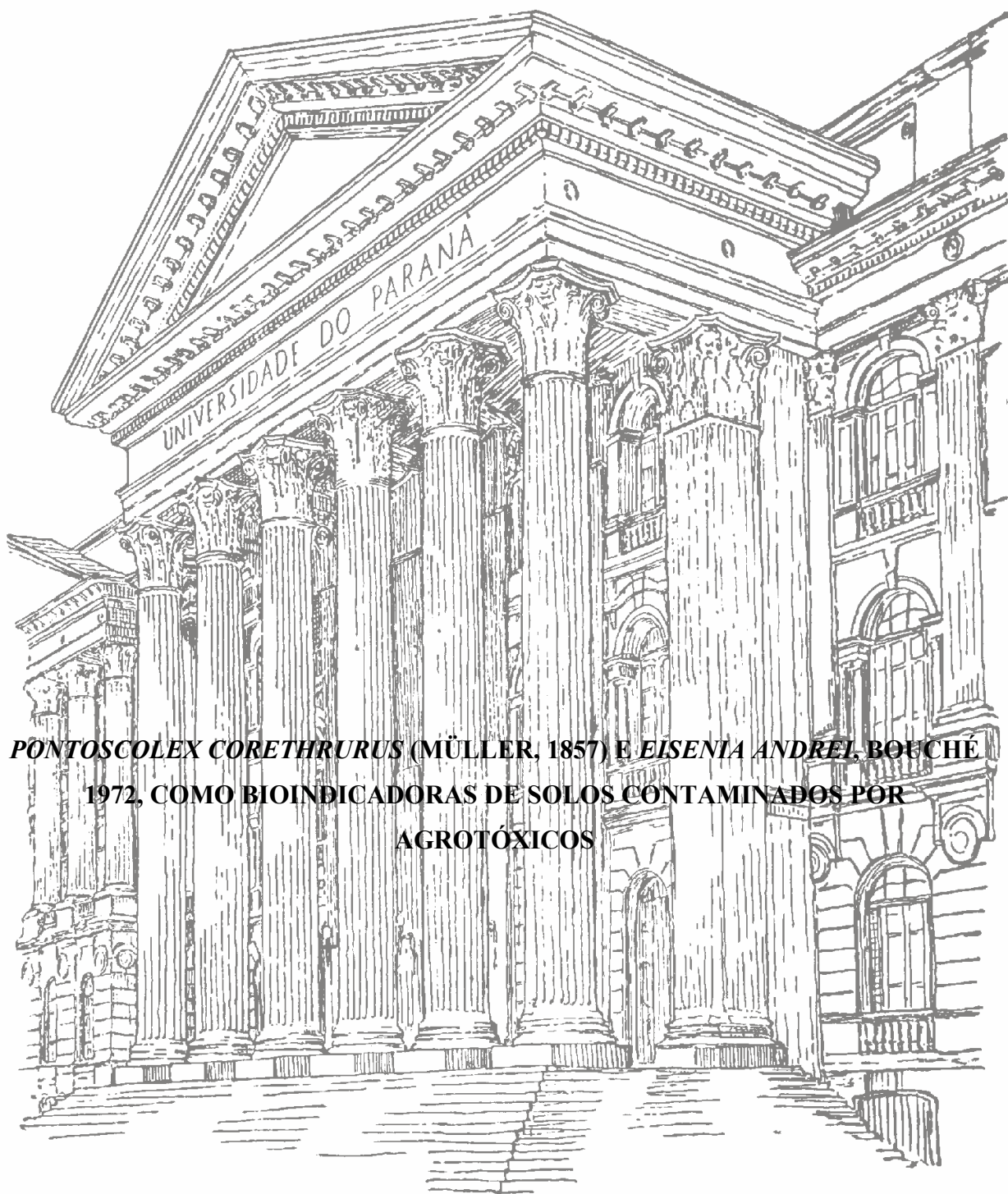


ANDRESSA CRISTHY BUCH



***PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (MÜLLER, 1857) E *EISENIA ANDREI*, BOUCHE
1972, COMO BIOINDICADORAS DE SOLOS CONTAMINADOS POR
AGROTÓXICOS**

CURITIBA

2010

ANDRESSA CRISTHY BUCH

***PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (MÜLLER, 1857) E *EISENIA ANDREI*, BOUCHÉ
1972, COMO BIOINDICADORAS DE SOLOS CONTAMINADOS POR
AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em biologia do solo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Dr. George Gardner Brown

Co-orientador: Dr. Eduardo Teixeira da Silva
Dr. Klaus Dieter Sautter

CURITIBA

2010




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGENHARIA AGRÍCOLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO(MESTRADO)
Rua dos Funcionários, 1540-Curitiba/PR-80035-050-Fone/Fax 41-3350-5648
Página: www.pgcisolo.agrarias.ufpr.br/
E-mail: pgcisolo@ufpr.br

PARECER

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **ANDRESSA CRISTHY BUCH**, sob o título: "***Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) e *Eisenia andrei* Bouché, 1972 como bioindicadoras de solos contaminados por Agrotóxicos**", requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo – Área de Concentração: Química e Biologia do Solo e Nutrição de Plantas, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haverem analisado o referido trabalho e argüido o candidato, são de Parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação, completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Ciência do Solo - Área de Concentração: "Química e Biologia do Solo e Nutrição de Plantas"**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, em Curitiba, 08 de fevereiro de 2010.


Eng.º. Agr.º. Dr. George Gardner Brown, Presidente.


Prof. Dr. José Paulo Filipe Afonso de Souza, I.º. Examinador.


Prof. Dr. Klaus Dieter Sautter, II.º. Examinador.



Dedico ao meu amado pai, Mario Marcos Buch.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES – Universidade Federal do Paraná, pela bolsa de mestrado, a valiosa colaboração dos técnicos da Ecologia- Embrapa Florestas (Irineu Antônio Olinisky, Wilson Maschio e Paulino Graff), a colaboração incessante de Ana Simone Richter do Centro Paranaense de referência em agroecologia- CPRA, a experiência e apoio do meu orientador George Gardner Brown, a Samuel W. James, José Paulo Filipe Afonso de Sousa, Cintia Carla Niva, Klaus Dieter Sautter, Eduardo Teixeira da Silva, ao estimado Lúcio Fábio Lourençato e ao amigo Edson Tadao Miaqui, pela ilustração do ciclo de vida.

RESUMO

O uso indiscriminado e abusivo de agrotóxicos vem crescendo constantemente, devido à demanda por uma maior produção agrícola mundial. Esse intenso uso do solo impacta o ambiente e a biota do solo. Para indicar em que medida esses produtos químicos são nocivos e como e onde manifestam os seus efeitos, pode-se fazer uso de testes ecotoxicológicos, com minhocas por exemplo. Esses animais são essenciais para a manutenção dos processos químicos e biológicos do solo, e revelam por meio de testes comportamentais, agudos e crônicos, os impactos dos agrotóxicos. Atualmente existem diversos protocolos padronizados pela ISO- Organização Internacional de Padronização, que utilizam organismos terrestres do solo como bioindicadores. Alguns destes foram desenvolvidos para minhocas, com as espécies padrão *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, espécies de clima temperado. Estas no entanto, podem ser menos relevantes para estudos ecotoxicológicos edáficos, já que vivem na liteira (epigeicas), e consomem matéria orgânica fresca, de origem animal e vegetal. A espécie *Pontoscolex corethrurus*, nativa de regiões tropicais, pode ser uma alternativa para testes ecotoxicológicos de maior relevância ecológica, pois vive no solo e consome matéria orgânica do solo (endogeica). Contudo, pouco se conhece a respeito da sensibilidade dessa espécie a agrotóxicos. Os objetivos principais desse trabalho foram: acompanhar o ciclo de vida e desenvolvimento de *P. corethrurus* em solo tropical artificial, e comparar a sensibilidade dessa espécie com a espécie padrão, *E. andrei*, a diversos agrotóxicos. O solo artificial tropical não ofereceu limitações para o desenvolvimento de *P. corethrurus*, enquanto havia alimento suficiente. O ciclo de vida dessa espécie é longo (12 meses) e a reprodução inicia-se 90 dias após maturação sexual, inviabilizando o uso desta em testes ecotoxicológicos crônicos, de reprodução, dentro do período padrão da ISO (56 dias). Os testes ecotoxicológicos agudos e comportamentais mostraram que a sensibilidade de *P. corethrurus* é semelhante à da espécie padrão, para a maior parte dos agrotóxicos avaliados. Contudo, até o momento, apenas três agrotóxicos foram avaliados usando essa espécie nativa, fazendo-se necessário realizar testes ecotoxicológicos usando uma ampla gama de contaminantes para comparar a sensibilidade dessas espécies, e avaliar se a espécie padrão permanece adequada para determinar a toxicidade desses contaminantes no ambiente edáfico.

ABSTRACT

The indiscriminate and excessive use of pesticides has been increasing due to demand for greater worldwide agricultural production. This intense soil use impacts the environment and the soil biota. To indicate the extent to which these chemicals are harmful and how and where their effects occur, ecotoxicological tests can be performed, e.g., using earthworms. These animals are essential for the maintenance of soil chemical and biological processes and can reveal the acute and chronic impacts of pesticides on soils. Currently there are several standardized ISO protocols that use soil organisms as bioindicators. Some of these were developed for earthworms, using the standard species *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*, both temperate-climate species. Nevertheless, these species may be less relevant for soil ecotoxicological studies, since they live in the litter (epigeic), and consume fresh organic matter of plant and animal origin. The species *Pontoscolex corethrurus*, native to tropical regions, may be an alternative for more relevant soil ecotoxicological tests, since it lives in the soil and consumes soil organic matter (endogeic). However, little is known about the sensitivity of this species to pesticides. The main objectives of this study were to follow the life cycle and development of *P. corethrurus* in tropical artificial soil, and compare its sensitivity to different pesticides with the standard species, *E. andrei*. The artificial tropical soil posed no limitations to the development of *P. corethrurus*, providing there was enough food. The life cycle of this species lasts 12 months, and reproduction begins 90 days after maturity, making it impossible to use this species in chronic ecotoxicological tests, within the period of the ISO standard (56 days). The acute and behavioral toxicological tests showed that the sensitivity of *P. corethrurus* is similar to the standard species, for most of the pesticides studied. However, up to the present time, only three pesticides have been tested, so further ecotoxicological tests should be performed using a wide range of contaminants to compare the sensitivity of these species, and to evaluate if the standard species remains adequate to determine the toxicity of these contaminants to the soil ecosystem.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Tempo para a eclosão dos casulos de *P. corethrurus* conforme a coloração (nº dias \pm desvio padrão). Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.19
- Figura 1.2. Seis gradientes de cores observados nos casulos de *Pontoscolex corethrurus*: a- branco transparente, b- branco opaco, c- branco com embrião visível a olho nú, d- branco com faixa rosa, e- rosado, f- rosa escuro. (Imagem feita em lupa binocular 2,5x).....21
- Figura 1.3. Esquema do ciclo de vida da espécie *Pontoscolex corethrurus*.22
- Figura 1.4. Foto ilustrativa da proeminência na parte dorsal próxima a região caudal de *Pontoscolex corethrurus*.23
- Figura 1.5. Biomassa individual de *Pontoscolex corethrurus*, desde o estágio de casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).26
- Figura 1.6. Ganho médio de biomassa diário (mg/dia) de *Pontoscolex corethrurus*, desde a eclosão do casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).27
- Figura 1.7. Comprimento individual de *Pontoscolex corethrurus*, desde a eclosão do casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).27
- Figura 1.8. Crescimento médio diário (mm/dia) de *Pontoscolex corethrurus*, desde a eclosão do casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).28
- Figura 2.1 Resposta de fuga ou atração para as espécies (A) *Pontoscolex corethrurus* e (B) *Eisenia andrei*, em SAT contaminado com carbendazim. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Fisher, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.40
- Figura 2.2 Resposta de fuga e atração para as espécies (A) *Pontoscolex corethrurus* e (B) *Eisenia andrei*, para as concentrações de carbofurano em SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Fisher, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.41
- Figura 2.3 Resposta de fuga e atração para as espécies (A) *Pontoscolex corethrurus* e (B) *Eisenia andrei*, para as concentrações de glifosato em SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Fisher, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.42
- Figura 2.4 Concentração-resposta de toxicidade aguda de carbendazim para *Pontoscolex corethrurus* e *Eisenia andrei* em solo artificial tropical – SAT. Valores médios e desvio

padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.44

Figura 2.5. Biomassa das espécies *Pontoscolex corethrurus* (A) e *Eisenia andrei* (B), em teste agudo, com relação as concentrações avaliadas de carbendazim em SAT.45

Figura 2.6. Alterações morfológicas visualizadas em SAT, contaminado com carbendazim. I- *Eisenia andrei* envolvida por líquido amarelado; II- *Pontoscolex corethrurus* em estágio inicial de decomposição; III- *P. corethrurus* enrolada.46

Figura 2.7. Concentração-resposta de toxicidade aguda de carbofurano para *Pontoscolex corethrurus* e *Eisenia andrei* em solo artificial tropical – SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.47

Figura 2.8. Biomassa das espécies *Pontoscolex corethrurus* (A) e *Eisenia andrei* (B), em teste agudo, com relação as concentrações avaliadas de carbofurano em SAT.....48

Figura 2.9. Alterações morfológicas visualizadas em SAT contaminado com carbofurano. I- *Pontoscolex corethrurus* com desanelamento segmentar; II- *Eisenia andrei* com corpo rompido ao meio; III- *P. corethrurus* com lesão exposta;.....49

Figura 2.10 Concentração-resposta de toxicidade aguda de glifosato para *Pontoscolex corethrurus* e *Eisenia andrei* em solo artificial tropical – SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.50

Figura 2.11. Biomassa das espécies *Pontoscolex corethrurus* (A) e *Eisenia andrei* (B), em teste agudo, com relação as concentrações avaliadas de glifosato em SAT.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Características físico-químicas do solo artificial tropical- SAT.....	17
Tabela 1.2. Parâmetros biológicos de trabalhos realizados sobre ciclo de vida de <i>Pontoscolex corethrurus</i>	20
Tabela 2.1. Características físico-químicas do solo artificial tropical- SAT.....	36
Tabela 2.2 Valores das concentrações observadas (mg i.a./ kg) para as espécies <i>E. andrei</i> e <i>P. corethrurus</i> , em solo artificial tropical, contaminado com agrotóxicos, de acordo com as respostas de fuga.....	43
Tabela 2.3. Valores das concentrações observadas (mg i.a./ kg) para as espécies <i>E. andrei</i> e <i>P. corethrurus</i> , em solo artificial tropical, contaminado com agrotóxicos, de acordo com as respostas à mortalidade.....	51

SUMÁRIO

REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 1 - CICLO DE VIDA E DESENVOLVIMENTO DE <i>PONTOSCOLEX CORETHRURUS</i> (MÜLLER, 1857) EM SOLO ARTIFICIAL TROPICAL.....	13
RESUMO.....	13
SUMMARY.....	13
1.1. INTRODUÇÃO.....	14
1.2.1. LOCAL DE COLETA.....	15
1.2.2. EXPERIMENTO PILOTO I – REPRODUÇÃO DE <i>PONTOSCOLEX CORETHRURUS</i> ADULTAS EM.....	15
SAT.....	15
1.2.3. EXPERIMENTO II - CICLO DE VIDA E DESENVOLVIMENTO DE <i>PONTOSCOLEX</i>	16
1.2.3.1. TRATAMENTOS.....	16
1.2.3.2. AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS/ MORFOLÓGICAS.....	16
1.2.3.3. VISUALIZAÇÃO MORFOLÓGICA - PROEMINÊNCIA DORSAL.....	17
1.2.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
1.2.4. COMPONENTES DO SAT.....	17
1.3.1. EXPERIMENTO PILOTO I - REPRODUÇÃO DE <i>PONTOSCOLEX CORETHRURUS</i> ADULTAS EM SAT.....	18
1.3.2. COLORAÇÃO DOS CASULOS RELACIONADOS COM O TEMPO DE ECLOSÃO.....	18
1.3.3. CICLO DE VIDA E DESENVOLVIMENTO DE <i>PONTOSCOLEX CORETHRURUS</i>	21
1.3.4. VISUALIZAÇÃO MORFOLÓGICA – PROEMINÊNCIA DORSAL.....	22
1.3.5. FORMAÇÃO DOS POROS GENITAIS (TUBERCULA PUBERTATIS) E CLITELO.....	23
1.3.6. VARIAÇÕES BIOMÉTRICAS.....	24
1.3.7. FATORES LIMITANTES AO DESENVOLVIMENTO.....	28
1.4. CONCLUSÃO.....	29
1.5. REFERÊNCIAS.....	29
RESUMO.....	33
SUMMARY.....	33
2.1. INTRODUÇÃO.....	34
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.2.1. SOLO- TESTE.....	35

2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS INGREDIENTES ATIVOS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS	36
2.2.4. TESTE ECOTOXICOLÓGICOS	37
2.2.4.1. FUGA.....	37
2.2.4.2. AGUDO - MORTALIDADE	38
2.2.5. ANÁLISE DOS DADOS.....	39
2.3. RESULTADOS	40
2.3.1. TESTE DE FUGA	40
2.3.1.1. EFEITO DO CARBENDAZIM.....	40
2.3.1.2. EFEITO DO CARBOFURANO.....	41
2.3.1.3. EFEITO DO GLIFOSATO.....	42
2.3.1.4. COMPARAÇÃO DOS AGROTÓXICOS.....	42
2.3.2. TESTE AGUDO – MORTALIDADE.....	43
2.3.2.1. EFEITO DO CARBENDAZIM.....	43
2.3.2.2. EFEITO DO CARBOFURANO.....	46
2.3.2.3. EFEITO DO GLIFOSATO.....	49
2.4. DISCUSSÃO	52
2.4.1. TESTES DE FUGA.....	52
2.4.2. TESTE AGUDO- MORTALIDADE	52
2.4.3. SENSIBILIDADE DAS ESPÉCIES	53
2.5. CONCLUSÃO	54
2.6. AGRADECIMENTOS	55
2.7. REFERÊNCIAS.....	56

INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação do solo decorrente de atividades antrópicas, consiste numa das formas de poluição, que afeta particularmente a camada superficial da crosta terrestre, causando malefícios diretos ou indiretos à vida humana, à natureza e ao meio ambiente em geral. O estudo de áreas contaminadas em solos brasileiros é ainda incipiente, quando comparado à Europa, visto que apenas recentemente foi publicada uma resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA (n.: 420 de 28 de dezembro de 2009) que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas dispersas em solos. A referida lei foi baseada nos valores orientadores estabelecidos pela CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo fundamentada na Lista Holandesa. Quando tratam-se de ensaios para avaliação de ecotoxicidade com organismos do solo, a falta de alicerce aumenta, por existir apenas uma norma para testes agudos com organismos terrestres- minhocas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) e pelo fato de os métodos descritos no Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos, organizado pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) estarem desatualizados, quando comparado ao avanço das pesquisas encontrado em outros países. Dessa forma, havendo necessidade de avaliação de áreas contaminadas, normalmente são utilizados métodos internacionalmente reconhecidos, como os da ISO (Organização Internacional de Padronização), OECD (Organização Econômica para Cooperação e Desenvolvimento) e EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) (Sisinno et al., 2006).

A resposta da toxicidade a diferentes substâncias varia entre regiões temperadas e tropicais, pela sensibilidade dos organismos-testes de cada região ser diferente (Laabs et al., 2002; Garcia, 2004; De Silva & Van Gestel, 2009).

Por meio dos ensaios ecotoxicológicos são verificados os efeitos das variáveis ambientais capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos seres vivos de um ecossistema. Estes podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes nas amostras, o que uma análise química de cada composto, separadamente, poderá não avaliar. Um dos métodos mais empregados para a avaliação dos efeitos adversos de agentes químicos sobre a biota terrestre e aquática são os testes de toxicidade, onde são utilizados organismos-alvo terrestres, de águas continentais, estuarinas e marinhas que ficam expostos aos contaminantes sob condições controladas (Cetesb, 2001). Tais estudos possibilitam o

estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas e a avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e aos corpos receptores (Römbke et al., 2006).

Alguns ensaios servem para avaliar a qualidade do solo, pelo comportamento de organismos como as minhocas, testadas por repelência a determinadas substâncias químicas. Proposto como uma alternativa rápida e fácil para ensaios ecotoxicológicos, o teste de fuga é considerado um teste de maior sensibilidade do que testes agudos, e muitas vezes, do que testes crônicos - teste de reprodução (Garcia et al., 2008). Testes de toxicidade aguda e de efeito comportamental (fuga) têm sido utilizados para avaliar a toxicidade de metais pesados e agrotóxicos, e os efeitos se manifestam dentro de períodos curtos (horas ou dias) de exposição dos organismos a um contaminante nocivo, dependendo da concentração causando a letalidade (Rodrigues & Pawlowsky, 2007).

As concentrações de contaminantes no solo influenciam diretamente as taxas de sobrevivência e de reprodução das minhocas, sendo tais taxas maiores ou menores, dependendo da espécie (Ma, 1988; Khalil et al., 1996; Reinecke et al., 2001; Lukkari et al., 2005). As espécies possuem suscetibilidades diferentes de acordo com seu metabolismo, hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, dentre outros aspectos, quando submetidos à exposições aguda e/ou crônica (Meire et al., 2007; Sisinni et al., 2007).

Portanto no presente trabalho, objetivou-se comparar duas espécies de minhocas, a espécie padrão *E. andrei* e *P. corethrurus*, a primeira nativa de regiões temperadas e a segunda de regiões tropicais, avaliando a sensibilidade destas em solos contaminados por agrotóxicos, através de testes ecotoxicológicos. E acompanhar o ciclo de vida de *P. corethrurus* em solo artificial tropical- SAT.

REFERÊNCIAS

- BRASIL - Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA n°. 420**. Diário Oficial da União de 28/12/2009. Brasília, 2009.
- CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, Brasil, 2001.
- DE SILVA, P. M. C.S.; VAN GESTEL, C. A. M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere**, 77: 1609-1613, 2009.
- GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. Ecology and Development Series; Zentrum für 17 Entwicklungs for schung, University of Bonn, 2004, 281p.
- GARCIA, M. V. B.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, 153: 450 – 456, 2008.
- KHALIL, M. A.; ABDEL-LATEIF, H. M.; BAYOUMI, B. M.; VAN STRAALLEN, N. M.; VAN GESTEL, C. A. M. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **Pedobiologia**, 40: 548–556, 1996.
- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ZECH, W. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. **Journal of Environmental Quality**, 31: 256 - 268, 2002.
- LUKKARI, T.; AATSINKI, M.; VAISANEN, A.; HAIMI, J. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, 30: 133–146, 2005.
- MA, W. C. Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. **Ecology Bulletin**, 39: 53–56, 1988.
- MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 11 (2): 188-201, 2007.
- REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A.; MABOETA, M. S. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. **Pedobiologia**, 45: 61–68, 2001.
- RODRIGUES, N. L. V. B.; PAWLOWSKY, U. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado de resíduos, classe II A – não inertes e classe II B – inertes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 12 (1): 8- 16, 2007.

- RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P.; SCHOUTENC, T.; RIEPERTD, F. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. **European Journal of Soil Biology**, 42: 61 – 64, 2006.
- SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R; RIZZO, A C; MOREIRA, J. C. 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): 41-44, 2006.
- SISINNO, C. L. S.; RIZZO, A. C. L.; BULUS, M. R. M.; ROCHA, D. A.; SORIANO, A. U.; VITAL R. L. & MOREIRA, J. C. Application of ecotoxicological tests in a preliminary evaluation of soils treated on bioreactor. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, 2 (2): 157-161, 2007.

CAPÍTULO 1 - CICLO DE VIDA E DESENVOLVIMENTO DE *PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (MÜLLER, 1857) EM SOLO ARTIFICIAL TROPICAL

Resumo. A minhoca *Pontoscolex corethrurus* é uma espécie peregrina da família Glossoscolecidae, nativa da região neotropical. O objetivo do presente trabalho foi estudar o ciclo de vida dessa espécie em solo artificial tropical (SAT), substrato utilizado em ensaios ecotoxicológicos, e a influência da disponibilidade de alimento e umidade no seu crescimento. O ciclo de vida foi avaliado em quatro tratamentos em SAT (120 g): sem alimento adicional (SAT0) (n= 24), SAT com 5 g de esterco de equino (SAT5) (n= 24), SAT com 10 g de esterco (SAT10) (n= 24) e SAT encharcado (com a umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT) com 5 g de esterco (SAT5H) (n= 24). O alimento foi disponibilizado a cada 14 dias, e os potes mantidos a temperatura ambiente, $19,8 \pm 4,1$ °C. Os indivíduos utilizados foram obtidos de 96 casulos coletados em uma área próxima à Embrapa Florestas (Colombo-PR-Brasil), de diferentes estádios de desenvolvimento. Estes foram classificados em seis gradientes de cores que foram comparados com o tempo levado para eclosão dos juvenis. Em média, os casulos brancos transparentes eclodiram aos 34 dias; os brancos opacos aos 33 dias, os casulos brancos com embrião visível à olho nú eclodiram aos 30 dias; os casulos brancos com faixa rosa, aos 20 dias; os casulos rosados, aos 15 dias; e os casulos rosa escuro, aos 6 dias. A intensidade da coloração dos casulos indicou o grau de desenvolvimento do embrião. Os casulos foram acondicionados individualmente nos diferentes tratamentos e o desenvolvimento dos animais monitorado, registrando-se semanalmente variações biométricas e mudanças morfológicas visíveis, desde a eclosão à maturação sexual e oviposição. Os animais recém-eclodidos tinham em média 0,052 g e 1,9 cm de comprimento. Até a 13ª semana todos os juvenis do tratamento SAT0 haviam morrido e atingiram no máximo 2,2 cm de comprimento e 0,013 g. Nos demais tratamentos, na 32ª semana, os animais já adultos atingiram 5,3 cm de comprimento e 0,64 g de biomassa em SAT10, enquanto que no SAT5 apresentaram 5,1 cm e 0,50 g e em SAT5H, 5,0 cm e 0,53 g. O crescimento e ganho de peso dos adultos de *P. corethrurus* responderam positivamente à oferta de alimento. *P. corethrurus* também parece ser tolerante à excessiva umidade em SAT, sendo uma espécie eurihígrica, resistente à desidratação e inundações, em contraposição às outras espécies. O ciclo de vida de *P. corethrurus* foi de 12 meses em SAT. O SAT não apresentou limitações para o desenvolvimento dessa espécie, contanto que o alimento fosse oferecido.

PALAVRAS-CHAVE. casulos, comportamento, Glossoscolecidae, minhoca, reprodução.

Summary. The earthworm *Pontoscolex corethrurus* is a peregrine species of the Glossoscolecidae family, native to the Neotropics. The aim of this study was to evaluate the life cycle of this species in tropical artificial soil (TAS), the substrate used in ecotoxicological tests, and the influence of food availability and humidity in its growth. The life cycle was evaluated in four treatments: TAS (120 g) without additional food (TAS0) (n = 24), TAS with 5 g of horse manure (TAS5) (n = 24), SAT with 10 g of manure (TAS10) (n = 24) and saturated SAT (with 25% greater soil moisture) with 5 g of manure (TAS5H) (n = 24). Food was provided every 14 days and the containers maintained at room temperature ($19,8 \pm 4,1$ °C). The individuals used were obtained from 96 cocoons collected near the Embrapa Florestas (Colombo-PR-Brazil), at different stages of development. These were classified into 6 color gradients and compared with the time taken until hatching. On average, white transparent cocoons hatched at 34 days, white opaque cocoons after 33 days, white cocoons with embryo

visible to the naked eye at 30 days; white with rosy stripe at 20 days; light pink at 15 days, and dark pink at 6 days. The intensity of the cocoon color indicated the degree of embryo development. The cocoons were placed individually in the different treatments and the development of the animals monitored by registering weekly changes in biometric and morphological characters from hatching to sexual maturation and oviposition. The newly hatched animals weighed 0,052 g and measured 1,9 cm in length. By the 13th week all juveniles in TAS0 had died and reached a maximum of 2,2 cm length and 0,013 g fresh weight. For the other treatments, at 32 weeks, the animals had reached adult stage measuring 5,3 cm and weighing 0,64 g TAS10, 5,1 cm and 0,50 g in TAS5 and 5,0 cm and 0,53 g in TAS5H. The growth and biomass gain in adults of *P. corethrurus* responded positively to food availability. *P. corethrurus* was tolerant of excessive moisture in TAS, with eurihigric behavior, surviving both dehydration and flooding, in contrast to other species. The life cycle of *P. corethrurus* was 12 months in TAS, as long as food was provided.

KEYWORDS. cocoons, behavior, earthworm reproduction, Glossoscolecidae.

1.1. INTRODUÇÃO

A espécie *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) ou minhoca-mansa como é conhecida regionalmente, vive em regiões tropicais, sendo nativa do Planalto Guianense. Possui ampla distribuição pantropical e é ubiquista, adaptando-se bem a diferentes condições ambientais (Righi, 1984; Lavelle et al., 1987, 1994; Garcia & Fragoso, 2002). É a espécie mais amplamente distribuída no Brasil (Brown et al., 2006) apresentando tolerância à alterações nas propriedades físico-químicas do solo, incluindo temperatura e umidade. Pode ser encontrada nos mais variados tipos de solos, normalmente nas camadas superiores, até 30 centímetros de profundidade, habitando desde solos arenosos a solos argilosos de terra vermelha ou preta bem como, em lugares muito úmidos tais como pântanos, e solos secos de topos de morros (Vannucci, 1953). A espécie é endogeica, geófaga, e consegue facilmente assimilar a matéria orgânica do solo, mesmo em solos muito pobres, possuindo grande habilidade para colonizar diferentes habitats (Hamoui, 1991). Em observações pessoais feitas por S. James e G. Brown, foram também encontradas em bromélias e em acumulações de matéria orgânica presentes em árvores nas ilhas Caribenhas.

A espécie tem reprodução assexuada, por meio de partenogênese, ou seja, uma única minhoca consegue produzir casulo, sem havendo contato com outro indivíduo (Edwards & Lofty, 1977). Apresentam o corpo despigmentado e em média 166 - 210 segmentos (Nair et al., 2009). O comprimento varia entre 7 a 10 cm, o diâmetro entre 3 a 4 mm e a biomassa de um adulto pode estar entre 0,6 a 3,5 g (Lavelle et al., 1987).

O uso de minhocas em testes ecotoxicológicos que almejam avaliar solos contaminados tem sido bastante recomendado, por sua importância direta na estrutura, fertilidade e qualidade do solo (Makeschin, 1998). Protocolos internacionais como os da ISO - Organização Internacional de Padronização (17512-1, 2007) e nacionais da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR – 15.537, 2007) estabelecem o uso de espécies padrão (*Eisenia fétida* e *Eisenia andrei*), nativas de regiões temperadas e de comportamento epigeico no solo. Dada à sua maior relevância ecológica em regiões tropicais, objetivou-se neste trabalho avaliar o ciclo de vida da espécie *Pontoscolex corethrurus* em solo artificial tropical (SAT), substrato utilizado em ensaios ecotoxicológicos, e a influência da disponibilidade de alimento e umidade.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Local de coleta

O experimento foi conduzido no laboratório de Ecologia da Embrapa Florestas, situado no Município de Colombo a 20 km de Curitiba/ Paraná, Brasil.

As minhocas adultas cliteladas e os casulos de *Pontoscolex corethrurus* foram coletados em área próxima à Embrapa Florestas. O solo da área foi classificado como Cambissolo, e o clima da região como sub-tropical mesotérmico úmido (Cfb), segundo a classificação de Köppen. Para coletar os animais utilizou-se pá do tipo cortadeira e enxada, e foi feita triagem manual.

1.2.2. Experimento Piloto I – Reprodução de *Pontoscolex corethrurus* adultas em SAT

A coleta das minhocas adultas cliteladas de *P. corethrurus*, foi realizada no mês de fevereiro de 2009, em área próxima a Embrapa Florestas. O ensaio teve início em fevereiro de 2009 e terminou em julho de 2009. Por ser um experimento piloto, constou de apenas 18 animais, sendo três animais colocados em seis caixas plásticas (com capacidade volumétrica de 2 litros), com 500 g de SAT. As biomassas individuais dos animais selecionados para o experimento estavam entre 0,700 g a 1,0 g. O alimento foi fornecido a cada duas semanas e consistiu de 20 g de esterco de equino, sendo este seco e previamente peneirado em malha de 4 mm, e desfaunado. Para desfaunar, o esterco foi congelado no freezer por dois dias e em seguida colocado em temperatura ambiente. Esse choque de temperatura foi realizado durante

duas semanas, até apresentar-se desfaunado. O experimento foi conduzido em temperatura ambiente de $19,8 \pm 4,1$ °C.

1.2.3. Experimento II - Ciclo de vida e desenvolvimento de *Pontoscolex corethrurus*

Para este experimento, foram utilizados 96 casulos coletados no mês de fevereiro de 2009, em área próxima à Embrapa Florestas.

O desenvolvimento dos casulos, bem como o crescimento das minhocas após eclosão, foi acompanhado em caixas gerbox (caixa plástica transparente medindo 11 x 11 x 3 cm com tampa) contendo 120 g de SAT. Em cada caixa gerbox foi colocado um casulo, sendo seu peso e cor inicial avaliados.

1.2.3.1. Tratamentos

O estudo do ciclo foi avaliado em quatro tratamentos: SAT sem alimento adicional (SAT 0), SAT com 5 g de esterco de equino (SAT 5), SAT com 10 g de esterco (SAT 10) e SAT encharcado (com a umidade 25% superior a capacidade de retenção de água do SAT) com 5 g de esterco (SAT 5H). A capacidade de retenção de água (CRA) foi ajustada a 60% para a confecção de SAT e também para a troca do mesmo, sendo determinada conforme o anexo F da ISO 17512-1, 2007. Para cada tratamento foram realizados 24 repetições. O SAT do tratamento foi trocado a cada dois meses, para evitar qualquer problema eventual quanto a mudança de pH.

A quantidade de alimento ofertado nos tratamentos foi baseada no protocolo da ISO, 11268-2 (1996) para testes ecotoxicológicos de reprodução, e a escolha do alimento, esterco de equino, foi fundamentada em observações feitas a campo, pela preferência deste pela espécie estudada. O esterco foi ofertado a cada duas semanas, estando este seco, para evitar aparecimento de fungos, e previamente peneirado em malha de 4 mm, e desfaunado.

A incubação dos casulos e as demais fases de crescimento das minhocas foram conduzidas em temperatura ambiente de $19,8 \pm 4,1$ °C.

1.2.3.2. Avaliações biométricas/ morfológicas

Avaliaram-se o número de dias para a eclosão dos casulos e, semanalmente, os estágios de desenvolvimento (fase juvenil, adulta e de reprodução), alterações comportamentais, morfológicas e variações biométricas (biomassa e comprimento) dos animais durante todo o ciclo de vida. Cada animal foi lavado com água deionizada até retirada

do muco que o cobria, secado em papel toalha e posteriormente pesado e medido. As variações dos parâmetros ambientais (pH e temperatura ambiente) foram igualmente medidas semanalmente.

1.2.3.3. Visualização morfológica - Proeminência dorsal

Durante o monitoramento do ciclo de vida, nos 96 casulos estudados, observou-se a presença de uma proeminência situada na parte dorsal do corpo dos animais, próxima a região caudal- posterior. A fim de evitar qualquer perda de animal do experimento do ciclo de vida, foram coletados 16 animais (8 animais de cada fase, juvenil e adulta) na mesma área em que inicialmente foram coletados os casulos. Os animais de cada fase foram selecionados com o mesmo comprimento, e em laboratório identificou-se a localização da proeminência. Para tal, os animais foram sacrificados com formol e em seguida realizou-se a contagem do número de segmentos em que a proeminência se localizava.

1.2.3.4. Análise estatística

Os valores biométricos gerados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade. Utilizou-se como ferramenta o programa estatístico Minitab® 15.1.0.0.

1.2.4. Componentes do SAT

Os experimentos foram conduzidos em solo artificial tropical – SAT (Garcia et al., 2004) cuja formulação foi baseada no protocolo internacional (OECD, 1984), apresentando composição de 70% de areia fina, 20% de argila branca (caulim), 10% de pó de fibra de côco triturada, e pH ajustado para $6,0 \pm 0,5$, sendo corrigido quando necessário com carbonato de cálcio. As percentagens foram baseadas em massa seca, e todos os componentes secados ao ar. As características físico-químicas do SAT estão descritas na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Características físico-químicas do solo artificial tropical- SAT.

Substrato	Características físico-químicas					
	pH (CaCl ₂)	N total (%)	C org. (%)	C/N	Matéria orgânica (%)	CRA Max. (%)
SAT	6,4	0,10	4,12	41,2	7,09	54
Esterco de equino	8,0	1,17	18,74	16,0	32,23	-

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Experimento Piloto I - Reprodução de *Pontoscolex corethrurus* adultas em SAT

No decorrer dos dois primeiros meses desde o início do experimento com as 18 minhocas adultas cliteladas, houve óbito de duas minhocas, em cada caixa plástica avaliada, permanecendo um animal por caixa, totalizando 12 animais mortos. A partir do quarto mês, em média, todas as minhocas começaram a ovipositar, e o experimento foi encerrado. A morte dos animais anteriormente citados pode estar associada ao fato de que durante esses quatro meses a troca de solo nas caixas não ter sido realizada. Segundo Vannucci (1953) e por próprias observações, é aconselhável não retirar os animais de suas caixas com muita frequência. Esse estresse possivelmente poderia ter colaborado para oviposição tardia (± 120 dias).

1.3.2. Coloração dos casulos relacionados com o tempo de eclosão

Em média os casulos brancos transparentes, possivelmente recém ovipositados, eclodiram aos 34 ± 2 dias; os casulos brancos opacos eclodiram aos 33 ± 2 dias; os casulos brancos com embrião visível à olho nú eclodiram aos 30 ± 4 dias; os casulos brancos com faixa rosa, aos 20 ± 3 dias; os casulos rosados, aos 15 ± 3 dias; e os casulos rosa escuro, aos 6 ± 4 dias (Figura 1.1). Quando o tempo para a eclosão foi comparado com as cores dos casulos, apenas os casulos brancos opacos com os brancos transparentes, e os casulos opacos com os casulos com o embrião visível não apresentaram diferença estatística. Hamoui (1991) verificou em estudo do ciclo de vida desta espécie que o tempo de maturação dos casulos até a eclosão foi de 31 a 35 dias, similar ao encontrado no presente trabalho, que foi de 34 dias, diferentemente do encontrado por Nair et al. (2009), onde a média do tempo de eclosão foi de 24 dias. O tempo de eclosão dos casulos pode estar associado à temperatura ambiente. Almaro (1983) observou, que em temperaturas mais altas, $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, o tempo para eclosão foi de 26 dias, e em temperaturas menores, $19,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi de 42 dias (Tabela 1.2). Os resultados, conforme Figura 1.1, demonstraram que a intensidade da coloração dos casulos é um bom indicador do grau de desenvolvimento do embrião, já que, conforme aumenta a intensidade da coloração do casulo, o tempo para eclosão deste diminui.

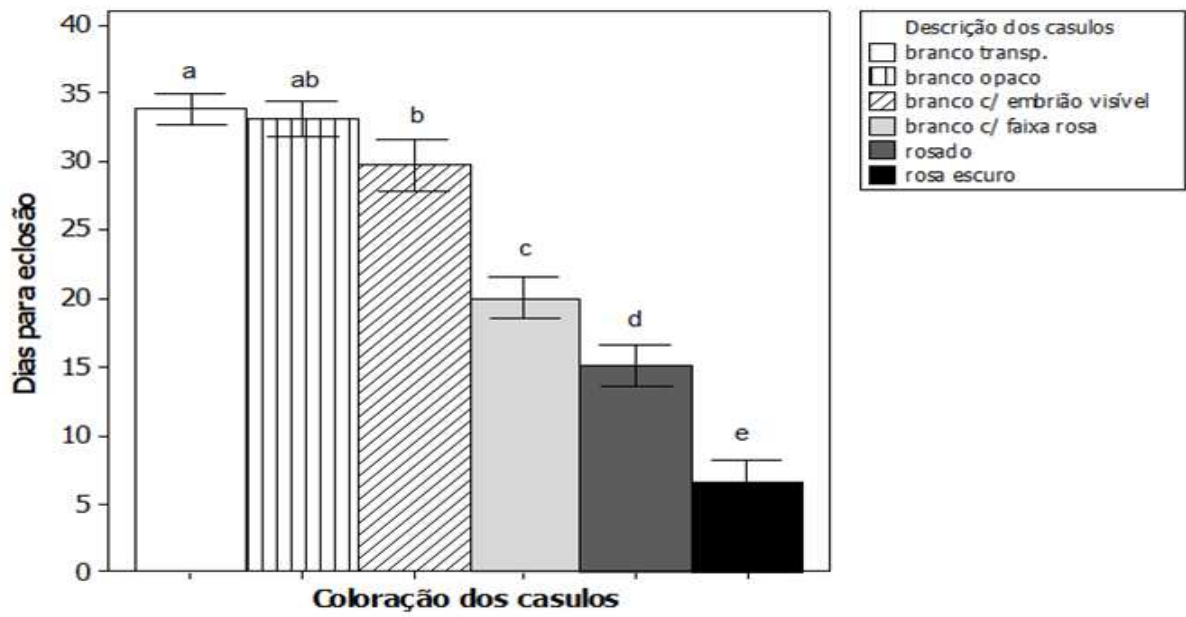


Figura 1.1. Tempo para a eclosão dos casulos de *P. corethrurus* conforme a coloração (nº dias \pm desvio padrão). Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

Tabela 1.2. Parâmetros biológicos de trabalhos realizados sobre ciclo de vida de *Pontosclex corethrurus*

Trabalho	Parâmetros (valores médios)									
	Biomassa do casulo (g)	Biomassa ao nascer (g)	Biomassa do adulto (g)	Comp. ao nascer (cm)	Comp. adulto (cm)	Maturação do casulo (dias)	Substrato	Temperatura ambiente (°C)	pH	Ciclo de vida (meses)
ALMARO, 1983	0,02 - 0,03	0,045	0,5 - 0,8	-	-	26 - 42	Solo natural - pastagem	19,2 - 27	5,9	11
LAVELLE et al., 1987	0,04	-	0,6 - 3,5	-	7 - 10	-	Solo natural - pastagem	23 - 27	-	-
GUERRA & BEZERRA, 1989	-	-	0,59 - 1,22	-	-	-	Terra, esterco de ave e de bovino	24 - 30	6,5 - 8,0	7
HAMOUI, 1991	0,04	0,048	0,8 - 1,0	2,6	8 - 8,5	22 - 35	Solo natural - muito úmido e argilo-arenoso	22 - 27	4,5 - 5,0	14 - 19
GARCIA & FRAGOSO, 2002	0,05	-	0,36 - 3,0	-	-	36	Solo natural e serragem de plantas	22 - 26	-	-
BHATTACHARJEE et al., 2002	0,0210	-	-	-	7 - 9	29	Solo natural - pastagem	28 - 32	5,9 - 7,2	-
ORTIZ-CEBALLOS et al., 2009 a, b	0,03 - 0,04	0,038	1,21	-	7 - 10	31 - 49	Solo natural - de textura média	24 - 30	-	-
PRESENTE ESTUDO	0,048	0,044 - 0,05	0,5 - 0,64	1,8 - 2,0	5 - 7	32 - 36	Solo artificial tropical	15,7 - 23,9	6,4	12



Figura 1.2. Seis gradientes de cores observados nos casulos de *Pontoscolex corethrurus*: a- branco transparente, b- branco opaco, c- branco com embrião visível a olho nú, d- branco com faixa rosa, e- rosado, f- rosa escuro. (Imagem feita em lupa binocular 2,5x).

1.3.3. Ciclo de vida e desenvolvimento de *Pontoscolex corethrurus*

Somadas as informações observadas na natureza, com as constatadas em laboratório, verificou-se que os casulos de *P. corethrurus* quando recém ovipositados no solo, ficam depositados em pequenas câmaras, entre os espaços porosos do solo. Estes casulos apresentam revestimento de muco, provavelmente com a finalidade de proteção contra choques mecânicos e dessecação, observados também por Ortiz-Ceballos et al., (2009a,b). As formas dos casulos são arredondadas, e de coloração branco transparente logo que são ovipositados. Um a dois dias depois começam a adquirir coloração branco opaco e, no decorrer de mais quatro dias, fica visível a olho nú o desenvolvimento de apenas um embrião dentro do casulo, também observado por Arunachalam (1978). Com o acréscimo de nove dias a coloração do casulo se torna rosado, indicando grau de desenvolvimento maior. Após mais cinco dias, o casulo, já está completamente rosado, e progride para uma coloração rosa escuro em uma semana, completando o desenvolvimento, indicando que a eclosão pode ocorrer a qualquer momento. A fase juvenil dura em torno de 8 meses (\pm 240 dias). A maturidade sexual, ou o início da fase adulta, evidencia-se quando uma coloração alaranjada se torna

visível a olho nú, na região do clitelo. A reprodução, que é partenogênética (Gates, 1973), ocorre após 3 meses, aproximadamente 90 dias (em desacordo com o observado no experimento piloto I), nesses três meses há formação completa do clitelo. Passado o ato de fecundação, após quatro dias ocorre à expulsão do casulo, fazendo com que inicie todo o ciclo e desenvolvimento novamente. O ciclo se completa aos ± 368 dias (± 12 meses), (Figura 1.3). Hamoui (1991) observou, em temperatura de 22 a 27 °C, que o ciclo de vida dessa espécie concluiu-se em 14 - 19 meses, entretanto Almaro (1983) evidenciou que o ciclo de vida foi de 11 meses, em temperatura de 19,2 a 27 °C (Tabela 1.2).

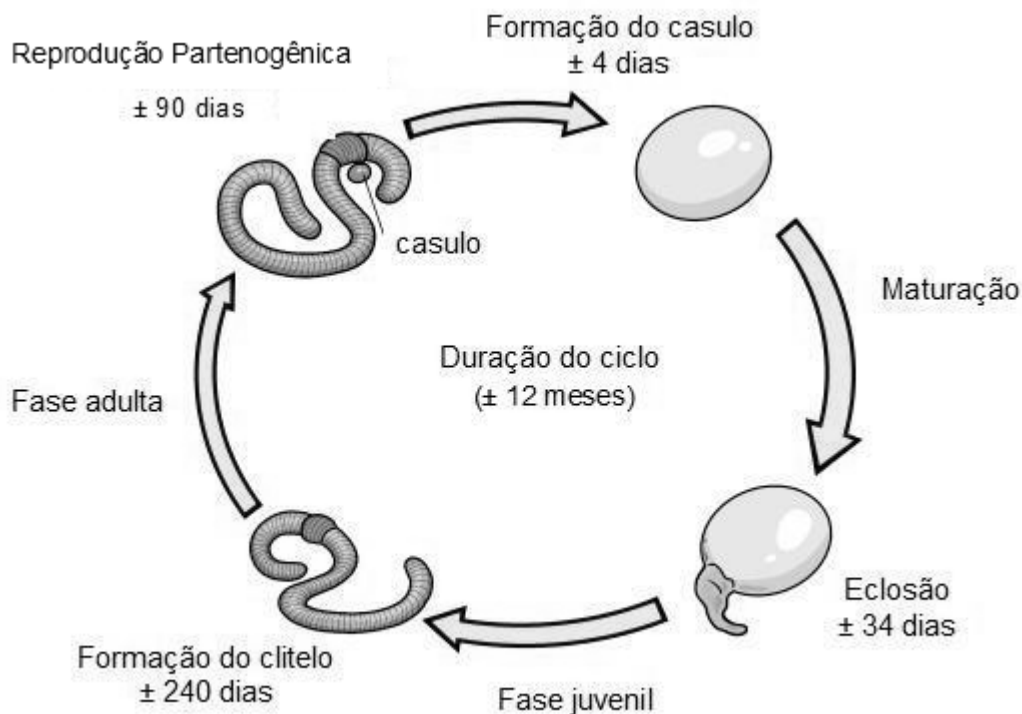


Figura 1.3. Esquema do ciclo de vida da espécie *Pontoscolex corethrurus*.

1.3.4. Visualização morfológica – Proeminência dorsal

As minhocas da espécie *Pontoscolex corethrurus* apresentam uma proeminência na parte dorsal próxima a região caudal. Essa proeminência foi detectada em 96% das minhocas estudadas no experimento do ciclo de vida, aparecendo apenas nas juvenis, de 3 a 5 semanas de idade, com tamanho de 2,5 a 3 cm de comprimento (Figura 1.4), permanecendo visível até sua fase adulta. Aparentemente, a proeminência desloca-se anteriormente à medida que o juvenil cresce, mas não foi verificado se o número de segmentos entre a proeminência e o

pigídio aumentou. Nos dezesseis animais estudados (oito adultos e oito juvenis), a localização aproximada da proeminência para animais adultos e juvenis foi entre os segmentos LXXII - CII a partir do prostômio, e no segmento XXI – XXVIII a partir do pigídio, mas observações mais detalhadas e com maior número amostral de animais, são necessárias para se avaliar se há diferença na posição da proeminência entre juvenis e adultos de idade diferentes. Pouco se conhece sobre a natureza dessa proeminência em *P. corethrurus*. Sabe-se que os oligoquetas possuem uma zona de crescimento no segmento imediatamente anterior ao pigídio, cuja função é de acrescentar novos segmentos posteriores e promover o crescimento (por exemplo, Honda et al., 2003). Uma possibilidade, talvez remota, seria de que a zona de crescimento de *P. corethrurus* esteja deslocada anteriormente.

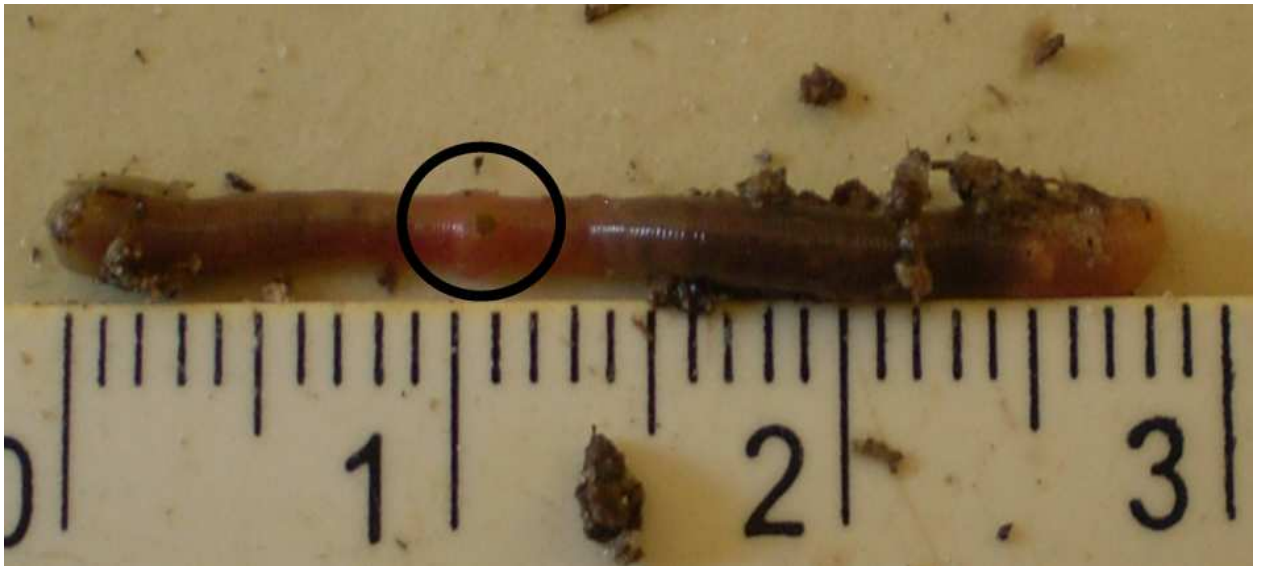


Figura 1.4. Foto ilustrativa da proeminência na parte dorsal próxima a região caudal de *Pontoscolex corethrurus*.

1.3.5. Formação dos poros genitais (tubercula pubertatis) e clitelo

A formação do clitelo, presente no segmento XV – XXIII, também observado por Righi (1990) não foi uniforme para todos os animais estudados, possivelmente, pelo fato de não apresentarem a mesma idade. O início da formação do clitelo foi de 220 a 240 dias desde a eclosão neste experimento. O aparecimento do clitelo ocorreu, em média, dois meses após os poros genitais se tornarem visíveis microscopicamente, observados também, por Hamoui (1991). Morfologicamente o clitelo apresentou coloração alaranjada.

1.3.6. Variações biométricas

O peso médio dos casulos no estudo foi de 0,048 g, a biomassa destes não estão estatisticamente correlacionados com a coloração dos casulos. Embora os gradientes de rosa apresentem mais vitelo, estando o embrião em desenvolvimento, nem sempre são mais pesados do que os casulos de gradientes de branco.

Em média as minhocas estudadas nasceram com 1,8 a 2 cm de comprimento. Sendo variável também sua biomassa, ficando em torno de 0,044 a 0,050 g.

O aumento de biomassa foi crescente linearmente, para todos os tratamentos, com exceção do tratamento SAT 0, sem adição de alimento, onde o desenvolvimento das minhocas limitou-se a 13ª semana, diminuindo em biomassa média diária de 0,013 g, estatisticamente diferente dos outros tratamentos avaliados. Mesmo sem alimentação o extenso período de tempo de sobrevivência pode ser explicado pela retirada de nutrientes do casulo que a gerou e da fonte de matéria orgânica, o pó da fibra de côco, componente do SAT. Contudo, visto que a relação C/N do solo é de 41,2%, bem mais alta quando comparada com a relação C/N do esterco de equino (16%) (Tabela 1.1), sendo este um alimento de baixa qualidade para as minhocas. A preferência por solos com alta relação C/N por *P. corethrurus* também foi observada por Kale & Krishnamoorthy (1980), na Índia.

No término da fase juvenil e início da fase adulta, na 32ª semana, a biomassa média para o tratamento SAT 5 foi de 0,50 g, similar aos animais do tratamento SAT 5H, que apresentaram 0,53 g de biomassa, mostrando que a espécie estudada suporta solos encharcados, bastante evidenciado por nossas observações na natureza. Segundo Silva & Castro (2009), *P. corethrurus* é uma espécie eurihígrica que resiste bem às inundações e à falta de água e no caso extremo de seca entra em estivação. A biomassa do tratamento SAT 10 alcançou um peso médio de 0,64 g. Valor significativamente maior que nos demais tratamentos, a partir da 1ª semana após a eclosão (Figura 1.5). Garcia & Fragoso (2002), observaram em laboratório por um período de 7 meses, que a biomassa desta espécie alimentada com *Mucuna pruriens* alcançou 3 g, e alimentada com amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) foi de 0,36 g, indicando que a alimentação afeta o crescimento de *P. corethrurus* (Tabela 1.2). No presente estudo, somente a quantidade de alimento variou, e houve efeito significativo na biomassa.

Guerra & Bezerra (1989) observaram o comportamento de *P. corethrurus* em diferentes substratos (com proporções variadas de terra, esterco de ave e de bovino) verificando que em substrato com 100% de esterco de ave puro, a produção de casulos e a

população dos animais foram superiores em relação aos outros substratos avaliados, entretanto, o ganho de biomassa por indivíduo foi inferior. Em substratos com 100% de esterco bovino a mortalidade dos animais adultos foi de 100%. No entanto quando o esterco bovino foi ofertado aos animais adultos como fonte de alimentação complementar, em criação em laboratório, utilizando como substrato solo natural (argiloso e arenoso) observou-se aumento na produção de casulos e no número de juvenis (Bernardes et al., 1998).

No tratamento SAT 0 o ganho médio diário de biomassa foi de $-0,39 \pm 1,2$ mg dia⁻¹, diferindo estatisticamente entre os demais tratamentos. Essa diferença estatística foi também observada para o SAT 10, nas primeiras 4 semanas e após a 19ª semana, este tratamento teve ganho de biomassa de $+2,7 \pm 1,1$ mg dia⁻¹. Para SAT 5 o ganho foi de $+2,1 \pm 0,47$ mg dia⁻¹, similar ao de SAT 5H que foi de $+2,2 \pm 0,47$ mg dia⁻¹, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Após a 19ª semana o ganho de peso diário nos três últimos tratamentos não diferiu estatisticamente entre si (Figura 1.6). Em experimentos com *P. corethrurus* alimentados com solo e misturas de pó de diferentes substratos como *Pinus patula*, *Macadamia tetraphyla* e *Mucuna pruriens*, o ganho de massa diária em 7 meses, foi de 3 - 10 mg dia⁻¹ (Garcia & Fragoso, 2002, 2003). Segundo Almaro (1983) o consumo médio de solo para animais adultos é de 2,7 vezes maior, do que seu próprio peso, e 4,2 vezes maior para os juvenis, representando também um aumentando na biomassa, ambos proporcionais ao aumento de temperatura (19,2 a 27 °C).

Avaliando os comprimentos dos animais nos diferentes tratamentos, observa-se que o tratamento SAT 0 apresentou diferença significativa desde a 1ª semana após a eclosão quando comparado com os outros tratamentos. Nesse tratamento os animais sobreviveram em média até a 13ª semana, quando morreram por falta de alimento, apresentando em média 2,2 cm de comprimento. O comprimento máximo dos animais até a 32ª semana foi de 5,1 cm para SAT 5, 5 cm para SAT 5H e 5,3 cm para SAT 10. Entre os tratamentos SAT 5 e SAT 5H houve diferença estatística quanto ao comprimento dos animais no intervalo da 5ª a 24ª semana. Antes desse período e após 24 semanas não houve diferença estatística significativa entre estes tratamentos. Por outro lado quando comparamos os tratamentos SAT 5H e SAT 10 observamos que a partir da 2ª semana o comprimento dos animais começa a apresentar diferença significativa. Comparando os tratamentos SAT 5 e SAT 10, houve diferença significativa a partir da 8ª semana após a eclosão dos casulos. O comprimento das minhocas aumentou com a idade, mas a partir da 28ª semana atingiram o máximo, independente do tratamento estudado (Figura 1.7). O crescimento médio diário dos animais estudados para

SAT 0 foi de $-0,02 \pm 0,06 \text{ mm dia}^{-1}$, enquanto que para os tratamentos SAT 5 de $+0,14 \pm 0,08 \text{ mm dia}^{-1}$ e SAT 5H foi de $+0,13 \pm 0,08 \text{ mm dia}^{-1}$, e para SAT 10 foi de $+0,15 \pm 0,1 \text{ mm dia}^{-1}$. Estatisticamente não houve diferença entre SAT 10 e SAT 5 na 1^a à 7^a semana e também entre a 15^a e 32^a. Entre a 8^a e 14^a semana tiveram diferença estatística. Comparando os tratamentos SAT 5H e SAT 10 houve diferença até a 23^a semana. Da 24^a semana em diante não apresentaram diferença. Entre SAT 5 e SAT 5H não houve diferença estatística a partir da 23^a semana (Figura 1.8).

No presente estudo, os adultos de *Pontosclex corethrurus* apresentaram comprimento mínimo de 5 cm e máximo de 7 cm no início da fase adulta, correspondente a idade de 32 semanas. Inferior aos 7 - 10 cm citados em trabalhos já realizados por Righi e demais pesquisadores (Lavelle et al., 1987; Bhattacharjee, 2002) (Tabela 1.2). Segundo comunicação pessoal de Samuel James, taxônomo, essa diferença pode ser uma característica morfológica regional da espécie, mas há necessidade de estudos complementares para comprovar essa hipótese.

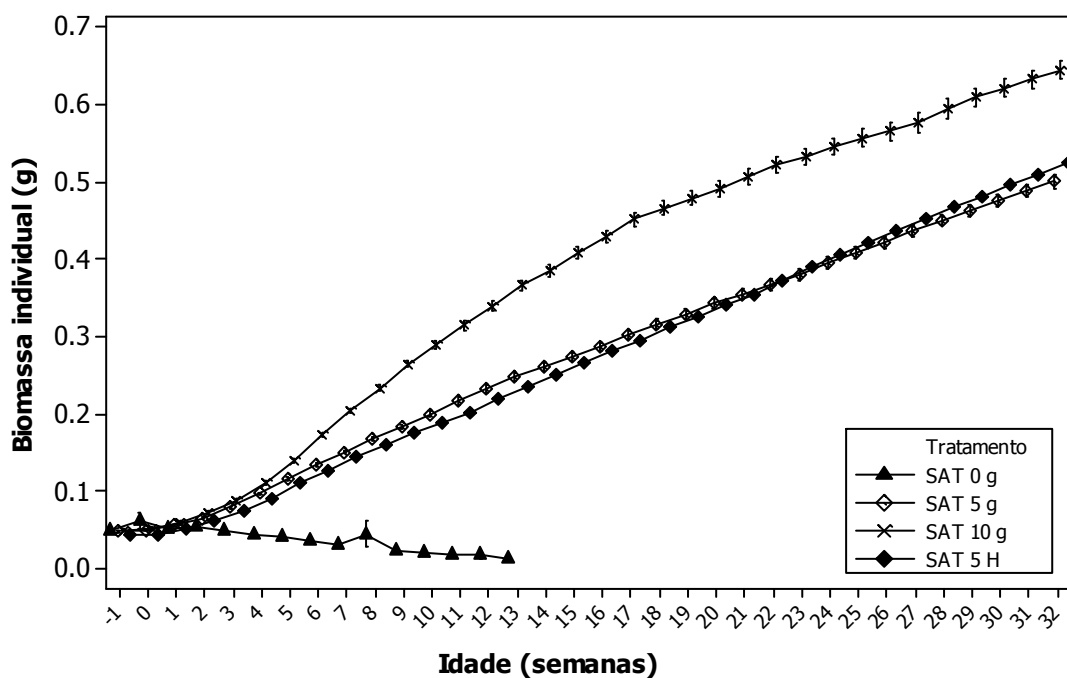


Figura 1.5. Biomassa individual de *Pontosclex corethrurus*, desde o estágio de casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).

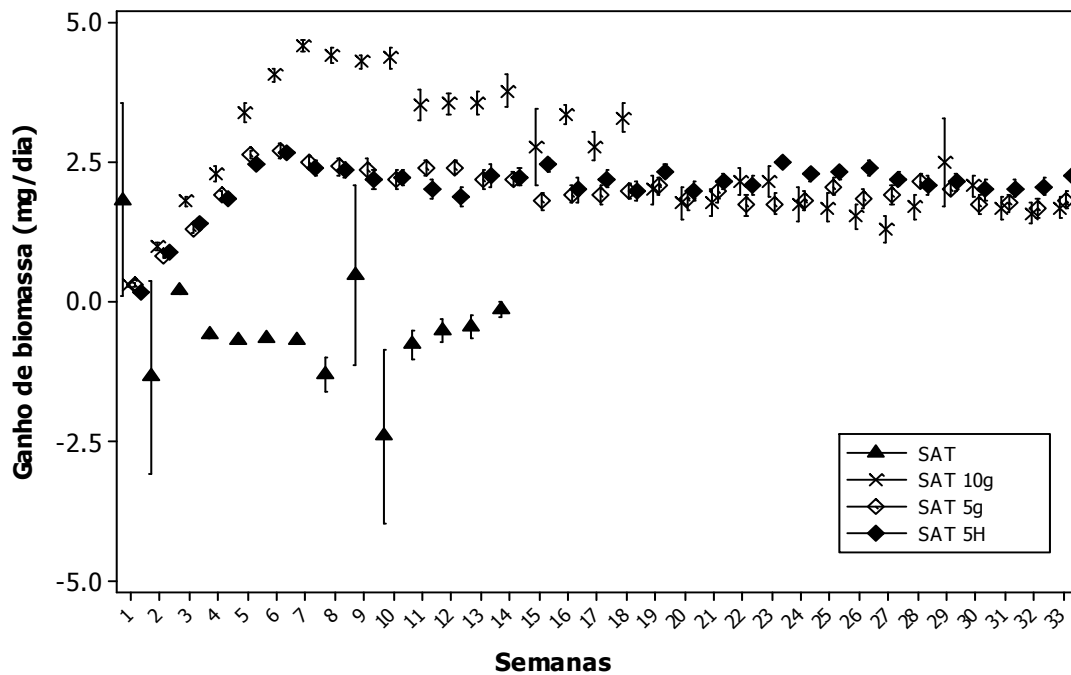


Figura 1.6. Ganho médio de biomassa diário (mg/dia) de *Pontoscolex corethrurus*, desde a eclosão do casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).

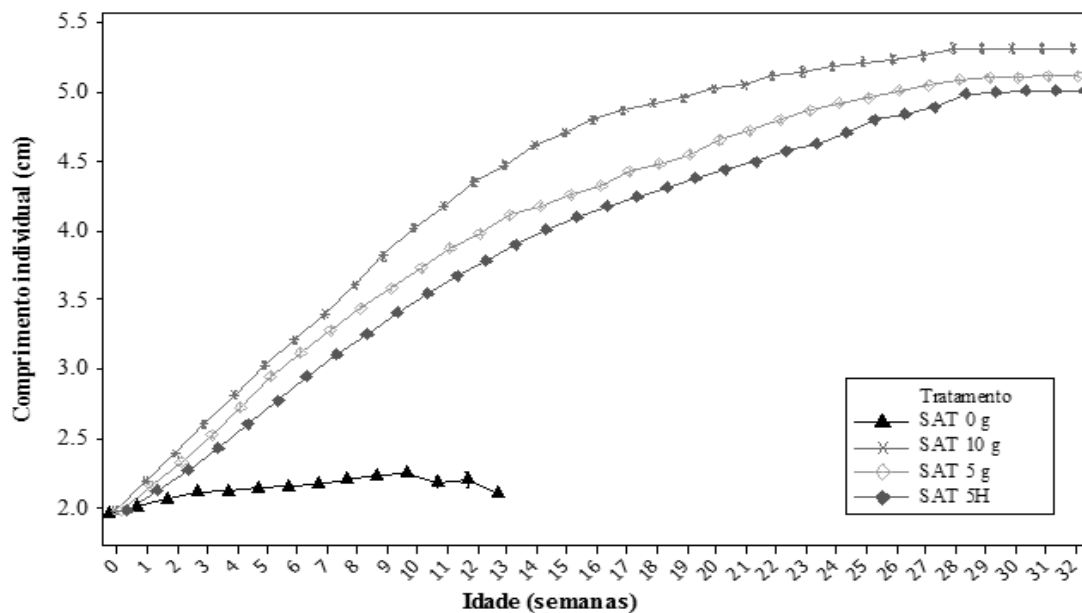


Figura 1.7. Comprimento individual de *Pontoscolex corethrurus*, desde a eclosão do casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).

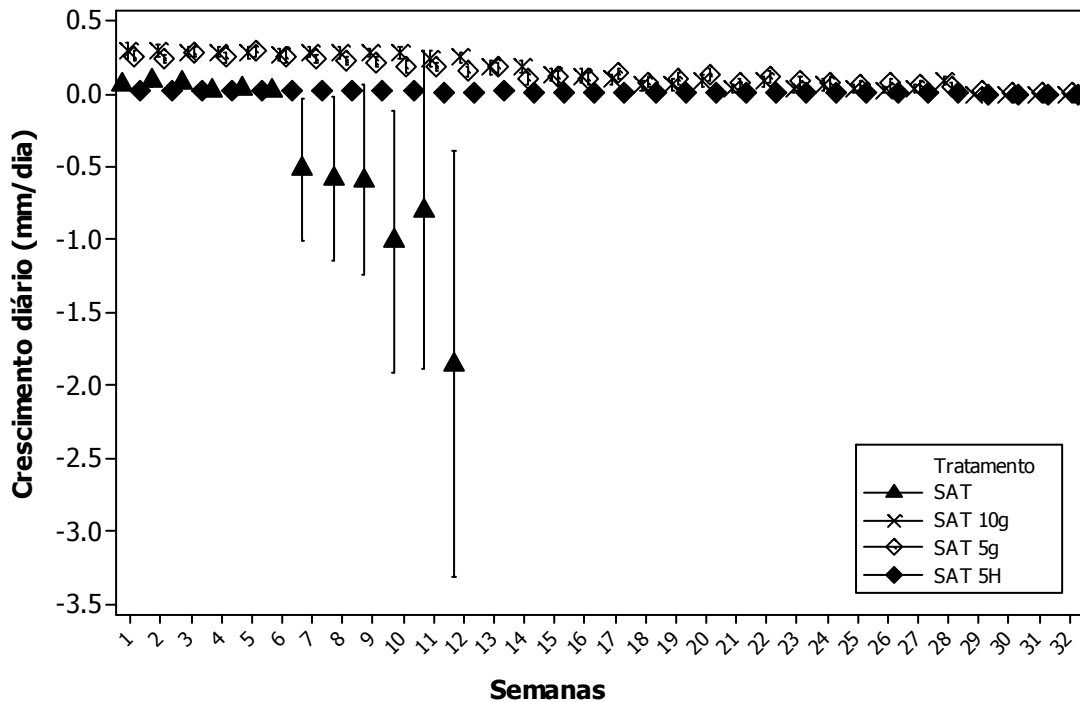


Figura 1.8. Crescimento médio diário (mm/dia) de *Pontoscolex corethrurus*, desde a eclosão do casulo até a fase adulta, em quatro tratamentos: SAT 0 g de esterco, SAT 5g de esterco, SAT 10 g de esterco e SAT 5H (com 5 g de esterco e umidade 25% superior à capacidade de retenção de água do SAT).

1.3.7. Fatores limitantes ao desenvolvimento

O valor de pH do SAT com o alimento (esterco de equino) ficou em torno de 6,5 a 7,5, faixa de pH semelhante à encontrado por Lavelle et al. (1981) em solo natural em Laguna Verde, México, onde o caráter básico (pH entre 6,2 - 8,1) do solo não limitava o desenvolvimento de *P. corethrurus*. Segundo Bernardes et al. (1997) a espécie tem grande capacidade de adaptação a solos de diferentes valores de pH.

A temperatura ambiente em laboratório a qual a espécie foi incubada oscilou entre 15,7 a 23,9 °C (temperatura das estações de inverno a verão) não sendo limitante para seu desenvolvimento, diferentemente do observado por Lavelle et al. (1987), Bernardes & Kiehl (1994) atribuíram à temperatura um importante fator regulador para a maturação desses animais, visto que observaram a reprodução desses animais apenas a temperatura de 23° a 27 °C em um período de 4 a 7 meses (Tabela 1.2).

A falta de alimento no presente estudo foi altamente limitante, como se observou no tratamento SAT 0 em que todos os animais morreram.

No campo, com a chegada do inverno (temperaturas baixas, e chuvas menos intensas), a espécie *P. corethrurus* entrou em estivação a maiores profundidades do solo (superiores a 20 cm). Na cidade de Manaus, Guerra & Ferraz (1983) registraram a estivação desta espécie na estação de verão.

1.4. CONCLUSÃO

Mesmo em substratos não naturais, como o SAT, e com umidade excessiva do solo, a sobrevivência e o desenvolvimento de *P. corethrurus* não foram seriamente afetados. A disponibilidade de alimento foi o único fator que limitou significativamente a sobrevivência da espécie estudada.

1.5. REFERÊNCIAS

- ALMARO, A. P. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento, consumo de tierra y fecundidad de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus* Müller, 1857 (**Oligoqueta, Glossoscolecidae**). Tesis profesional, Universidade Nacional Autónoma de México, 54p., 1983.
- ARUNACHALAM, S. Some aspects of the biology of a tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (O. F. Müller). **Bombay National History Society**, 75: 4-110, 1978.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia terrestre – Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas**. ABNT-NBR 15537, Brasil. 2007.
- BERNARDES, F. F.; KIEHL, J. C. Comportamento da minhoca *Pontoscolex corethrurus* sob diferentes condições de temperatura e umidade do solo. In: **Reunião Brasileira de Fertilidade do solo e Nutrição de Plantas, 21, Petrolina, 1994**. Anais. SBCS, 245-246, 1994.
- BERNARDES, F. F.; RIBEIRO, C. M.; KLEIN, S. K. **Ocorrência de *P. corethrurus* em diferentes estados brasileiros, e a sua relação com a fertilidade dos solos**, Acta Biológica Leopoldensia, 1997.
- BERNARDES, F. F.; RIBEIRO, C. M.; KLEIN, S. I. On the interaction of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and the microbiology of tropical soils. In: **16th World Congress of Soil Science**. Montpellier: IUSS, CD-Rom, 1998.

- BHATTACHARJEE, G.; CHAUDHURI, P. S. Cocoon production, morphology, hatching pattern and fecundity in seven tropical earthworm species- a laboratory-based investigation. **Journal of Bioscience**, 3: 283-294, 2002.
- BOUCHÉ, M. B. Stratégies lombriciennes. In: Lohm, U., Persson, T. (Eds.), Soil Organisms as components of Ecosystems. **Ecological Bulletin NFR**, Stockholm, 122-132, 1977.
- BROWN, G. G.; JAMES, S. W.; PASINI, A.; NUNES, D. H.; BENTO, N. P.; MARTINS, P. T.; SAUTTER, K. D. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: Diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean journal of science**, 42 (3): 339-358, 2006.
- EDWARDS, C. A.; LOFTY, J. R. **Biology of earthworms**. New York: John Wiley, 1977.
- GARCIA, J. A.; FRAGOSO, C. Growth, reproduction and activity of earthworms in degraded and amended tropical open minded soils: laboratory assays. **Applied Soil Ecology**, 20: 43-56, 2002.
- GARCÍA, J. A.; FRAGOSO, C. Influence of different food substrates on growth and reproduction of two tropical earthworms (*Pontoscolex corethrurus* and *Amyntas corticis*). **Pedobiologia**, 47: 754-763, 2003.
- GARCIA, M. V. B.; ROEMBKE, J.; MARTIUS, C. 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. **25th Annual Meeting of SETAC, 2004**. Homepage: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2004/document/?id=41943>, 2004.
- GATES, G. E. Contributions to north american earthworms (Annelida), Contributions to a revision of the earthworm family Glossoscolecidae, *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857). **Bulletin of Tall Timbers Research Station**, 14 (6): 1-12, 1973.
- GUERRA, R. T.; FERRAZ, J. A. N. Estudo preliminar da influência da umidade do solo sobre a reprodução de *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). **Acta Amazônica**, 13 (2): 289-297, 1983.
- GUERRA, T. R.; BEZERRA, D. R. B. Comportamento de *Pontoscolex corethrurus* MÜLLER, 1857 (Oligochaeta, Glossoscolecidae) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, 49 (4): 1057- 1064, 1989.
- HAMOUI, H. Life-cycle and growth of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae) in the laboratory. **Revue d' Ecologie et de Biologie du sol**, 28 (4): 469-478, 1991.
- HONDA, M.; SUZUKI, T.; MATSUMOTO, S.; GAMOU, S. Segment formation of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta: Enchytraeidae), **Pedobiologia**, 47: 522-525, 2003.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Effects**

of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. Geneva, Switzerland, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).** ISO 17512-1. Geneva, Switzerland, 2007.

KALE, R. D.; KRISHNAMOORTHY, R. V. What affects the abundance and diversity of earthworms in soil? **Proceedings Indian Academy of Sciences (Animal Science)**, 90: 117-133, 1980.

LAVELLE, P.; MAURY, M. E.; SERRANO, V. Estudio cuantitativo de la fauna del suelo en la region de Laguna Verde, Vera Cruz. Epoca de lluvias. **Institute of Ecology Publications**, México, 6: 75-105, 1981.

LAVELLE, P.; BAROIS, I.; CRUZ, I.; FRAGOSO, C.; HERNANDEZ, A.; PINEDA, A.; RANGEL, P. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolicidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. **Biology Fertility Soils**, 5: 188-194, 1987.

LAVELLE, P.; DANGERFIELD, M.; FRAGOSO, C.; ESCHENBRENNER, V.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; PASHANASI, B.; BRUSSAARD, L. **The relationship between soil macrofauna and tropical soil fertility.** In: SWIFT, M. J., WOOMER, P. (Ed.). Tropical soil biology and fertility. New York: John Wiley, 137-169, 1994.

MAKESCHIN, F. **Earthworms (Lumbricidae: Oligochaeta): important promoters of soil development and soil fertility.** In: BENCKISER, G. Fauna in soil ecosystems: recycling processes, nutrient fluxes, and agriculture production. New York: Marcel Dekker, 173-223. 1998.

MÜLLER, F. *Lumbricus corethrurus*, Burstenschwanz. **Archiv fur Naturg.**, 23 (1): 6-113, 1857.

NAIR, K. V.; MANAZHY, J.; MANAZHY, A.; REYNOLDS, J. W. Biology of cocoons of five species of earthworms (Annelida: Oligochaeta) from Kerala, India. **Megadrilologica**, 13: 1-8, 2009.

OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for the Testing of Chemicals n. 207, **Earthworm Acute Toxicity Tests.** Paris, France, 1984.

ORTIZ-CEBALLOS, A. I.; GARCIA, M. E. C. H.; GONZÁLEZ, J. G. Nest and feeding chamber construction for cocoon incubation in the tropical earthworm: *Pontoscolex corethrurus*. **Dynamic soil, dynamic plant**, 3 (3): 115-118, 2009a.

ORTIZ-CEBALLOS, A. I.; GONZÁLEZ, J. G. Influence of adult *Pontoscolex corethrurus* on development of cocoons and hatchlings. **Dynamic soil, dynamic plant**, 3 (2): 119-121, 2009b.

- RIGHI, G. *Pontoscolex* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) a new evaluation. Stud. Neotrop. **Fauna and Environment**, 19 (3): 159-177, 1984.
- RIGHI, G. Oligochaeta da estação ecológica de Maracá, Roraima, Brasil. **ACTA Amazônica**, 20: 391-398, 1990.
- SILVA, C. C.; CASTRO, G. A. Abundância e biomassa de *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae) em solos cambissolos, neossolos e latossolos brunos na reserva biológica municipal Poço d'Anta – Juiz de Fora – MG. **61ª Reunião anual da SBPC Amazônica: Ciência e Cultura**, Manaus- Amazonas, 2009.
- VANNUCCI, M. Biological Notes. I. On the Glossoscolecid earthworm *Pontoscolex corethrurus*. **Dusenía**, 4, (4/5): 287-300, 1953.

CAPÍTULO 2 - *PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (MÜLLER, 1857) E *EISENIA ANDREI*, BOUCHÉ, 1972, COMO BIOINDICADORAS DE SOLOS CONTAMINADOS POR AGROTÓXICOS

Resumo. O uso indiscriminado e abusivo de agrotóxicos vem crescendo constantemente, devido à demanda por uma maior produção agrícola. Esse intenso uso no solo impacta o ambiente e a biota do solo. Para indicar em que medida esses produtos químicos são nocivos e como e onde manifestam os seus efeitos, pode-se fazer uso de testes ecotoxicológicos, com minhocas por exemplo. Esses animais são essenciais para a manutenção dos processos químicos e biológicos do solo, revelam por meio de testes comportamentais, agudos e crônicos, os impactos dos agrotóxicos. Alguns destes testes foram padronizados pela ISO (Organização Internacional de Padronização) utilizando espécies de minhocas padrão *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, ambas nativas de clima temperado. No entanto, estas espécies podem ser pouco relevantes para estudos ecotoxicológicos edáficos, já que vivem na liteira do solo (epigeicas), e consomem matéria orgânica fresca, de origem animal e vegetal. A espécie *Pontoscolex corethrurus*, nativa de regiões tropicais, pode ser uma alternativa para testes ecotoxicológicos de maior relevância ecológica, pois vive no solo e consome matéria orgânica do solo (endogeica). Contudo, pouco se conhece a respeito de sua sensibilidade a agrotóxicos. Com estudos comparativos de sensibilidade, através de testes ecotoxicológicos, podem ser propostas adaptações para usar uma espécie mais representativa dos solos tropicais. Portanto no presente trabalho avaliou-se a sensibilidade das espécies *E. andrei* e *P. corethrurus* a três agrotóxicos, frequentemente utilizados em frutíferas e grãos no Brasil, carbendazim, carbofurano e glifosato. Os resultados ecotoxicológicos, agudos e comportamentais, evidenciaram que carbendazim e carbofurano nas concentrações testadas foram tóxicos para as duas espécies, entretanto o glifosato, não apresentou efeito toxicológico para as mesmas. A sensibilidade de *P. corethrurus* parece ser semelhante quando comparada com a espécie padrão, para os agrotóxicos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE. Fungicida, herbicida, inseticida, minhocas, solo artificial tropical

Summary. The indiscriminate and excessive use of pesticides has been constantly increasing due to demand for greater agricultural production. This intense use soil impacts the environment and soil biota. To indicate the extent to which these chemicals are harmful and how and where their effects occur, you can make use of ecotoxicological tests with earthworms for example. These animals are essential for the maintenance of chemical and biological processes in soil, reveal through behavioral tests, acute and chronic impacts of pesticides. Some of these tests were standardized by ISO (International Organization for Standardization) using standard species of earthworms *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*, both native to temperate climate. However, these species may be of little interest for ecotoxicological studies edaphic, already living in the soil litter (epigeic), and consume fresh organic matter, animal and vegetable. The specie *Pontoscolex corethrurus*, native to tropical regions, can be an alternative to ecotoxicological most ecologically important because it lives in the soil and consume soil organic matter (endogeic). However, little is known about their sensitivity to pesticides. In comparative studies of sensitivity, using ecotoxicological tests, adjustments may be proposed to use a more representative species of tropical soils. Therefore

the present study evaluated the sensitivity of *E. andrei* and *P. corethrurus* three pesticides, commonly used in fruit and grain in Brazil, carbendazim, carbofuran and glyphosate. The results of ecotoxicological acute and behavioral evidence that carbendazim and carbofuran in concentrations were toxic to both species, however, glyphosate, showed no toxic effects to them. The sensitivity of *P. corethrurus* seems to be similar when compared with the standard species for pesticides evaluated.

KEYWORDS. Fungicide, herbicide, insecticide, earthworms, soil artificial tropical

2.1. INTRODUÇÃO

Devido à intensificação da produção agrícola mundial, ocasionada pela crescente demanda de alimentos, associada ao uso indiscriminado e abusivo de agrotóxicos, tem-se graves impactos nos solos. Sendo os agrotóxicos compostos biologicamente ativos, sua persistência no solo pode afetar a biota do solo, estimulando ou inibindo seu crescimento. Essas alterações podem comprometer processos de ciclagem de nutrientes no ambiente edáfico e o crescimento das plantas (Nielsen & Winding, 2002). A toxicidade de um composto químico depende do tempo de exposição, da suscetibilidade do organismo, concentração, características químicas do agente e de fatores ambientais (ABNT, 2004), relevâncias pertinentes para avaliação de solos contaminados. A resposta da toxicidade a diferentes substâncias varia entre regiões temperadas e tropicais, pela sensibilidade dos organismos-testes de cada região ser diferente (Laabs et al., 2002; Garcia, 2004a; De Silva & Gestel, 2009b). Contudo, dados sobre os efeitos de pesticidas, resíduos industriais e domiciliares em solos tropicais, utilizando invertebrados como bioindicadores, são de maneira geral escassos (Helling *et al.*, 2000). Além disso, quando existem, a maioria dos dados são gerados a partir de espécies exóticas (da América do Norte e da Europa), em regiões tropicais, ocasionando uma extrapolação possivelmente tendenciosa dos resultados, pelo fato de usarem metodologias baseadas em protocolos para regiões de clima temperado, mascarando a situação real para regiões tropicais, e podendo levar a conclusões equivocadas.

Para indicar em que medida produtos químicos são nocivos e como e onde manifestam os seus efeitos, podemos fazer uso de testes ecotoxicológicos, com organismos bioindicadores. As minhocas têm sido utilizadas como excelentes indicadoras da qualidade e saúde dos solos, visto que freqüentemente são estudadas em solos degradados, perturbados (Lavelle et al., 1987), contaminados com mercúrio (Carvalho Filho et al., 2005; Ramos et al., 2006), agrotóxicos (Ribera et al., 2001; Andréa et al., 2004) e hidrocarbonetos aromáticos

policíclicos- PAHs (Sisinno et al., 2006). Apresentam papel destacado na formação do solo (Darwin, 1881), na decomposição de resíduos de plantas, na ciclagem de nutrientes da matéria orgânica (Lee, 1985; Papini & Andréa, 2001), na formação do húmus e de agregados de solo, no melhoramento da estrutura, da fertilidade, da porosidade e da 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.

Atualmente existem diversos protocolos padronizados pela ISO que utilizam organismos terrestres do solo como bioindicadores. Alguns destes foram desenvolvidos para minhocas, com as espécies padrão *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, espécies de clima temperado. Estas, no entanto podem ser pouco relevantes para estudos ecotoxicológicos em regiões tropicais, já que não são espécies nativas da região, e pelo fato de viverem na liteira, ou seja, alimentam-se próximo a camada superficial do solo (epigeica). *Pontoscolex corethrurus* é uma espécie nativa de regiões tropicais e de ampla distribuição, comumente encontrada em solos antropogênicos (Römbke & Verhaagh, 1992), apresenta maior relevância ecológica que as espécies padrão por viver abaixo das camadas superficiais do solo (endogeica), sendo uma alternativa para testes ecotoxicológicos em solos tropicais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade das espécies *Eisenia andrei* e *Pontoscolex corethrurus* através de testes ecotoxicológicos, como bioindicadoras de solos contaminados com carbendazim, carbofurano e glifosato, uns dos agrotóxicos mais utilizados em frutíferas e grãos no Brasil.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Solo- teste

Os testes ecotoxicológicos foram realizados em solo artificial tropical – SAT (Garcia et al., 2004b) cuja formulação foi baseada em um protocolo da Organização Européia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (1984), apresentando 70% de areia fina, 20% de argila branca (caulim), 10% de pó de casca de coco triturada, e pH ajustado para $6,0 \pm 0,5$, sendo corrigido quando necessário com carbonato de cálcio. As percentagens foram baseadas em massa seca, e todos componentes secados ao ar. A capacidade de retenção de água de SAT foi ajustada para 60%. As características físico-químicas do SAT estão descritas na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Características físico-químicas do solo artificial tropical- SAT.

Substrato	Características físico-químicas					
	pH (CaCl ₂)	N total (%)	C org. (%)	C/N	Matéria orgânica (%)	CRA Max. (%)
SAT	6,4	0,10	4,12	41,2	7,09	54

2.2.2. Seleção das espécies indicadoras

Para a realização dos testes ecotoxicológicos foram selecionadas duas espécies de minhocas. A primeira *E. andrei* (Lumbricidae), é uma espécie comum em criações para produção de húmus e vermicompostagem. Atualmente é a espécie padrão recomendada em protocolos internacionais para uso em testes de toxicidade de substâncias químicas para o solo em regiões temperadas (OECD, 1984; ISO 17512, 2007) e tropicais (IBAMA, 1990; ABNT – NBR – 15.537, 2007). Neste trabalho foram utilizadas culturas de *E. andrei* previamente estabelecidas no laboratório de Ecologia da Embrapa Florestas, as quais foram originalmente adquiridas de vermicompostagem do Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA). A criação em laboratório foi nos meses de março a dezembro de 2009, realizada em caixas plásticas organizadoras com capacidade volumétrica de 50 litros. A alimentação fornecida semanalmente consistiu de esterco bovino. A segunda espécie, *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae), nativa do neotrópico foi coletada nos meses de março, abril, maio, junho, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2009, em duas áreas próximas a Embrapa Florestas. O solo das áreas foi classificado como Cambissolo e o clima da região como sub-tropical mesotérmico úmido (Cfb), segundo Köppen. Para coletar os animais utilizou-se pá do tipo cortadeira e enxada, e a triagem foi manual. As minhocas dessa espécie foram mantidas, anteriormente aos testes, em caixas plásticas de capacidade volumétrica de 2 litros, em solo natural, alimentadas com esterco equino, oferecido semanalmente. Como critério para a realização dos testes ecotoxicológicos avaliados, os animais usados estavam na fase adulta e tinham biomassa entre 0,7 g e 1,0 g (*P. corethrurus*) e 0,3 g a 0,6 g (*E. andrei*).

2.2.3. Caracterização dos ingredientes ativos dos agrotóxicos avaliados

Carbendazim - Derosal[®] 500 SC, ingrediente ativo (500 g L⁻¹), é um fungicida sistêmico, pertencente à classe química dos carbamatos, indicado no tratamento de doenças da parte aérea nas culturas de frutíferas, vegetais, cereais, e no tratamento de sementes. É também

usado como substância-referência em ensaios ecotoxicológicos (Luz et al., 2008) estabelecidos pela OECD (1984). Os relatos na literatura sobre a persistência de carbendazim são bastante contraditórios, variando de 4 dias a 26 meses, sendo esta variação associada ao tipo de substrato, condições experimentais e ambientais, bem como pH e exposição prévia dos microrganismos degradadores ao agrotóxico ou aos compostos estruturalmente relacionados (Silva et al., 1999; Coutinho et al., 2006).

Carbofurano - Furadan[®] 350 SC, ingrediente ativo (350 g L⁻¹), é um inseticida, nematicida sistêmico, utilizado para várias culturas, desde frutíferas, vegetais e cereais. É um agrotóxico pertencente à classe química dos carbamatos e sua persistência no ambiente é curta, e de pequeno deslocamento no ambiente (Viswanathan, 1994).

Glifosato - Glifosato Pica-Pau[®] 480 SC, ingrediente ativo (480 g L⁻¹) é um herbicida sistêmico não seletivo do grupo químico glicina substituída, indicado para o controle de plantas infestantes anuais e perenes, sejam monocotiledôneas ou dicotiledôneas. Sua meia-vida no solo varia desde menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (Richardson & Gangolli, 1994).

Os agrotóxicos selecionados para o presente trabalho estão entre os mais utilizados no Brasil. Segundo a lei federal n. 7802/89 sobre Agrotóxicos, o carbofurano é classificado em classe toxicológica I - extremamente tóxico, o glifosato em classe II - altamente tóxico e o carbendazim em classe III - moderadamente tóxico.

2.2.4. Teste ecotoxicológicos

2.2.4.1. Fuga

Este experimento foi executado conforme o protocolo da ISO 17512-1 (2007).

Antes do teste, os animais foram mantidos para aclimatização em solo artificial tropical (SAT) por 24 horas, em caixa plástica (com capacidade volumétrica de 2,0 L).

Foram realizados três testes de fuga, um para cada ingrediente ativo dos agrotóxicos avaliados, para cada espécie de minhoca. Cada concentração do ingrediente ativo e do controle foi testada com cinco repetições. As concentrações testadas foram baseadas nas doses recomendadas a campo para os agrotóxicos estudados: 0; 1; 3,2; 10; 31,6; 100, 316; 1000 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para o carbendazim; 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para o carbofurano e 0; 7; 14; 21; 30; 47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para o glifosato. Caixas plásticas transparentes (26,2 x 17,7 x 8,5 cm) foram preenchidas com solo artificial tropical até uma altura de 4 a 5 cm (aproximadamente 500 g de peso seco). Usando um pedaço de papelão

colocado transversalmente na caixa, a metade desta foi preenchida com solo controle e a outra com o solo teste (SAT contaminado com determinada concentração do agrotóxico). Em seguida, o separador de papelão foi removido e adicionado sobre a linha de separação de cada caixa, 10 animais adultos de *E. andrei* e para o teste com *P. corethrurus*, 6 animais adultos. O número de indivíduos foi reduzido nesse caso, devido ao tamanho corporal dessa espécie. As caixas foram fechadas e armazenadas no escuro, sob temperatura ambiente de 20 ± 4 °C. Os animais não foram alimentados durante os testes. Após o período de 48 horas o teste foi finalizado, e a avaliação do comportamento de fuga realizado, para tal, cuidadosamente se inseriu as divisórias de papelão em cada caixa plástica, avaliando e anotando o número de animais presentes em cada seção da caixa (solo controle e solo teste). Indivíduos encontrados entre as seções da caixa, ou seja, em cima da linha divisória, foram contados de acordo com a direção que se movimentaram, sendo ainda considerada a seção onde se encontrava a parte anterior do corpo.

Foi utilizada a definição de “função hábitat” proposta pela norma da ISO. Neste, quando a percentagem de animais vivos no solo contaminado for inferior a 20%, considera-se que houve efeito no comportamento dos animais testados e assim o solo é considerado como tóxico ou com baixa qualidade (função de habitat limitada).

2.2.4.2. Agudo - Mortalidade

Este experimento foi executado conforme o protocolo da ISO 11268-1 (1993).

Antes do teste, os animais foram mantidos para aclimatização em solo artificial tropical (SAT) por 24 horas, em caixa plástica (com capacidade volumétrica de 2,0 L).

Foram realizados três testes de mortalidade, um para cada ingrediente ativo dos agrotóxicos avaliados. Para cada concentração do ingrediente ativo testado, foram feitas cinco repetições. As concentrações testadas foram baseadas nas doses recomendados para os agrotóxicos estudados, e conforme trabalho anteriormente realizados: 0; 1; 3,16; 10; 31,6; 100 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para o carbendazim; 0; 2,5; 5; 10; 16; 32 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para o carbofurano e 0; 7; 14; 21; 30; 47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para o glifosato. Os testes foram realizados em frascos de vidro, com 500 g de SAT e contaminados com as concentrações citadas anteriormente para cada ingrediente ativo. Foram colocados nos frascos 10 animais da espécie *E. andrei* e 6 para o teste com *P. corethrurus*. O número de indivíduos foi reduzido nesse caso, devido ao tamanho corporal dessa espécie. Antes de serem adicionados aos frascos os animais foram pesados. Os experimentos foram mantidos em temperatura ambiente

de 20 ± 4 °C. Após sete dias de teste, os animais de cada concentração avaliada foram novamente pesados, e alterações morfológicas e comportamentais observadas foram anotadas. Os animais mortos foram retirados e os sobreviventes mantidos até o 14º dia, quando então, foram pesados e quantificados o número de mortos. Durante o teste as minhocas foram alimentadas uma vez, aos sete dias, com 20 g de esterco de equino (estando este desfaunado, seco e peneirado em malha de 4 mm de diâmetro).

A avaliação de biomassa das espécies foi realizada, pesando-se o grupo, em três momentos, no início do teste, após uma semana, e após duas semanas. Para a espécie *E. andrei* o grupo continha 10 animais, e para *Pontoscolex corethrurus*, 6 animais, para cada repetição.

2.2.5. Análise dos dados.

Para o teste de fuga, a percentagem de fuga foi calculada com base na seguinte fórmula: $A = [(C - T) / N] \times 100$, onde C é o número de animais encontrados no solo controle, T é o número de animais encontrados no solo teste, e N é o número total de animais utilizados por tratamento (para cada concentração testada). Um resultado positivo é indicativo de fuga e um negativo de atração pela concentração do ingrediente ativo testado. De acordo com o anexo E do protocolo da ISO 17512 (2007) quando há atração dos animais pela substância química avaliada, em determinada concentração, deve-se considerar 0% de fuga. Os valores da concentração mediana efetiva (CE_{50}) com 95% de confiabilidade para o teste fuga e a concentração mediana letal (CL_{50}) para o teste de mortalidade foram determinados através do método Trimmed Spearman - Kärber (Hamilton et al., 1977). A análise de variância (ANOVA), de significância e das concentrações CENO- Concentração mais elevada sem efeito observável, e a CEO- Concentração mais baixa com efeito observável, para o teste de fuga foram determinadas através do teste de Fisher (Software 50-50 MANOVA), e para o teste de mortalidade, bem como a variação de biomassa no teste agudo foram gerados pelo Teste de Tukey no programa estatístico Minitab® 15.1.0.0.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Teste de Fuga

2.3.1.1. Efeito do Carbendazim

Para ambas as espécies, *E. andrei* e *P. corethrurus*, os resultados mostraram que o comportamento de fuga foi estatisticamente significativo nas concentrações maiores ou igual a 31,6 mg i.a. kg⁻¹ de SAT (Figura 2.1). Os valores das concentrações medianas efetivas (CE₅₀) das espécies foi de 76,12 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *E. andrei*, e 65,81 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *P. corethrurus*. A concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi de 10 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, igual para as duas espécies. Ainda, para ambas as espécies, a concentração mais baixa, com efeito observável (CEO) foi de 31,6 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, indicando que para esse agrotóxico na menor concentração com efeito, a sensibilidade para o contaminante foi a mesma (Tabela 2.2). Com base na definição de “solo habitat”, a concentração de 1000 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para as duas espécies, foi considerada como a mais tóxica, ou a mais limitante para a qualidade do solo.

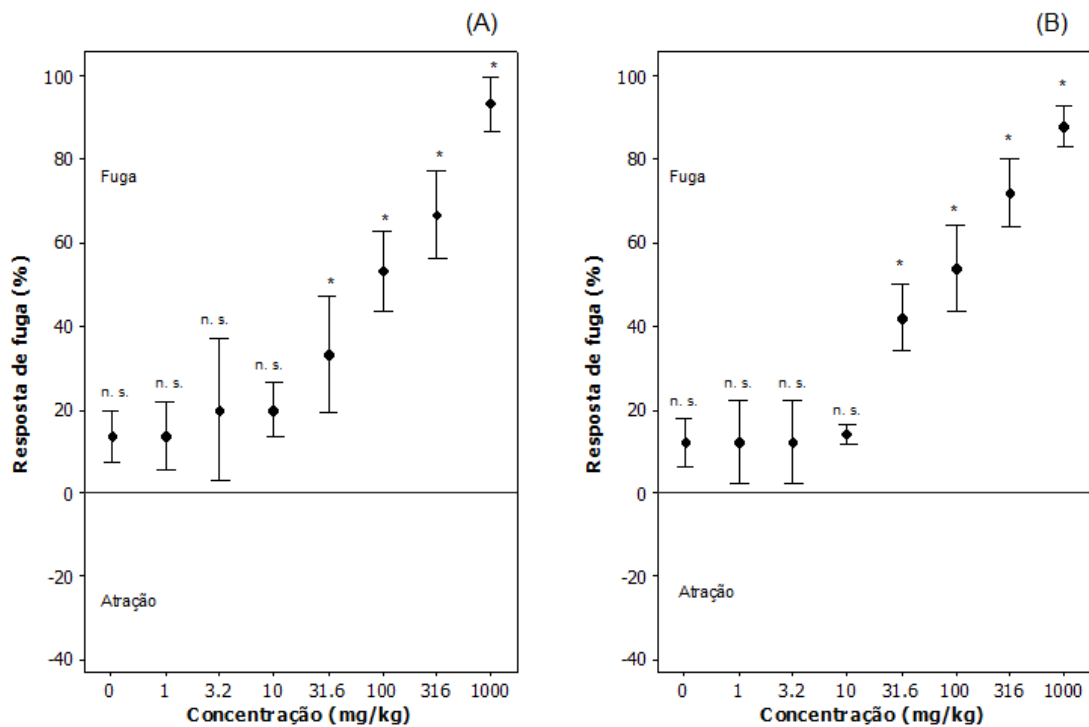


Figura 2.1. Resposta de fuga ou atração para as espécies (A) *Pontoscolex corethrurus* e (B) *Eisenia andrei*, em SAT contaminado com carbendazim. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Fisher, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.

2.3.1.2. Efeito do Carbofurano

As concentrações maiores ou iguais a 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT foram estatisticamente significativas para o comportamento de fuga de *P. corethrurus* em SAT, contaminado com carbofurano. Para *E. andrei* esse efeito foi observado nas concentrações maiores ou igual a 5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. O comportamento de atração pelo contaminante testado foi significativo apenas para *E. andrei* na concentração de 0,5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, mostrando que para essa concentração pouco afetava a sensibilidade dessa espécie para fuga. A concentração mais tóxica foi a de 40 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, para ambas as espécies (Figura 2.2). Os valores das concentrações medianas efetivas (CE₅₀) foram de 7,26 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *P. corethrurus*, e 9,74 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *E. andrei*. A concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi para a primeira espécie, de 1,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, e para a segunda foi de 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. E a concentração mais baixa, com efeito observável (CEO) foi de 2,5 e 5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, para cada espécie, respectivamente (Tabela 2.2).

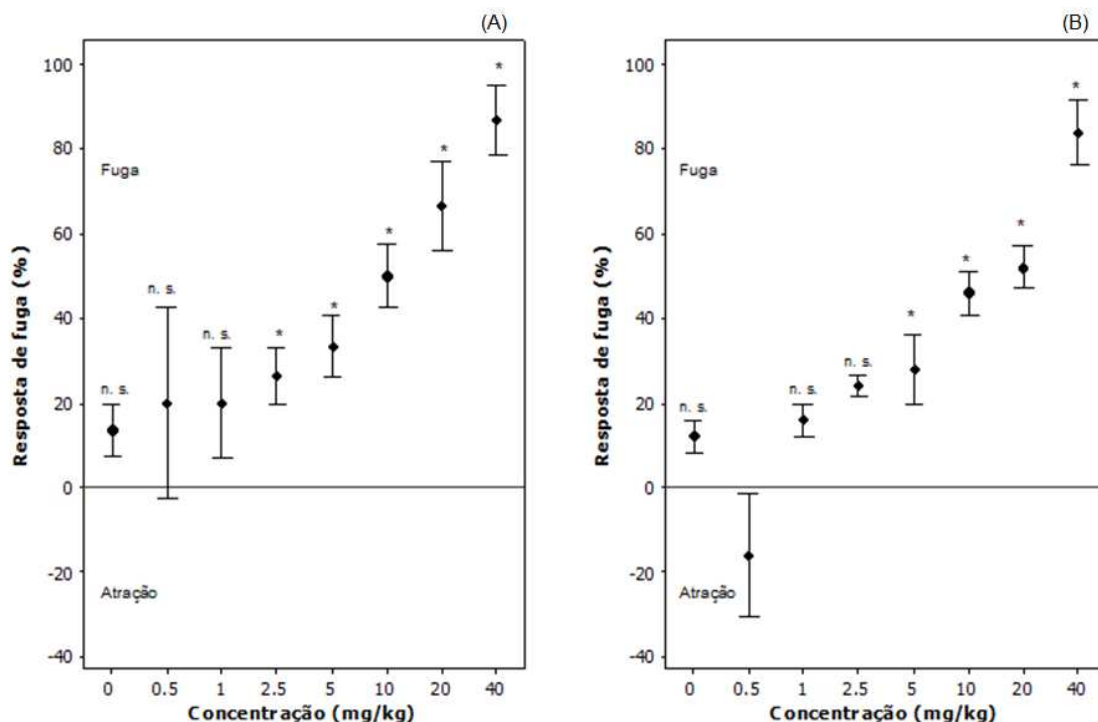


Figura 2.2. Resposta de fuga e atração para as espécies (A) *Pontoscolex corethrurus* e (B) *Eisenia andrei*, para as concentrações de carbofurano em SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Fisher, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.

2.3.1.3. Efeito do Glifosato

A concentração de 47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT foi estatisticamente significativa para o comportamento de fuga de *P. corethrus* em SAT, contaminado com glifosato, e para *E. andrei* nas concentrações maiores ou igual a 30 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. A concentração mais tóxica, que comprometeu a qualidade do solo foi a de 47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, para as duas espécies (Figura 2.3). Os valores das concentrações medianas efetivas (CE₅₀) das espécies ficaram bem próximos, 44,52 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *P. corethrus*, e 45,52 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *E. andrei*. A concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi de 30,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para a primeira espécie, e para a segunda 21,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. A concentração mais baixa, com efeito observável (CEO) foi de 47,0 e 30 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, para cada espécie, respectivamente (Tabela 2.2).

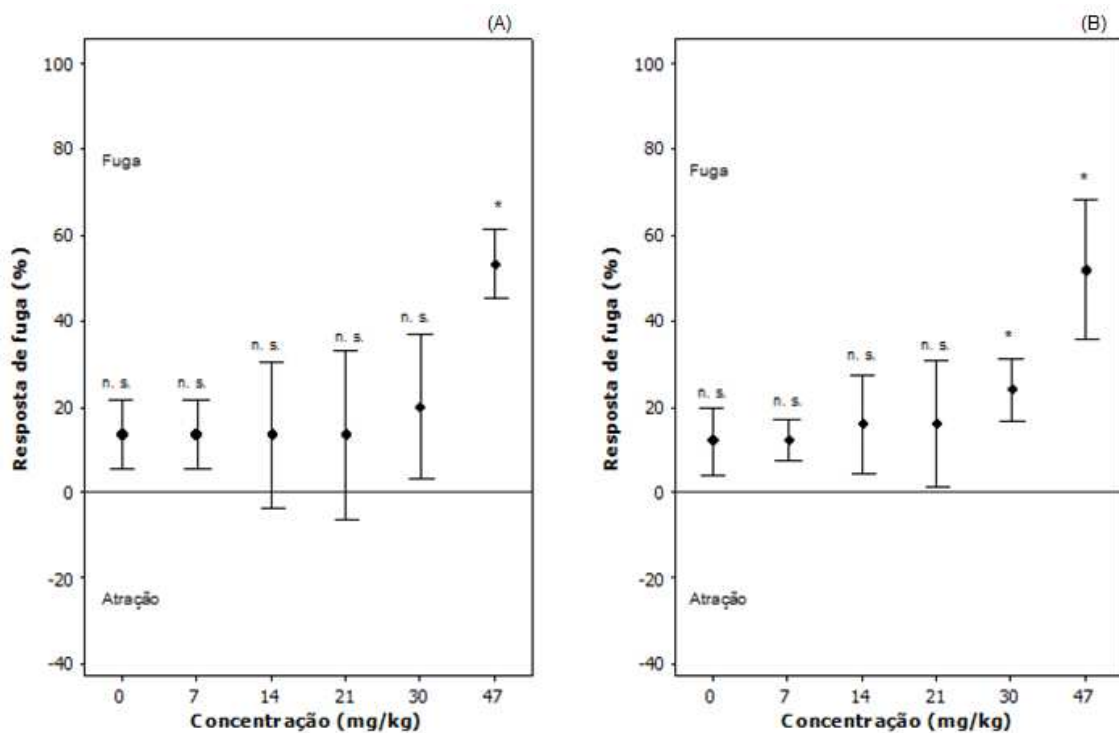


Figura 2.3. Resposta de fuga e atração para as espécies (A) *Pontoscolex corethrus* e (B) *Eisenia andrei*, para as concentrações de glifosato em SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Fisher, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.

2.3.1.4. Comparação dos agrotóxicos

Quando comparamos as concentrações medianas efetivas (CE₅₀), que correspondem a 50% de fuga dos animais, entre os agrotóxicos estudados, observamos que o carbofurano é mais tóxico, seguido do glifosato e do carbendazim, para as espécies estudadas (Tabela 2.2), condizente com a classe toxicológica presente nas bulas destes produtos (7802/89).

Tabela 2.2. Valores das concentrações observadas (mg i.a. kg⁻¹) para as espécies *E. andrei* e *P. corethrurus*, em solo artificial tropical, contaminado com agrotóxicos, de acordo com as respostas de fuga.

Teste de Fuga					
Agrotóxicos/ Espécies	Concentrações (mg i.a. kg ⁻¹ de SAT)				
	CE ₅₀	95% Confiança		CEO	CENO
		Baixa	Alta		
Carbendazim					
<i>P. corethrurus</i>	65,81	36,54	118,52	31,6	10,0
<i>E. andrei</i>	76,12	51,14	113,29	31,6	10,0
Carbofurano					
<i>P. corethrurus</i>	7,26	4,70	11,26	2,5	1,0
<i>E. andrei</i>	9,74	7,19	13,21	5,0	2,5
Glifosato					
<i>P. corethrurus</i>	44,94	36,00	56,09	47,0	47,0
<i>E. andrei</i>	45,52	36,86	56,20	30,0	47,0

2.3.2. Teste agudo – Mortalidade

2.3.2.1. Efeito do Carbendazim

Nos testes de toxicidade aguda para as espécies, *P. corethrurus* e *E. andrei*, em SAT contaminado com carbendazim, as concentrações maiores ou igual a 3,16 mg i.a. kg⁻¹ de SAT causaram letalidade nas duas espécies (Figura 2.4). As concentrações medianas letais (CL₅₀) foram de 15,32 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *P. corethrurus*, e de 19,74 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *E. andrei*. A concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi de 1,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para as duas espécies, e para a concentração mais baixa, com efeito observável (CEO) foi de 3,16 mg i.a. kg⁻¹ de SAT com resultados também iguais para ambas (Tabela 2.3).

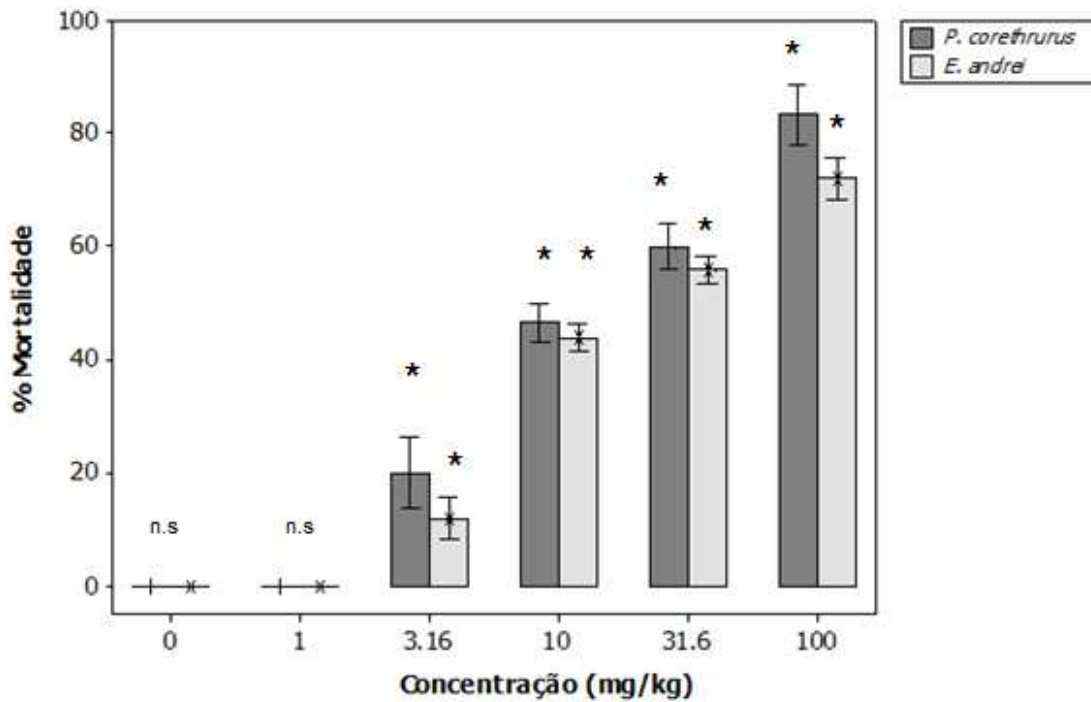


Figura 2.4. Concentração-resposta de toxicidade aguda de carbendazim para *Pontoscolex corethrurus* e *Eisenia andrei* em solo artificial tropical-SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.

Foi estatisticamente significativo para as espécies *P. corethrurus* e *E. andrei* redução da biomassa nas concentrações maiores ou igual a 10 mg i.a. kg^{-1} de SAT. Para ambas as espécies, a biomassa do grupo (10 animais para *E. andrei* e 6 animais para *P. corethrurus*) apresentou diferença estatística quando comparada com a biomassa inicial, desde a primeira semana, nas concentrações maiores ou igual a 31,6 mg i.a. kg^{-1} de SAT. Na segunda semana essa diferença estatística foi também observada nas concentrações maiores ou iguais a 10 mg i.a. kg^{-1} de SAT (Figura 2.5).

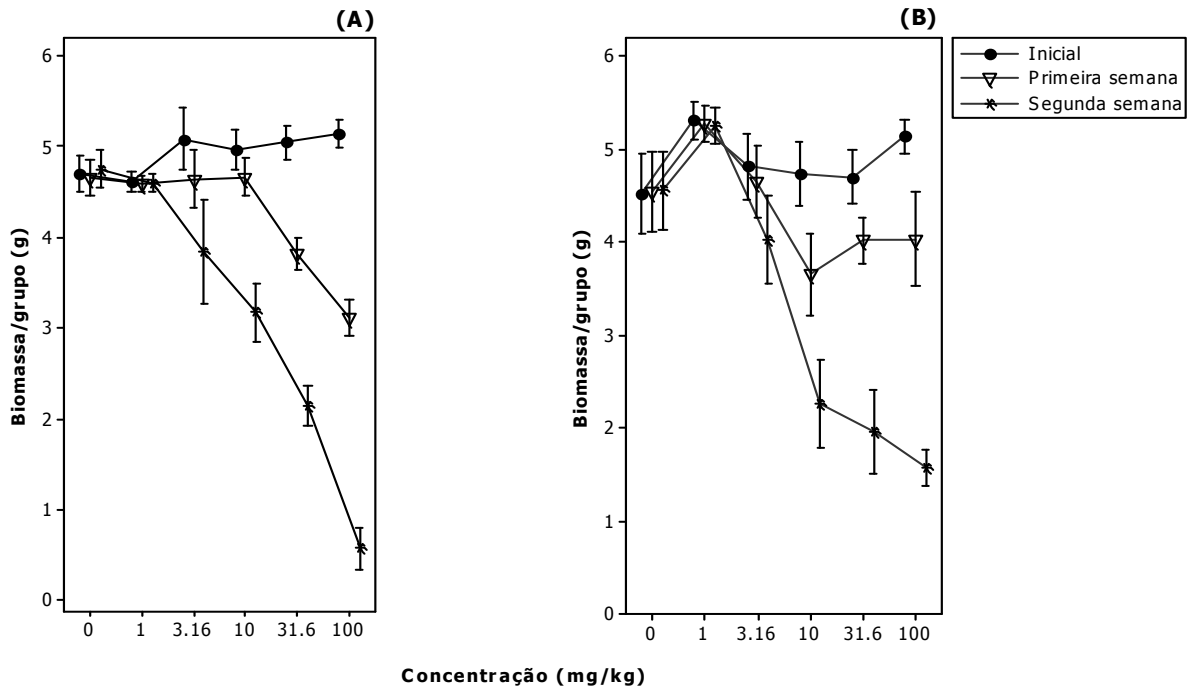


Figura 2.5. Biomassa das espécies *Pontoscolex corethrurus* (A) e *Eisenia andrei* (B), em teste agudo, com relação as concentrações avaliadas de carbendazim em SAT.

Foram visualizadas algumas alterações morfológicas no período de duas semanas, de exposição à carbendazim. Em 86% das espécies de *P. corethrurus* houve o comportamento de enrolamento corporal, nas concentrações maiores ou igual a 10 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, desde a primeira semana, característica observada na natureza quando o animal encontra-se estressado, seja por variação de temperatura, umidade, pH, bem como presença de contaminantes no solo. Em 25% dos animais avaliados na concentração de 100 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, desde a primeira semana, observou-se a decomposição dos animais, a qual foi inicialmente visualizada na extremidade posterior. Em *E. andrei* observou-se desde a primeira semana que, em 60% dos animais, os mortos ficavam rentes as laterais dos frascos de vidro, e apresentavam os corpos envolvidos por um líquido amarelo, provavelmente líquido celomático, nas concentrações maiores ou igual a 10 mg i.a. kg⁻¹ de SAT (Figura 2.6). Segundo Edwards & Thompson (1973) e Edwards & Lofty (1977) os carbamatos são muito tóxicos para as minhocas e podem matá-las rapidamente.

Para saber com exatidão como o ingrediente ativo carbendazim afeta a fisiologia e a morfologia, necessita-se de mais estudos, com avaliação das respostas bioquímicas das minhocas.



Figura 2.6. Alterações morfológicas visualizadas em SAT, contaminado com carbendazim. I- *Eisenia andrei* envolvida por líquido amarelado; II- *Pontoscolex corethrurus* em estágio inicial de decomposição; III- *P. corethrurus* enrolada.

2.3.2.2. Efeito do Carbofurano

Em SAT contaminado com carbofurano, as concentrações maiores ou iguais a 5,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT apresentaram efeito letal em *P. corethrurus*, enquanto que para *E. andrei* foram as concentrações maiores ou igual a 10,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT (Figura 2.7). As concentrações medianas letais (CL₅₀) foram semelhantes para as duas espécies, sendo de 9,28 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para a primeira espécie citada, e de 13,50 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para a segunda espécie. A concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi de 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *P. corethrurus*, e de 5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para *E. andrei*. A concentração mais baixa, com efeito observável (CEO) foi de 5,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT e 10,0 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, para cada espécie respectivamente (Tabela 2.3).

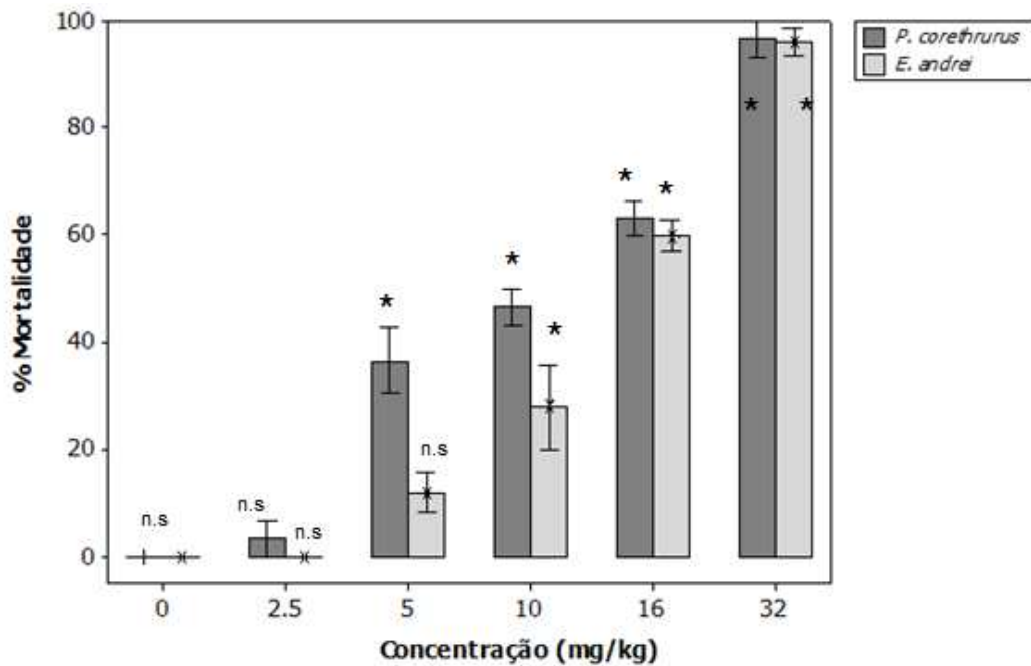


Figura 2.7. Concentração-resposta de toxicidade aguda de carbofurano para *Pontoscolex corethrurus* e *Eisenia andrei* em solo artificial tropical-SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.

A redução de biomassa foi crescente no período do teste (duas semanas) para todas as concentrações avaliadas, com exceção da concentração controle, para as duas espécies. Desde a primeira semana a redução de biomassa do grupo foi estatisticamente significativa para *P. corethrurus* nas concentrações maiores ou igual a 5,0 mg i.a. kg^{-1} de SAT, enquanto que, para *E. andrei* a redução foi significativa nas concentrações maiores ou igual a 16 mg i.a. kg^{-1} de SAT (Figura 2.8).

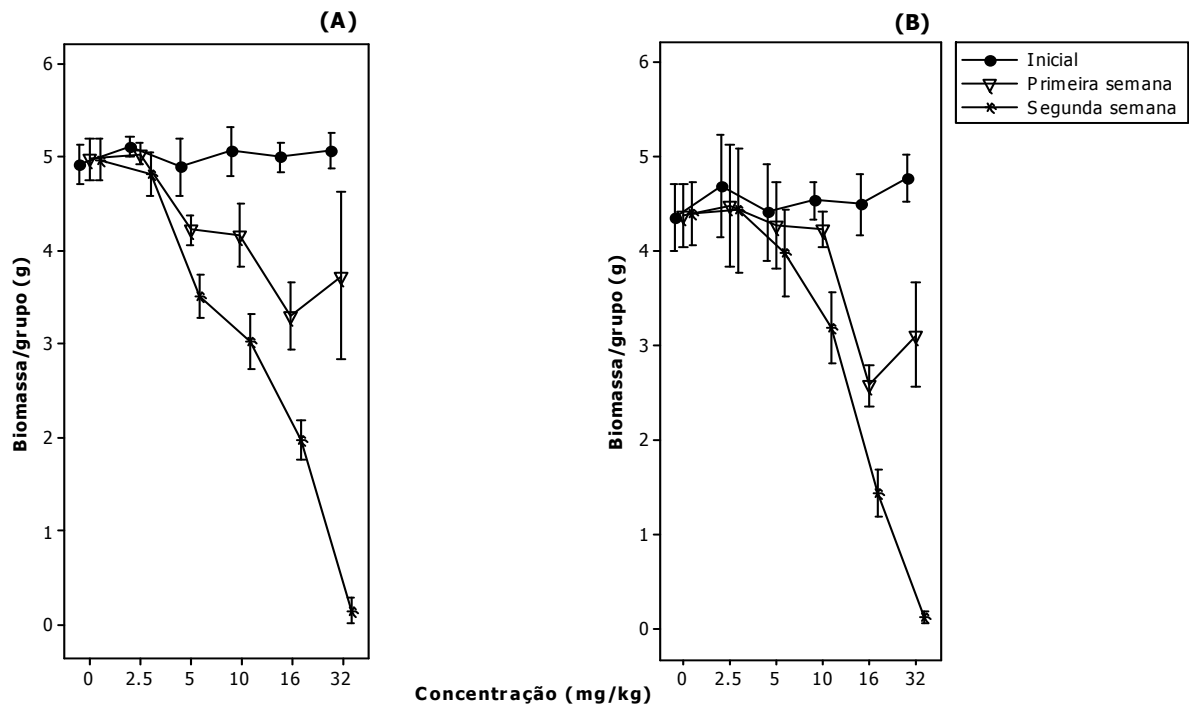


Figura 2.8. Biomassa das espécies *Pontoscolex corethrusus* (A) e *Eisenia andrei* (B), em teste agudo, com relação as concentrações avaliadas de carbofurano em SAT.

Algumas alterações morfológicas foram observadas durante o teste de toxicidade com o carbofurano a partir da primeira semana de exposição, nas concentrações maiores ou igual a 5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. Em 63% dos animais avaliados de *P. corethrusus* houve desanelamento dos segmentos que constituem o corpo das minhocas. Esse grupo químico de agrotóxicos (carbamatos) produz fadiga muscular e a lesão nos músculos flexores, pela inibição da acetilcolinesterase (Leviske, 2007). Essa característica não foi observada com o carbendazim, pois este é menos agressivo que o carbofurano. Em 4 % dos animais estudados, de *P. corethrusus*, observou-se a presença de lesão exposta (feridas) seguida de decomposição, iniciada pelo meio em direção as extremidades do corpo do animal, diferentemente do efeito visualizado com o carbendazim. Na espécie *E. andrei* foi observado inchaço segmentar seguido de rompimento do intestino. Alguns estudos com *E. andrei* relatam a presença de inchaço segmentar seguido de morte, quando expostos ao carbofurano (Sileo & Gilaman, 1975; Roberts & Dorough, 1983). Entretanto, os mecanismos toxicológicos de ação dos carbamatos em minhocas, ainda não são bem compreendidos.



Figura 2.9. Alterações morfológicas visualizadas em SAT contaminado com carbofurano. I- *Pontoscolex corethrurus* com desanelamento segmentar; II- *Eisenia andrei* com corpo rompido ao meio; III- *P. corethrurus* com lesão exposta;

2.3.2.3. Efeito do Glifosato

Para *P. corethrurus* e *E. andrei* não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de glifosato avaliadas em SAT. Também não foi possível, estimar as concentrações medianas efetivas (CL₅₀), visto que apenas 3,3 % de mortalidade foi obtido para *P. corethrurus*, e 4% para *E. andrei*, na concentração mais alta testada (47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT). A concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi de 47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT para ambas as espécies (Tabela 2.3).

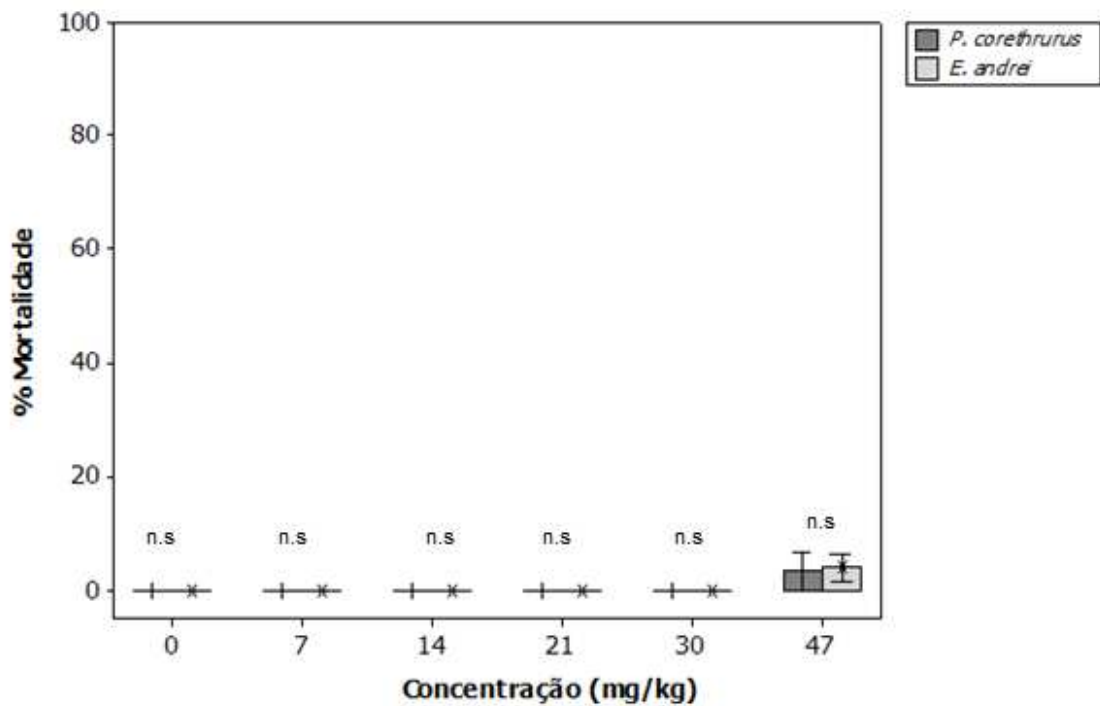


Figura 2.10. Concentração-resposta de toxicidade aguda de glifosato para *Pontoscolex corethrurus* e *Eisenia andrei* em solo artificial tropical – SAT. Valores médios e desvio padrão em barras, * estatisticamente significativo, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$; n.s. = não significativo.

A biomassa foi reduzida nas concentrações maiores ou igual a 21 mg i.a. kg^{-1} de SAT para *P. corethrurus*, e em *E. andrei* nas concentrações maiores ou igual a 30 mg i.a. kg^{-1} de SAT. No entanto não houve diferença estatística para nenhuma das concentrações avaliadas. Para *P. corethrurus* a concentração 47 mg i.a. kg^{-1} de SAT na primeira e segunda semana diferiram da semana inicial, mas não são diferentes estatisticamente entre si.

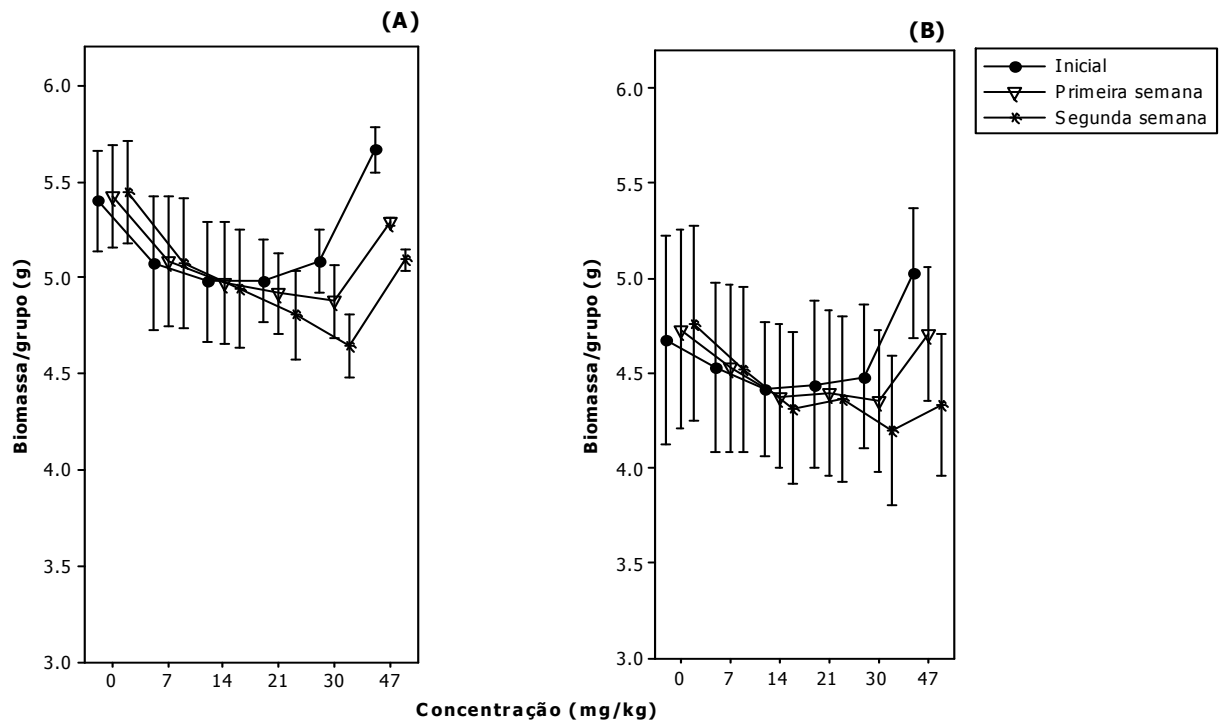


Figura 2.11. Biomassa das espécies *Pontoscolex corethrus* (A) e *Eisenia andrei* (B), em teste agudo, com relação as concentrações avaliadas de glifosato em SAT.

Nos poucos animais mortos, não foi visualizada, qualquer alteração anormal na morfologia dos animais estudados, para as duas espécies.

Tabela 2.3. Valores das concentrações observadas (mg i.a. kg^{-1}) para as espécies *E. andrei* e *P. corethrus*, em solo artificial tropical, contaminado com agrotóxicos, de acordo com as respostas à mortalidade.

Teste de Mortalidade

Agrotóxicos/ Espécies	Concentrações (mg i.a. kg^{-1} de SAT)				
	CL ₅₀	95% Confiança		CEO	CENO
		Baixa	Alta		
Carbendazim					
<i>P. corethrus</i>	15,32	9,43	24,89	3,16	1,0
<i>E. andrei</i>	19,74	11,78	33,09	3,16	1,0
Carbofurano					
<i>P. corethrus</i>	9,28	7,54	11,42	5,0	2,5
<i>E. andrei</i>	13,20	11,79	15,45	10,0	5,0
Glifosato					
<i>P. corethrus</i>	-	-	-	-	47,0
<i>E. andrei</i>	-	-	-	-	47,0

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1. Testes de Fuga

Em testes ecotoxicológicos de fuga, realizado com o carbendazim em SAT, com a espécie padrão, *E. fetida*, em temperatura de 28 °C, Garcia et al., (2008) observaram que a concentração mediana efetiva (CE₅₀) foi de 33,3 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, e a concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) foi menor que 1 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. No presente trabalho, conduzido no mesmo substrato, porém com outra espécie padrão, *E. andrei*, e temperatura de 20 ± 4°C, a CE₅₀ foi de 76,12 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. Para a espécie *P. corethrurus* observou-se uma CE₅₀ de 65, 81 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, indicando sensibilidade para fuga similar a da espécie padrão, sem diferença estatística.

Observou-se que em SAT contaminado com carbofurano, a sensibilidade para as espécies avaliadas foram semelhantes, visto que, as concentrações mediana efetivas (CE₅₀) de *P. corethrurus* (4,70 mg i.a. kg⁻¹ de SAT) e *E. andrei* (7,19 mg i.a. kg⁻¹ de SAT), não diferiram estatisticamente (Tabela 2). Em solo artificial OECD contaminado com carbofurano, observou-se uma resposta de fuga para as espécies *Eisenia andrei* e *Perionyx excavatus* (ambas epigeicas) de CE₅₀ de 2,15 e 4,39 mg i.a. kg⁻¹ de SAT respectivamente, sendo a sensibilidade da primeira maior do que da segunda (De Silva et al., 2009b).

O comportamento de fuga para a espécie *E. andrei*, quando exposta a SAT contaminado com glifosato foi semelhante ao encontrado por Pereira et al. (2009) onde observaram fuga dos animais apenas nas concentrações de 30 - 47 mg i.a. kg⁻¹ de SAT.

2.4.2. Teste agudo- Mortalidade

Garcia (2004a) verificou efeitos agudos para SAT contaminado com carbendazim para a espécie *E. fetida*, observando concentrações medianas letais (CL₅₀) superiores a 1000 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, a maior concentração testada sem efeito observável (CENO) de 100 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, e a menor concentração avaliada com efeito observável (CEO) de 316 mg i.a. kg⁻¹ de SAT. Para a espécie *P. corethrurus* obteve CL₅₀ de 45 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, CENO de 31,6 mg i.a. kg⁻¹ de SAT e CEO 100 mg i.a. kg⁻¹ de SAT, constatando no teste agudo a maior sensibilidade a carbendazim de *P. corethrurus* quando comparada à espécie padrão. No presente trabalho a sensibilidade de *E. andrei* e *P. corethrurus* foram semelhantes, sem diferença estatística.

A CL₅₀ em solo contaminado com o carbofurano, encontrada no presente trabalho, para a espécie *E. andrei* foi a mesma de De Silva et al. (2009a) de 13,20 mg i.a. kg⁻¹, porém o

teste agudo foi realizado em solo artificial OECD. Em testes agudos realizados com *Perionyx excavatus*, espécie tropical, epigeica, em solo artificial OECD contaminados com carbofurano, observou-se uma CL_{50} de 4,39 mg i.a. kg^{-1} , enquanto que para *E. andrei* foi de 2,15 mg i.a. kg^{-1} , mostrando que a primeira espécie não é tão sensível quanto a espécie padrão, para esse agrotóxico (De Silva & Van Gestel., 2009b). No entanto, no atual trabalho, a espécie endogeica *P. corethrurus* teve maior sensibilidade que a espécie padrão, epigeica (*E. andrei*) no teste agudo com carbofurano.

O uso de glifosato em SAT, nas concentrações estudadas, não resultou em mortalidade significativa para as espécies avaliadas. Indicando semelhança na sensibilidade de *P. corethrurus* e de *E. andrei* para esse agrotóxico.

As variações nas concentrações-respostas encontradas na literatura, em testes ecotoxicológicos, podem estar associadas a diferenças na temperatura, a degradação ou metabolização dos agrotóxicos testados, e substrato usado, sendo pouquíssimos trabalhos realizados com SAT. As diferenças entre as respostas das espécies usadas, podem ser devido a diferenças nas características dos quimiorreceptores (Stephenson et al., 1998), na fisiologia, morfologia (Edwards & Bohlen, 1996) e ecologia (Lukkari & Haimi, 2005) das espécies avaliadas.

2.4.3. Sensibilidade das espécies

A sensibilidade de ambas as espécies foi semelhante nos testes de fuga e de mortalidade para o carbendazim e o glifosato, pois os valores de concentração mediana letal (CL_{50} - teste de mortalidade) e concentração mediana efetiva (CE_{50} - teste de fuga) não foram estatisticamente diferentes. A CE_{50} do carbofurano também não foi diferente entre as duas espécies, mas a CL_{50} foi estatisticamente diferente, indicando maior sensibilidade de *P. corethrurus* em relação à espécie padrão, *E. andrei*, à esse agrotóxico.

Contudo no presente estudo usaram-se números diferentes de minhocas nos testes ecotoxicológicos, seis animais da espécie *P. corethrurus* e dez animais de *E. andrei*. Essa diferença pode ter ocasionado alterações nas percentagens de indivíduos que sobreviveram e não apresentaram o comportamento de fuga nos testes realizados. Portanto, em ensaios futuros, recomenda-se utilizar o mesmo número de indivíduos das espécies a serem avaliadas.

As espécies tropicais endogeicas têm sido raramente usadas em testes ecotoxicológicos (De Silva & Gestel, 2009b) podendo apresentar sensibilidade diferente do que as espécies padrão. A espécie *P. corethrurus* foi recomendada como candidata para testes

ecotoxicológicos (Garcia, 2004a), sendo que esse autor mostrou como *P. corethrurus* é mais sensível que *E. andrei* em testes agudos com o agrotóxico carbendazim, ao contrário do observado nesse estudo.

A espécie padrão é epigeica, vivendo e alimentando-se na liteira. Quando o agrotóxico é aplicado no solo, este não fica restringido à camada superficial do solo, mas pode migrar para as camadas mais profundas (por exemplo, quando chove) onde os animais endogeicos como a *P. corethrurus* se encontram. *P. corethrurus* ingere solo, enquanto que *E. andrei*, alimenta-se mais de resíduo vegetal. Ao escavar e ingerir solo ou serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com poluentes no solo que podem estar na solução do solo ou adsorvidos nas partículas minerais e na matéria orgânica. Elas podem ainda absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula. Assim as minhocas podem se intoxicar, morrer ou sobreviver, incorporar ou até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (Viswanathan, 1994; Cortet et al., 1999; Burger, 2006). Isso pode ser um perigo para seus predadores, influenciando a cadeia trófica.

P. corethrurus é a única espécie nativa, da família Glossoscolecidae, que é amplamente distribuída na América do Sul e no mundo (Brown et al., 2006). Habita camadas meso-húmicas, do solo mineral, segundo a classificação de Lavelle (1984) e Barois et al. (1999), e é muito comum em quase todos os solos tropicais perturbados (Römbke & Verhaagh 1992). O uso dessa espécie tem sido intenso em estudos ecológicos tanto no laboratório, quanto na natureza (Lavelle et al. 1987; Hamoui 1991, Fragoso et al. 1999).

2.5. CONCLUSÃO

A espécie endogeica *Pontoscolex corethrurus* teve sensibilidade similar à espécie padrão na maioria dos testes ecotoxicológicos agudos e comportamentais avaliados neste trabalho. Somente no teste agudo realizado em SAT contaminado com carbofurano, houve sensibilidade maior de *P. corethrurus*.

Até o momento, apenas alguns contaminantes tem sido avaliados usando espécies tropicais nativas como *P. corethrurus* e faz-se necessário testar um maior número de agrotóxicos e metais pesados à exemplo, para comprovar se a sensibilidade desta espécie a esses contaminantes mantêm-se similar. É importante também testar outras espécies nativas para comprovar similaridade com a espécie padrão, caso não sejam similares para uma ampla

gama de contaminantes, espécies de minhocas endogeicas e nativas, então a representatividade da *E. andrei* será fortalecida, comprovando sua utilidade como bioindicadora de solos contaminados. Porém se houver importantes diferenças nas sensibilidades das espécies aos contaminantes, então será necessário rever o uso da espécie padrão nos testes ecotoxicológicos.

2.6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES – Universidade Federal do Paraná, pela bolsa de mestrado, a valiosa colaboração dos técnicos da Ecologia-Embrapa Florestas (Irineu Antônio Olinisky, Wilson Maschio e Paulino Graff), a Elda do laboratório de Física do Solo da Universidade Federal do Paraná, a colaboração incessante de Ana Simone Richter do Centro Paranaense de referência em agroecologia-CPRA, a experiência e apoio de George Gardner Brown (Embrapa-Florestas), José Paulo Filipe Afonso Sousa (Universidade de Coimbra, Portugal), Cintia Carla Niva (PNPD/ CNPq. Embrapa- Florestas), Marcos Garcia (Embrapa Amazônia), Klaus Dieter Sauter (Universidade Positivo), Maria Edna Tenório Nunes (Universidade Estadual de São Carlos), Sonia Chelinho (Universidade de Coimbra, Portugal), e ao estimado Lúcio Fabio Lourençato (Universidade Federal do Paraná).

2.7. REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro, 17 p., 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas**. ABNT-NBR 15537, Brasil. 2007.
- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; MATALLO, M. B. Glyphosate: Influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, Viçosa, 22 (1): 95-100, 2004.
- BAROIS, I.; LAVELLE, P.; BROSSARD, M.; TONDOH, J.; MARTINEZ, M.; ROSSI, J. P.; SENAPATI, B. K.; ANGELES, A.; FRAGOSO, F.; JIMENEZ, J. J.; DECAENS, T.; LATTAUD, C.; KANYONYO, J.; BLANCHART, E.; CHAPIUS, L.; BROWN, G.; MORENO, A. **Ecology of earthworm species with large environmental tolerance and/or extended distributions**. In: Lavelle, P.; Brussaard, L.; Hendrix, P. F. (eds) Earthworm management in tropical agroecosystems. Wallingford, UK: CAB International, 57-85, 1999.
- BOUCHÉ, M. B. Lombriciens de France. Écologie et systématique. I.N.R.A. Ann. **Zoology and Ecology and Animal**, 72 (2): 671 p., 1972.
- BRASIL, **Lei Federal de agrotóxicos** n. 7802 de 1989.
- BROWN, G. G.; JAMES, S. W.; PASINI, A.; NUNES, D. H.; BENTO, N. P.; MARTINS, P. T.; SAUTTER, K. D. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: Diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean journal of science**, 42 (3): 339-358, 2006.
- BURGER, J. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, 1: 22-39, 2006.
- CARVALHO FILHO, C. A.; TRINDADE, M. C.; BRANCO, O. E. A. Contamination by Mercury from Past Gold Mining Activities at Descoberto, State of Minas Gerais, Brazil: Historical Reconstitution. **XIII International Conference on Heavy Metals in the Environment**, 2005.
- CORTET, J.; VAUFLERY, A.G.; BALAGUER, N. P.; GOMOT, L.; TEXIER, C.; CLUZEAU, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **Journal Soil Biology**, 35 (3): 115-134, 1999.
- COUTINHO, C. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Revista ecotoxicológica e meio ambiente**, Curitiba, 16: 63-70, 2006.

- DARWIN, C. **The formation of vegetable mould through the action of worms.** Murray, London, 326 p., 1881.
- DE SILVA, P. M. C. S.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C. A. M. Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, 76: 1410-1415, 2009a.
- DE SILVA, P. M. C.S.; VAN GESTEL, C. A. M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere**, 77: 1609-1613, 2009b.
- EDWARDS, C.A.; THOMPSON, A.R. Pesticides and the soil fauna. **Residue Reviews**, 45: 25-32, 1973.
- EDWARDS, C.A.; LOFTY, J. R. **Biology of Earthworms.** Chapman and Hall Ltd, London, 1977.
- EDWARDS, C. A., BOHLEN, P. J. **Biology and Ecology of Earthworms.** Chapman and Hall Ltd, London, 1996.
- FRAGOSO, C.; LAVELLE, P.; LANCHART, E.; SENAPATI, B. K. ; JIMENEZ, J. J. ; MARTINEZ, M.; DECAENS, T.; TONDOH, J. **Earthworm communities of tropical agroecosystems: Origin, structure and influence of management practices.** In: Lavelle, P.; Brussaard L.; Hendrix, P. F. (eds). Wallingford, UK: CAB International. Earthworm management in tropical agroecosystems, 27-55, 1999.
- GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions.** Ecology and Development Series; Zentrum für 17 Entwicklungsfor schung, University of Bonn, 281p., 2004a.
- GARCIA, M. V. B.; ROEMBKE, J.; MARTIUS, C. 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. **25th Annual Meeting of SETAC**, 2004. Homepage: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2004/document/?id=41943>, 2004b.
- GARCIA, M. V. B.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, 153: 450-456, 2008.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, 11(7): 714-719, 1977.
- HAMOUI, H. Life-cycle and growth of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligoqueta, Glossoscolecidae) in the laboratory. **Revue d' Ecologie et de Biologie du sol**, 28 (4): 469-478, 1991.

- HELLING, B.; REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida*, (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 46: 108-116, 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS. **Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**, IBAMA, 1990.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality- Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate**. ISO 11268-1. Geneva, Switzerland, 1993.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction**. ISO 11268-2. Geneva, Switzerland, 1998.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. ISO 17512-1. Geneva, Switzerland, 2007.
- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ZECH, W. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. **Journal of Environmental Quality**, 31: 256-268, 2002.
- LAVELLE, P. The soil system in the humid tropics. **Biologie International**, 9: 2-17, 1984.
- LAVELLE, P.; BAROIS, I.; CRUZ, I.; FRAGOSO, C.; HERNANDEZ, A.; PINEDA, A.; RANGEL, P. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. **Biology of Fertility of Soils**, 5: 188-194, 1987.
- LEE, K. E. Earthworms: **Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use**. Sydney, Australia: Academic Press, 1985.
- LEVISKE, J. V. **Condições de segurança do produtor rural na utilização de agrotóxico na região oeste do Paraná**. Faculdade Assis Gurgacz, 79 p., 2007.
- LUKKARI, T.; HAIMI, J. Avoidance of Cu and Zn- contaminated soil by three ecologically different earthworm species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 62: 35-41, 2005.
- LUZ, T. N.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKEC, J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71: 545-551, 2008.
- NIELSEN, M. N.; WINDING, A. Microorganisms as indicators of soil health. Denmark: National environmental research institute, (**Technical report**, 388), 47-49, 2002.

- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT.
Guideline for the Testing of Chemicals n. 207, **Earthworm Acute Toxicity Tests**.
OECD, Paris, France, 1984.
- PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Dissipação de Simazina em solo por ação de minhocas (*Eisenia foetida*). **Revista Brasileira de Ciências do solo**, 25: 593-599, 2001.
- PEREIRA, J. L.; ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; MARQUES, C. R.; GONÇALVES, A. M. M.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, 18: 455-463, 2009.
- RAMOS, A. S.; CASTILHOS, Z. C.; EGLER, S. G.; Avaliação ecotoxicológica de solo contaminado por mercúrio metálico utilizando o oligoqueta *Eisenia foetida*. In: **XIV Jornada de Iniciação Científica**, Rio de Janeiro, 2006.
- RIBERA, D.; NARBONNE, J. F.; ARNAUD, C.; DENIS, M. S. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia foetida*, *andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. **Soil Biology and Biochemistry**, 33: 1123-1130, 2001.
- RICHARDSON, M.L. & GANGOLLI, S. **The dictionary of substances and their effects**.
Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1994, 44-47 p.
- ROBERTS, B.L.; DOROUGH, H.W. Chemical induction of midsegmental swelling in earthworms: structure-activity relationship (Abstract). Presented at the Fourth Annual Meeting, **Society of Environmental Toxicology and Chemistry**, Arlington, VA, 6-9 November, 1983.
- RÖMBKE, J.; VERHAAGH, M. About earthworm communities in a rain forest and an adjacent pasture in Peru. **Amazoniana**, 12: 29-49, 1992.
- RÖMBKE, J.; MELLER, M.; GARCIA, M. Earthworm densities in central Amazonian primary and secondary forests and a polyculture forestry plantation. **Pedobiologia**, 43: 518-522, 1999.
- SILEO, L.; GILMAN, A. Carbofuran induced muscle necrosis in the earthworm. **Journal of Invertebrates Pathology**, 25: 145-148, 1975.
- SILVA, C. M. M. S.; DE MELO, I. S.; MAIA, A. H.; ABAKERLI, R. B. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37 (7): 1255- 1264, 1999.
- SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R; RIZZO, A C; MOREIRA, J. C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia foetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Revista brasileira da sociedade de ecotoxicologia**, 1 (2): 41-44, 2006.

- STEPHENSON, G.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N. K.; SOLOMON, K. R.; STEELE, T.; SCOGGINS, R. P. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Sheppard, S.C., Homstrup, J.D., Posthuma, L. (Eds.), *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. **SETAC Press**, Pensacola, FL, 67–81, 1998.
- VISNATHAN, R. Earthworms and assessment of ecological impact of soil xenobiotics. **Chemosphere**, 28: 413-420, 1994.