



ECOTOX - BRASIL

Ecotoxicol. Environ. Contam., v. 8, n. 1, 2013, 143-146
doi: 10.5132/eec.2013.01.021

EEC

SHORT COMMUNICATION

Bioensaios para avaliação da toxicidade aguda, reprodução e ganho de biomassa de minhocas (*Eisenia fetida*) ambientadas em lodo de esgoto doméstico

P.R. DORES-SILVA, M.D. LANDGRAF & M.O.O. REZENDE*

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo. Av. Trabalhador São-carlense, 400 - CP - 780.
CEP 13560-970 - São Carlos – SP.

(Received April 19, 2010; Accept November 20, 2012)

Resumo

Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos que o lodo de esgoto doméstico produz na toxicidade, reprodução e ganho de biomassa em minhocas *Eisenia fetida*. Os resultados obtidos demonstraram que nem o LED nem tampouco o LED diluído em solo apresentam toxicidade aguda para as minhocas sendo que estas tiveram um ganho de biomassa durante os primeiros 14 dias de exposição ao resíduo; no entanto após este período, os organismos tenderam a perder massa.

Palavras-Chave: toxicidade aguda, *Eisenia fetida*, lodo de esgoto doméstico.

Use of bioassays to evaluate the effect of acute toxicity, reproduction and increase of biomass of earthworms *Eisenia fetida* in acclimated domestic domestic sewage sludge

Abstract

As main objective, this work evaluates the effect of the sewage sludge on the acute toxicity, reproduction and on the increase of biomass of earthworms *Eisenia fetida*. The results showed that none of the initial matrices (sewage sludge itself or mixed with soil) presented acute toxicity for the earthworms nor interfere in a negative way on the increase of biomass during the first 14 days. However after this period the organisms tended to lose weight.

Keywords: acute toxicity, *Eisenia fetida*, domestic sewage sludge

INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto doméstico (LED) é um resíduo rico em matéria orgânica, além de ser uma fonte de micro e macro nutrientes, o que confere ao solo, quando é utilizado como condicionador ou fertilizante, uma maior capacidade de retenção de água, maior resistência à erosão e, ao mesmo tempo, oferece uma solução razoável e ambientalmente adequada para o destino final do resíduo que é gerado durante o tratamento das águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgoto. No entanto, com a finalidade de diminuir, ou até mesmo eliminar,

os inconvenientes do odor e da presença de patógenos no resíduo são empregados processos químicos, físicos e biológicos que estabilizam o lodo (Yadav & Garg, 2009).

Visando a sanar problemas relacionados com as técnicas de estabilização, propõe-se a utilização desse resíduo como matriz para a produção de vermicomposto. Entretanto, se faz necessário avaliar o grau de toxicidade que a matriz LED possui, visando assim, a otimizar a adaptação das minhocas e, desta maneira, otimizar o processo de vermicompostagem.

No Brasil, como mencionado no artigo de Sisinnio *et al.* (2006), não existem muitos estudos relatando a ecotoxicidade

*Corresponding author: Maria Olímpia O. Rezende; e-mail: mrezende@iqsc.usp.br

com organismos que vivem no solo, o que leva à utilização de métodos internacionalmente reconhecidos, como os da ISO, OECD e EPA. Esses métodos, entretanto, são desenvolvidos para determinar a toxicidade de substâncias adicionadas a um solo artificial, a fim de que vários interferentes sejam eliminados.

O grande desafio na adaptação de métodos para a avaliação da toxicidade em LED é a substituição do substrato artificial pelas amostras de LED e LED diluído em solo, avaliação de possíveis interferentes nos resultados, bem como a escolha dos organismos-teste para amostras com características específicas.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o grau de toxicidade aguda, a reprodução e o ganho de biomassa, durante o período de teste, das minhocas da espécie *Eisenia fetida* em resíduo sólido LDE, visando, assim, a otimizar a adaptação das minhocas a esse resíduo, bem como em processo de vermicompostagem. Avaliou-se, também, o grau de toxicidade de diferentes porcentagens de LDE, quando acrescentadas em solo, uma vez que as minhocas são consideradas bioindicadores ambientais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de toxicidade aguda e reprodução foram realizados de acordo com as normas ISO 11268-1 (ISO, 1993) e ISO 11268-2 (ISO, 1998). Todos os ensaios foram realizados com cinco repetições, sendo cada resultado a média aritmética dessas repetições, desenvolvidos em condições controladas de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12 h:12 h) e umidade 60%, conforme as exigências das referidas normas.

O lote de organismos foi avaliado por meio de um ensaio com a substância de referência cloroacetamida, indicada nas normas da ISO 11268-1 para o organismo-teste utilizado. CL_{50} da cloroacetamida para minhocas deve estar entre 20 mg kg^{-1} e 80 mg kg^{-1} (ISO, 1993). As minhocas utilizadas eram indivíduos adultos e clitelados com peso entre 300 e 800 mg, criadas em esterco bovino semi-compostado.

Preparo das amostras

As amostras utilizadas foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto de Água Vermelha, distrito de São Carlos, SP, gerenciado pelo SAAE - São Carlos. A coleta das amostras foi realizada a partir do lodo de esgoto doméstico, tratado em reator **anaeróbio de fluxo ascendente** (UASB), com cerca de 45% de umidade, e sem ter sido estabilizado por nenhum processo, ou seja, lodo *in natura*. Para os ensaios de toxicidade aguda foram utilizados aproximadamente 2 kg de LED ou das misturas LED e solo *in natura*. O solo, classificado como latossolo vermelho-escuro distrófico, foi coletado nas imediações da ETE, entre 10 e 40 cm de profundidade. Algumas características químicas desse solo são apresentadas na Tabela 1.

Para a determinação dos parâmetros químicos, o solo e o LED foram secos em estufa a $60 - 65^{\circ}\text{C}$, para retirar a água

Tabela 1 - Caracterização química do LED e do solo utilizados no experimento.

Parâmetros	LED*	Solo
Teor de Umidade (% m/m)	47,90 (0,65)	21,20 (0,12)
Teor de Matéria Orgânica (mg kg^{-1})	572500 (2000)	36900 (2000)
CTC ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	24,54 (0,54)	2,66 (0,37)
COT (mg kg^{-1})	310000 (23300)	15600 (600)
NKT (mg kg^{-1})	24400 (300)	06400 (300)
C/N	16,69 (1,21)	2,83 (0,08)
Teor de P (mg kg^{-1})	11200 (900)	04800 (900)
pH	4,45 (0,03)	4,88 (0,04)

*LED = Lodo de esgoto doméstico; entre parênteses o erro para $n = 5$

capilar e gravitacional (MAPA, 2007) e foram macerados até homogeneização das amostras, as quais foram peneiradas em peneiras de malha de 250 μm de diâmetro para remover as impurezas.

Preparo dos recipientes para os ensaios

Para a realização do experimento foram utilizados 30 recipientes de plástico com capacidade de 2 L, recobertos com tampas furadas para permitir a entrada de ar. A cada um desses recipientes foi adicionado LED ou LED e solo nas proporções: 100% LED m/m (A); 75% LED e 25% solo m/m (B); 50% LED e 50% solo m/m (C); 25% LED e 75% solo m/m (D); 10% LED e 90% solo m/m (E) e 100% solo (F); sendo este último utilizado como controle. As misturas foram devidamente homogeneizadas antes de se iniciarem os ensaios.

Testes de toxicidade aguda, reprodução e ganho de biomassa

Para o ensaio de toxicidade aguda e ganho de biomassa foram utilizados 10 organismos adultos em cada tratamento, com a amostra de LED e as misturas de LED e solo. Antes de serem inoculadas nos recipientes todas as minhocas foram pesadas em balança analítica, para posterior cálculo do ganho de biomassa. Após o 7^o dia de exposição, os organismos mortos foram retirados e os sobreviventes pesados e mantidos até o 14^o dia, quando, então, foram novamente pesados e separados para que o percentual de mortalidade obtido fosse comparado com o controle.

Nos ensaios de reprodução, os organismos sobreviventes permaneceram nos recipientes até o 28^o dia quando foram retirados, e novamente pesados, para que os casulos resultantes permanecessem até o 56^o dia do ensaio. Após esse período, os jovens foram contados e comparados ao controle.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LED E SOLO

Foi realizada a caracterização química do LED e do solo, segundo os seguintes parâmetros: pH em CaCl_2 ; nitrogênio Kjeldahl total (NKT), pelo método Hach 399; fósforo, pelo método Hach 480; carbono orgânico (COT) via TOC-V COH

Shimadzu; capacidade de troca catiônica (CTC), através de ocupação dos sítios ativos de troca com íons de hidrogênio em solução 1 mol L⁻¹ de ácido acético glacial; teor de matéria orgânica (MO) e umidade (U), por gravimetria e razão atômica entre carbono e nitrogênio (C/N), que é um parâmetro indicativo do grau de humificação das matrizes (Cotta *et al.*, 2007, Guerrini & Trigueiro, 2004, MAPA, 2007).

As determinações foram feitas em quintuplicata, sendo o erro estipulado para um intervalo de confiança de 95 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização química do LED e do solo utilizados no experimento está apresentada na Tabela 1.

Comparando os dados da Tabela 1 pode-se observar que as características químicas do LED como, por exemplo, o NKT, P, COT, CTC, MO e C/N, são maiores, quando comparados com os valores encontrados no solo *in natura*, utilizado para as diluições. Isso demonstra o grande potencial que o LED possui para ser utilizado como condicionador de solos, quando considerados esses parâmetros.

Nos ensaios de toxicidade aguda, verificou-se que todos os organismos expostos aos tratamentos sobreviveram. Esses resultados indicam que o LED inicialmente não possui efeito tóxico.

No entanto, para todos os ensaios de reprodução, com exceção do tratamento realizado como controle (100% solo), não foram encontrados organismos jovens nem casulos, o que indica que as minhocas não se reproduziram. Além disso, observou-se que no 28^o dia de teste houve uma perda de biomassa e um atrofiamento das minhocas, indicando que há efeitos tóxicos a partir de 14 dias e, conseqüentemente, que o lodo de esgoto possui efeito tóxico sobre a reprodução das minhocas (Tabela 2).

O ensaio de reprodução mostra que para todas as proporções utilizadas nas diluições do LED em solo, as minhocas não se reproduziram, enquanto que no controle observou-se que houve reprodução. Houve um aumento na natalidade de aproximadamente 68%. Logo, pode-se concluir que o LED em solo apresenta toxicidade aos organismos terrestres. Dessa forma, o LED não deve ser adicionado ao solo sem antes ser estabilizado de maneira a eliminar sua toxicidade (Andreoli, 2001). No entanto, a literatura reporta que o lodo de esgoto com algumas modificações, pH corrigido para a faixa ideal e com

saturação de bases para 70%, pode ser utilizado como fertilizante agrícola para o cultivo da alface (Lopes *et al.*, 2005).

Todos os tratamentos acrescentando LED ao solo possuem efeito deletério sobre as minhocas. Inicialmente, observa-se um ganho de biomassa evidenciando um crescimento das minhocas e uma boa adaptação delas ao resíduo (Tabela 2). Em seguida, a partir do 14^o dia, observa-se uma perda de biomassa, evidenciando efeito tóxico do LED sobre as minhocas. Apenas o substrato formado por 100% solo (tratamento F) propiciou incremento na biomassa avaliada no 28^o dia e reprodução das minhocas avaliada no 56^o dia. Apesar da espécie *E. fetida* ser detritívora, tais resultados podem ser explicados devido ao alto teor de matéria orgânica presente no solo utilizado nos experimentos.

Para elucidar este problema, ensaios de toxicidade crônica devem ser realizados e o agente tóxico, seja ele biológico ou químico, deve ser encontrado e eliminado. Outros trabalhos da literatura demonstraram certa toxicidade de lodos de esgoto testados para fins agrícolas, em sistemas aquáticos, usando como avaliação dessa toxicidade o invertebrado *Daphnia similis* (Jonsson & Maia, 2007).

Outras técnicas de estabilização do lodo podem ser necessárias antes de sua adição ao solo, ou antes de se iniciar o processo de vermicompostagem, como uma etapa de pré-compostagem, com o intuito de se eliminar parte dos microrganismos presentes no LED.

CONCLUSÕES

Os testes ecotoxicológicos mostraram que o LED não possui efeito de toxicidade aguda para as minhocas da espécie *E. fetida*. Entretanto, o teste de reprodução apresentou um efeito deletério sobre a reprodução das minhocas, já que em nenhum dos tratamentos envolvendo adição de LED ao solo foram observados casulos ou organismos jovens, enquanto que no controle (apenas solo) foram encontrados tanto casulos como organismos jovens. Desta maneira, pode-se concluir que devido à presença do LED as minhocas não se reproduziram.

Para o ganho de biomassa, o comportamento foi ascendente no início do ensaio e descendente ao final, indicando que a toxicidade causada pelo LED não é aguda. Testes de toxicidade crônica devem ser realizados, e os agentes tóxicos, biológicos ou químicos, encontrados e eliminados. Após isso, novos testes de reprodução e toxicidade devem ser realizados para se avaliar o potencial que o LED, semi-estabilizado, possui para ser utilizado como substrato para o processo de vermicompostagem, visando à destinação ambientalmente segura e sustentável do lodo de esgoto doméstico. Esse substrato apresenta características químicas, tais como altos teores de NKT, P, CTC e COT que lhe conferem a possibilidade de ser utilizado como adubo orgânico. No entanto, outros parâmetros tais como pH e razão C/N, bem como a existência de microrganismos patogênicos e possível presença de elementos tóxicos, devem ser avaliados para o almejado aproveitamento sustentável desse resíduo.

Tabela 2 - Variação na biomassa das minhocas (g) durante os 28 dias de ensaio; A = 100% LED; B = 75% LED + 25% solo; C = 50% LED + 50% solo; D = 25% LED + 75% solo; E = 10% LED + 90% solo; F = 100% solo (controle).

Dia do ensaio	A	B	C	D	E	F
0	0,48 (0,01)	0,54 (0,01)	0,47 (0,02)	0,60 (0,02)	0,54 (0,02)	0,52 (0,01)
14 ^o	0,51 (0,03)	0,60 (0,03)	0,49 (0,00)	0,63 (0,01)	0,57 (0,01)	0,53 (0,00)
28 ^o	0,41 (0,01)	0,45 (0,02)	0,43 (0,01)	0,53 (0,00)	0,51 (0,01)	0,56 (0,01)

entre parênteses o erro para n = 5

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq e pela FAPESP, processo: 07/50776-4, e Paulo R. Dores-Silva agradece ao programa Ensinar com Pesquisa da Universidade de São Paulo, pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLI, C. V., 2001, Higienização do Lodo de Esgoto. In: C Andreoli. (Org.). Resíduos Sólidos no Saneamento: Processamento, Reciclagem e Disposição Final. 1ª. ed. Rio de Janeiro-RJ: RiMa, ABES, 257 p.
- COTTA, J. A. O.; SALAMI, F. H.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D., 2007, Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. *Analytica*, São Paulo, 1: 68-75.
- GUERRINI, I. A. & TRIGUEIRO, R. M., 2004, Atributos físicos e químicos e substratos compostos por biossólidos e casca de arroz carbonizada. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 28: 1069-1076.
- ISO (International Organization for Standardization), 1993, ISO 11268-1 – Soil quality – effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneva, ISO.
- ISO (International Organization for Standardization), 1998, ISO 11268-2 – Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva, ISO.
- JONSSON, C. M. & MAIA, A. H. N., 2007, Avaliação da toxicidade do lodo de esgoto de duas estações de tratamento para o invertebrado aquático *Daphnia similis*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, 17: 1-8.
- LOPES, J.C.; RIBEIRO, L.G.; ARAÚJO, M.G.; BERHALDO, M.R.B.S., 2005, Produção de alfaca com doses de lodo de esgoto. *Hortic. Bras.*, Brasília, 23: 1, 143-147.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (Brasil), 2007, Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organominerais e Corretivos, Métodos Oficiais, Brasília, 141.
- SISINNO, C. L. S.; LIMA, A. C.; BULUS, M. R. M.; MOREIRA, J.C., 2006, Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de Áreas contaminadas: Resultados preliminares para contaminação com hidrocarbonetos, *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, 1: 2, 137-140. <http://dx.doi.org/10.5132/jbse.2006.02.009>.
- YADAV, A. & GARG, V. K., 2009. Feasibility of nutrient recovery from industrial sludge by vermicomposting technology *J. Hazard. Mater*, 168: 262-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.035>.