



AValiação DA SENSIBILIDADE DOS ISÓPODOS *CUBARIS MURINA* BRANDT (1833) E *TRICHORHINA HETEROPHTHALMA* LEMOS DE CASTRO (1964) QUANTO A SENSIBILIDADE AO SULFATO DE COBRE EM TESTES DE FUGA E MORTALIDADE.

Neves, V. T. de C.¹

Niemeyer, J. C.^{1&2}; Santana, L. P.¹; Da Silva, E. M.¹

1. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica Rua Barão de Jeremoabo, s/n - Campus Universitário de Ondina, 40170 - 115, Salvador, BA, Brasil.

2. Universidade de Coimbra, IMAR-Centro Interdisciplinar de Coimbra, Departamento de Zoologia, Coimbra, Portugal. vivianetcn@gmail.com

INTRODUÇÃO

O solo possui usos e funções extremamente importantes na regulação do equilíbrio ambiental (Ribeiro, 1992). Solos contaminados têm se tornado um importante problema, pois podem levar à perda da função de habitat, contaminação de lençóis freáticos, biomagnificação dos contaminantes e afetar a saúde humana (Mielke e Reagan, 1998; Loureiro *et al.*, 2005; 2009).

Alguns grupos da fauna edáfica, por exemplo, os isópodos, possuem potencial para indicar o impacto da poluição na qualidade dos solos (Drobne, 1997; Cortet *et al.*, 1999; Paoletti e Hassall, 1999) além de terem papel fundamental na ciclagem de nutrientes (van Straalen, 2004). Porém, algumas variáveis como crescimento, reprodução e ciclo de vida não são as mais indicadas para serem avaliadas em testes com isópodos devido aos seus longos ciclos de vida (Drobne, 1997), enquanto mortalidade é uma resposta severa à exposição ao contaminante (Cortet *et al.*, 1999) o que é desinteressante em termos de aplicação ecológica. Já as alterações de comportamento (testes de fuga) são considerados bons alvos fisiológicos na avaliação de solos contaminados (Loureiro *et al.*, 2009) e vêm sendo muito utilizados em estudos, inclusive com outros invertebrados (Schaefer, 2003; Natal-da-Luz *et al.*, 2004; 2008). As alterações no comportamento podem ter um importante impacto nos ecossistemas terrestres (Schaefer, 2003) e podem ser um teste de rastreio adequado para a "função habitat" dos solos (Hund-Rinke, 2003).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi comparar a sensibilidade de duas espécies de isópodos terrestres, *Cubaris murina* e *Trichorhina heterophthalma*, ao cobre. Dois alvos fisiológicos

foram observados: alterações no comportamento (fuga) e mortalidade, em diferentes tempos de exposição.

MATERIAL E MÉTODOS

Testes de fuga

Foram selecionados indivíduos adultos, obtidos de cultivos laboratoriais de *Cubaris murina* e *Trichorhina heterophthalma*, de ambos sexos, pesando entre 11,6 e 23 mg e 0,9 e 2,6 mg, respectivamente. A substância testada foi o sulfato de cobre pentahidratado. Para ambas espécies, as concentrações testadas, C1 (60 mgCu/kg), C2 (200 mgCu/kg), C3 (300 mgCu/kg), C4 (400 mgCu/kg), C5 (500 mgCu/kg) foram determinadas tendo como base os valores orientadores para solo e água subterrânea no estado de São Paulo (CETESB, 2005) e dados encontrados na literatura. Utilizou-se nos ensaios o Solo Artificial Tropical (SAT) que consiste em 70% areia, 20% caulim e 10% pó de casca de coco (Garcia, 2004). Os indivíduos foram aclimatados por no mínimo 24 horas no SAT antes de serem utilizados nos testes. Os solos testados foram obtidos misturando-se a solução de sulfato de cobre no SAT, nos volumes exatos para cada concentração. Posteriormente, foi adicionada água destilada, de modo que todos os solos tivessem a umidade ajustada para 50% da capacidade de retenção de água (CRA). No solo controle foi adicionado apenas água destilada. Caixas plásticas retangulares (13cm x 17,5cm x 5cm) foram divididas ao meio por um divisória plástica removível. Em um lado foi adicionado o solo controle (150g) e no outro o solo testado (150g). A divisória foi retirada e 10 isópodos adultos foram colocados ao centro da caixa em cada uma das cinco réplicas. Após cada período de exposição (4h, 24h, 48h e 7 dias), os organismos eram contados, retirados e recolhidos no lado em que foram encontrados. Indivíduos não encontrados foram considerados mortos. Os testes foram

repetidos, utilizando - se caixas menores (14cm X 10 cm X 5cm). Em um lado foi adicionado 75g de solo controle e do outro 75g de solo contaminado.

Testes de mortalidade (teste agudo)

As concentrações testadas foram: controle, C1 (200 mgCu/kg), C2 (400 mgCu/kg), C3 (600 mgCu/kg), C4 (800 mgCu/kg), C5 (1000 mgCu/kg) e 100g de solo foram distribuídos em vasilhas plásticas circulares ($\varnothing=10,5$ cm, h=6cm) e indivíduos com a mesma classe de peso foram usados nos testes, para as duas espécies testadas. As leituras foram feitas ao final de 7 e 14 dias, quando os isópodos vivos foram contados e retirados os mortos. As vasilhas foram pesadas no início do teste e ao 7º dia. A diferença (perda de água) foi corrigida pela adição de água destilada.

Todos os testes foram mantidos a 25°C e fotoperíodo 12:12h (claro:escuro). Umidade e pH foram medidos no início e no final de cada ensaio, seguindo as normas ISO - 11465: 1993 e ISO - 10390: 2005, respectivamente.

Análises estatísticas

Testes de fuga

A ocorrência de fuga do solo contaminado nas diferentes combinações foi avaliada por meio do teste Exato de Fisher, sendo que nos testes controle (Co - Co) foi realizado teste bi - caudal e nas demais combinações foi feito teste uni - caudal. O nível de significância adotado foi 0,05 e as diferenças estatísticas com valor $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Foi utilizada a definição de “função hábitat” proposta pela norma ISO 17512 - 1(2007a) onde se a porcentagem de animais vivos no solo contaminado for menor que 20%, considera - se que ocorreu impacto no comportamento dos organismos testados e assim o solo é considerado como tóxico ou de menor qualidade.

Mortalidade

Os valores da concentração média letal (CL_{50}) foram determinados utilizando - se o método das unidades de probabilidades (*Probit*).

RESULTADOS

No primeiro teste de fuga feito com *C. murina* não ocorreu fuga do solo contaminado nas combinações Co - C1 e Co - C2 em nenhum tempo de exposição. Na combinação Co - C3, somente a partir do 48h foi verificada fuga, enquanto na combinação Co - C4 ocorreu fuga em 4h, 24h e 48h. Na combinação Co - C5 a fuga foi verificada em 24h. Com base na definição de “função hábitat”, a concentração 3 (48 h e 7 dias de exposição) e a concentração 4 (48h de exposição) podem ser considerados como tóxicos ou de menor qualidade. Quando os testes foram repetidos em caixas plásticas menores houve menor variabilidade nos resultados. Na combinação Co - C1 ocorreu fuga a partir de 48h, enquanto nas combinações Co - C2, Co - C3, Co - C4 ocorreu fuga a partir de 4h. Na combinação Co - C5 ocorreu fuga a partir de 48h. Os dados da repetição do ensaio disponíveis são de exposições até 48h. Nas combinações Co - C2, C0 - C3, Co - C4 a função de hábitat foi limitada. Apesar dos resultados dos ensaios não terem sido os mesmos em relação à concentração e o tempo de resposta mínimos, verifica - se que *C. murina* é sensível à presença de sulfato de cobre.

Nos testes de mortalidade, ocorreu mortalidade insuficiente para preencher os parâmetros requeridos pelo aplicativo *Probit* (ao menos duas concentrações com 0% e 100% de mortalidade) para gerar o valor de CL_{50} . Assim, os valores apresentados estão em porcentagem de indivíduos vivos. Não ocorreu mortalidade superior a 5%, nem mesmo nas concentrações mais altas (1000mgCu/kg).

Nos testes de fuga utilizando *T. heterophthalma* foi verificada distribuição aleatória dos indivíduos nos testes controle (Co - Co). Ocorreu grande mortalidade em todas combinações (média: 30%), incluindo o teste controle (Co - Co), com 46% de mortalidade na última leitura. Apesar destes valores estarem fora dos parâmetros para validação, de menos de 10% e 20% de mortalidade no controle, determinados pelas normas ISO (2007a; 2007b, respectivamente), demos prosseguimento aos testes e análises estatísticas ajustando o valor de N, isto é, no início do teste o valor de N era 50, mas no decorrer deste o N passou a ser o valor encontrado na leitura anterior. Jänsch *et al.*, (2005) verificaram grande mortalidade, até 30% em solos controle. Entretanto, mesmo ocorrendo tal mortalidade, eles propuseram considerar os resultados como válidos, pois não há dados para validação do teste com a espécie estudada (*Porcellionides pruinosus*). No presente trabalho, a alta mortalidade foi verificada em solos contaminados o que nos permite também propor que estes dados sejam considerados válidos, levando - se em consideração também que os dados foram ajustados. Com exceção da combinação Co - C1, foi verificada fuga do solo contaminado e limitação da “função hábitat” em todas as combinações. Na combinação Co - C2, ocorreu fuga em 24 e 48h. Nas combinações Co - C3 e Co - C4 ocorreu fuga a partir de 24h, enquanto em Co - C5 somente em 48h. No ensaio utilizando caixas plásticas menores foi verificada fuga nas combinações Co - C3 e Co - C4 em 24h e 48h; Co - C5, a partir de 24h. Não ocorreu fuga nas concentrações Co - C1 e Co - C2. A “função hábitat” foi limitada nas combinações Co - C3, Co - C4 e Co - C5. A mortalidade média foi de 13%. A alta mortalidade na caixa maior comparada com a caixa menor pode ser justificada pelo stress da manipulação e do contaminante somados, a maior superfície de contato com o contaminante e o maior esforço de busca.

No teste de mortalidade, também para esta espécie ocorreu mortalidade insuficiente para o uso do *Probit*. O valor máximo, 20% de mortalidade, foi verificado na concentração mais alta aos 14 dias. Entretanto, foi próximo ao verificado no controle no mesmo período: 14%.

De modo semelhante ao presente estudo, em outras pesquisas nas quais foram realizados testes agudos e crônicos com isópodos, os testes crônicos apresentaram uma maior sensibilidade (Niemeyer,2004; Jänsch *et al.*, 005). Fato também verificado por Schaefer (2003) utilizando *Eisenia fetida* (Oligochaeta).

Em relação à baixa mortalidade no teste agudo, também no trabalho de Vink *et al.*, (1995) que testaram a importância da rota de exposição em testes de toxicidade de pesticidas utilizando isópodos, não foi possível calcular a CL_{50} para algumas das substâncias para um período menor que três semanas, devido à baixa mortalidade.

O fato de os isópodos armazenarem metais pesados no hepatopâncreas (Sutton, 1980; Warbrug, 1993; Alikhan, 2003a)

pode estar relacionado à resistência às altas concentrações de cobre no ambiente. Entretanto, o custo do processo de detoxificação reduz as reservas de energia, o tamanho e gera alterações na ecdise e reprodução (Jones e Hopkin, 1998; Alikhan, 2003b).

CONCLUSÃO

Os testes de fuga foram mais sensíveis do que os testes de mortalidade para as espécies estudadas em solo contaminado com sulfato de cobre.

Ocorreu fuga em todas as concentrações testadas, sendo que na mais baixa, C1 (60mgCu/kg), ela ocorreu somente em 48 horas utilizando caixas menores com *C. murina*. Deste modo, ambas espécies são sensíveis à contaminação por sulfato de cobre em níveis nos quais, segundo o CONAMA (2005), é necessária intervenção.

As espécies estudadas mostraram grande tolerância ao solo contaminado por sulfato de cobre nos testes de mortalidade (14 dias), o que indica que este teste não é apropriado para investigar este tipo de contaminação.

REFERÊNCIAS

Alikhan, M. A. The physiological consequences of metal and other environmental contaminants to terrestrial isopod species. In: Sfenthourakis, Spyros *et al.*, . (eds.). *The biology of terrestrial isopods, V* : Oniscidea rolling into the new millennium: proceedings of the 5th International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods: Irakleio (Iraklion) Crete, Greece, 19 - 23 May 2001. Leiden; Boston: Brill, 2003a, p.263 - 284.

Alikhan, M. A. Effect of copper and nickel contamination on growth and fecundity in *Porcellio spinicornis* (ISOPODA). In: Sfenthourakis, Spyros *et al.*, (eds.). *The biology of terrestrial isopods, V*: Oniscidea rolling into the new millennium: proceedings of the 5th International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods: Irakleio (Iraklion) Crete, Greece, 19 - 23 May 2001. Leiden; Boston: Brill, 2003b, p.285 - 297.

CETESB, São Paulo. Decisão de Diretoria nº 195 - 2005 - E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo - 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. São Paulo, 2005, publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo de 03 de dezembro de 2005, retificada em 13 de dezembro de 2006. Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>.

Cortet, J., Vlaufery, A.G.D., Poinot - Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur J Soil Biol.* 35: 115 - 134, 1999.

Drobne, D. Terrestrial isopods - a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1159-1164, 1997.

Garcia, M. *Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicological tests methods for tropical regions*. Ecology and development series, n. 19. Cuvillier Verlag, Göttingen, 2004, 285p.

Hund - Rinke, K., Achazi, R., Römbke, J., Warnecke, D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: results of a laboratory comparison test. *J Soils & Sediments*, 3: 7 - 12, 2003.

International Organization for Standardization. ISO 17512 - 1: Soil quality - Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemical on behavior. Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva, Suíça, 2007a.

International Organization for Standardization. ISO 17512 - 2: Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior. Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*), Geneva, Suíça, 2007b. Em desenvolvimento.

Jänsch, S., Garcia, M., Römbke, J. Acute and chronic isopod testing using tropical *Porcellionides pruinosus* and three model pesticides. *Eur J Soil Biol.*, 41: 143 - 152, 2005.

Jones, D.T., Hopkin, S.P. Reduced survival and body size in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal - polluted environment. *Environ Pollut.*, 99:215 - 223, 1998

Loureiro, S.; Soares, A. M.V.M., Nogueira, A. J.A. Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ. Poll.*, 138: 121 - 131, 2005.

Mielke, H.W., Reagan, P.L. Soil is a important pathway of human lead exposure. *Environ Health Perspect*, 106: 217 - 229, 1998.

Natal - da - Luz, T., Ribeiro, R., Sousa, J. P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site - specific assessment of polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:2188 - 2193, 2004.

Natal - da - Luz, T., Amorin, M. J.B., Römbke, H., Sousa, J.P. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. *Ecotox. Environ. Safe.*, 71:545 - 551, 2008.

Niemeyer, J. C. Aspectos biológicos de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em laboratório e seu uso em ecotoxicologia: estudo da sensibilidade ao glifosato. Instituto de Biologia, Salvador, BA, UFBA. 2004, 87p.

Paoletti, M. G., Hassall, M. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 157 - 165, 1999.

Ribeiro, A. de J. B. Contribuição para o estudo da contaminação de solos por metais pesados: caso do cobre num regossolo psamítico. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, Universidade Nova de Lisboa, 1992, 135p.

Schaefer, M.. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *J Soils & Sediments*, 3: 79 - 84, 2003.

Sutton, S.L. *Woodlice*. Pergamon Press, Oxford, 1980, 143 p.

van Gestel, C.A.M., van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., van der Hoek, E.E., Veul, M. F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G. N.M. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and

bioremediation efficiency of oil - polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1438 - 1449, 2001.

van Straalen, N. The use of soil invertebrates in ecological surveys of contaminated soils. In: P. Doelman and H.J.P. Eijsackers (eds.). *Vital Soil. Function, Value and Properties*, Elsevier, Amsterdam, p. 159-195, 2004.

Vink, K., Dewi, L., Bedaux, J., Tompot, A., Hermans,

M. van Straalen, N.M. The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprotrophic isopods. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 1225 - 1232, 1995.

Warburg, Michael. *Evolutionary biology of land isopods*. Springer - Verlag, Berlin, 1993, 159 p.