

NOTA TÉCNICA

SAGE- 2020-01

Documento técnico produzido pelo SAGE – Núcleo Rogério Valle de Produção Sustentável.

Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia | Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Gestão Tecnológica - CT2 | Rua Moniz Aragão n° 360, Bloco 2 | Ilha do Fundão | Cidade Universitária | RJ
| CEP 21941-972 +55 (21) 3938-3545 | 3938-3538 • www.sage.coppe.ufrj.br • contato@sage.coppe.ufrj.br

Este estudo é parte integrante de um esforço maior, multidisciplinar, de estudo dos *“Impactos ambientais da ruptura da barragem de rejeitos de Brumadinho nos primeiros doze meses após o desastre: avaliação da qualidade da água, de rejeitos, solos e sedimentos e da biota aquática e comunidades ripárias no Rio Paraopeba”* conduzido pela COPPE/ UFRJ com apoio da Fundação Coppetec e da Vale S/A. Em particular esta nota técnica diz respeito ao *“Estudo sobre a biota aquática e comunidades ripárias”* que foi coordenada pelo SAGE – Núcleo Rogério Valle de Produção Sustentável, com a seguinte equipe:

Dr. Virgílio José Martins Ferreira Filho	Coordenação geral
Msc. Artur Obino Neto	Coordenação administrativa e financeira
Dr. Leandro Talione Sabagh	Coordenação técnica
Msc. Gabriel Oliveira Carvalho	Análise de informações
Geog. Melissa de Carvalho Martingil	Especialista em geoprocessamento
Dr. Paulo Sergio Salomon	Responsável Microbiota
Dr. Carlos Eduardo Grelle	Responsável Mastofauna
Dr. Vinicius Fortes Farjalla	Responsável Limnologia
Dr. Olaf Malm	Responsável Ecotoxicologia
Dr. Rodrigo Leão de Moura	Responsável Ictiofauna
Dr. Matheus Oliveira Freitas	Especialista Ictiofauna
Dra. Cláudia Teixeira	Responsável Análises Ambientais
Dra. Juliana da Silva Leal	Responsável Macroinvertebrados
Dr. Cláudio Ernesto Taveira Parente	Especialista Ecotoxicologia
Dr. Arthur Weiss Silva-Lima	Especialista em Microbiota
Dr. Adan Santos Lino	Técnico Ecotoxicologia
Dr. Cristiano Nunes	Técnico Química
Msc. Dejair Pontes	Técnico Química
Msc. André Monnerat Lanna	Especialista Mastofauna

NOTA TÉCNICA

Ensaio de toxicidade aguda e crônica em minhocas expostas ao rejeito da barragem B1, Brumadinho, Minas Gerais.

Fabio Veríssimo Correia – UNIRIO ¹

Cláudio E. Taveira Parente – UFRJ ²

Olaf Malm - UFRJ ²

Virgílio José Martins Ferreira Filho – UFRJ ³

Enrico M. Saggioro – FIOCRUZ ⁴

1 INTRODUÇÃO

Em 25 de janeiro de 2019 ocorreu o rompimento da barragem B1 da Mina Córrego do Feijão, sob propriedade da Vale S/A, que armazenava cerca de 12 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração. Além das perdas humanas, um passivo ambiental com risco potencial de contaminação espalhou-se por cerca de 300 hectares de terras da sub-bacia do Ferro-Carvão antes de chegar no rio Paropeba, a cerca de 4 km a montante da cidade de Brumadinho/MG.

Os ensaios toxicológicos utilizando organismos-modelo (com protocolos validados internacionalmente) são importantes para a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos sobre organismos expostos a contaminantes ou a matrizes complexas, como é o caso do rejeito espalhado pelo rompimento da barragem B1 (Ma et al., 2002; Pivato et al., 2017). Essa linha de pesquisa é importante para a identificação de espécies criticamente impactadas e para predições dos efeitos de longo prazo sobre populações e funções ecossistêmicas.

Entre os organismos do solo, as minhocas da espécie *Eisenia andrei* são facilmente mantidas em condições de laboratório, sendo consideradas como organismos adequados para testes toxicológicos em solos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1984). Em um contexto ambiental, as minhocas são organismos indicadores da qualidade do solo, pois desempenham um papel importante na mineralização da matéria orgânica e na manutenção da porosidade e da estrutura do solo (Blouin et al., 2013; Lavelle et al., 2006).

A presente Nota Técnica visa apresentar os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com minhocas (*Eisenia andrei*) realizados no período entre agosto 2019 e março 2020, com amostras de rejeito da barragem B1 (município de Brumadinho, estado de Minas Gerais),

¹ Departamento de Ciências Naturais, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

² Laboratório de Radioisótopos, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

³ SAGE- Núcleo Rogério Vale de Produção Sustentável -COPPE - UFRJ.

⁴ Escola Nacional da Saúde Pública (ENSP), Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

coletadas por pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em colaboração com a empresa Vale S/A.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um total de quatro subamostras de rejeito foram coletadas nos pontos indicados na **Figura 1**. Posteriormente as quatro amostras foram homogeneizadas para compor uma amostra composta para a realização dos bioensaios.

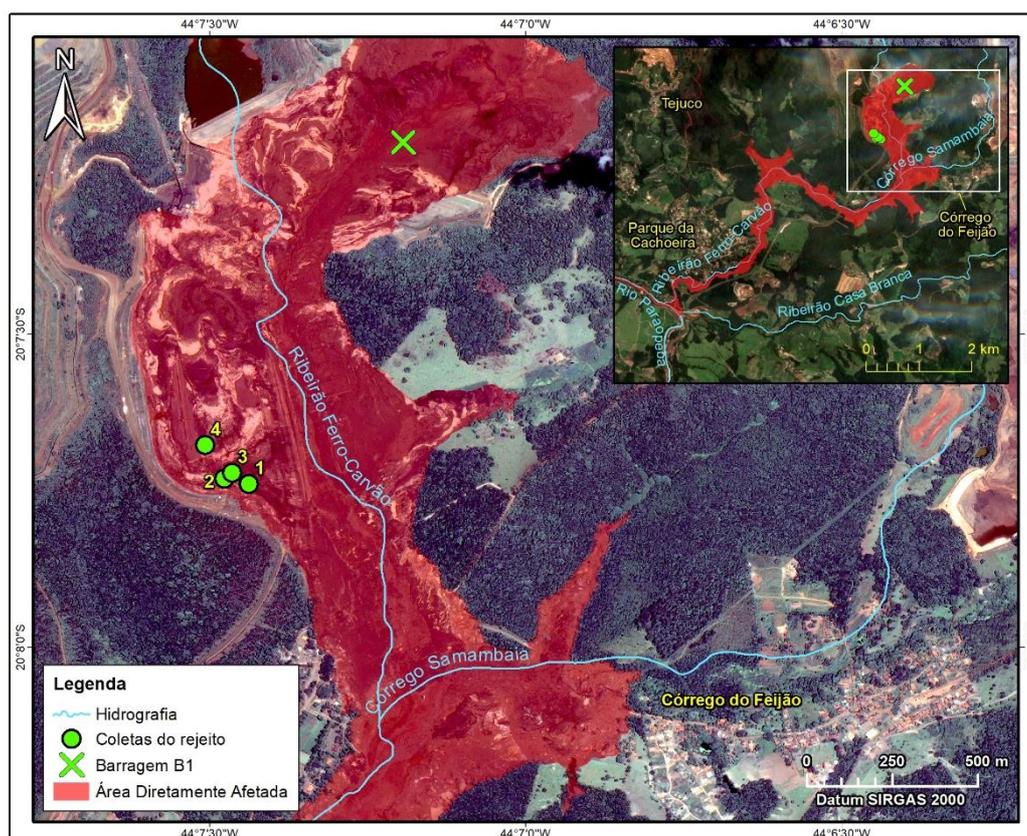


Figura 1. Pontos de coleta das subamostras de rejeito na área afetada pelo rompimento da barragem B1, Brumadinho, Minas Gerais.

As amostras de solo superficial (controle) e de rejeito da barragem B1 foram coletadas nos dias 12 e 13 de junho de 2019 por uma equipe de pesquisadores do Núcleo Rogério Valle de Produção Sustentável (SAGE-COPPE-UFRJ). A amostra de solo (Horizonte A) foi coletada em uma área de mata preservada (latitude: -19,894429; longitude: -44,403443) no município de Florestal, Minas Gerais. Os teores de umidade do solo foram avaliados previamente⁵ e mantidos entre 50 e 70%, umidade considerada ótima para a atividade biológica.

Os organismos utilizados foram minhocas da espécie *Eisenia andrei* cultivadas no setor de Ecotoxicologia do Laboratório do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia

⁵ Determinação da capacidade de campo do solo: máxima quantidade de água que o solo pode reter sem causar danos ao sistema.

Humana (CESTEH) da Escola Nacional da Saúde Pública (ENSP), FIOCRUZ a uma temperatura média de 25 °C, com esterco bovino como fonte de matéria orgânica. Apenas minhocas adultas foram selecionadas para os ensaios, com aproximadamente dois meses de idade, peso entre 300 e 600 mg e clitelo⁶ bem desenvolvido. Previamente aos ensaios os organismos foram aclimatados por 24 h a 20 ± 2 °C (ASTM, 2012).

2.1 Ensaio agudo: biomassa e letalidade

A avaliação de efeitos agudos foi realizada de acordo com protocolo pela *American Society for Testing and Materials* - ASTM (2012). Com o objetivo de estimar a concentração letal média em 50% dos organismos expostos (CL₅₀) foram utilizadas as concentrações de 12,5; 25; 50; 75 e 100% (m/m) de rejeito, comparados a um grupo controle, utilizando apenas o solo natural. A exposição dos organismos ocorreu em béqueres de 400 mL contendo a mistura de solo e rejeito nas proporções supracitadas, totalizando uma massa de 200 g por replicata.

Cada grupo de exposição foi composto por 3 replicatas, inclusive do grupo controle, os quais foram cobertos com tecido microperfurado para permitir a oxigenação e evitar a saída dos organismos. Cada replicata recebeu 10 minhocas. O tempo de exposição foi de 14 dias com abertura semanal (7 e 14 dias) para avaliação de perda ou ganho de biomassa e letalidade para a estimativa da CL₅₀.

As condições experimentais foram mantidas em controle de temperatura (20 ± 2 °C), luminosidade (400 lux) e fotoperíodo (12 h). Além disso, os organismos receberam semanalmente correções de umidade e esterco bovino para a alimentação das minhocas.

2.2 Teste de fuga (comportamental)

A avaliação comportamental foi realizada por meio do teste de fuga estabelecido pela *International Organization for Standardization* (ISO, 2008). O método consistiu na exposição das minhocas a duas seções de solo (200 g cada porção) em um recipiente de 2 L (12,0 x 13,4 x 18,0 cm), a fim de determinar o efeito de fuga, e estimar a CE₅₀, isto é, a concentração capaz de gerar efeito (fuga) em 50% da população exposta. Para este ensaio, foram utilizadas as concentrações de 12,5; 18,5; 25; 37,5; 50; 62,5; 75 e 100% (m/m) de rejeito, comparados a um grupo controle. Cada concentração de exposição foi composta por 3 replicatas. Cada recipiente foi dividido em duas seções. Uma das seções foi composta de solo natural e a outra, composta com as diferentes proporções de solo + rejeito. No grupo controle, ambas as seções foram compostas apenas por solo natural. Após o preparo, as divisórias foram retiradas e 10 organismos foram depositados no espaço central de cada recipiente plástico. Os recipientes foram fechados com tecido microperfurado para favorecer a oxigenação e evitar a fuga dos organismos. As condições experimentais foram mantidas em controle de temperatura (20 ± 2 °C), luminosidade (400 lux) e fotoperíodo (12 h).

⁶ Clitelo: estrutura reprodutiva dos anelídeos evidencia uma protuberância próxima a parte posterior do corpo.

Após 48 horas de exposição, os organismos presentes em cada seção foram contabilizados. Na **Figura 2** é apresentado o princípio básico do teste de fuga.



Figura 2. Esquema geral do experimento de fuga (comportamental).

A resposta de fuga (RF) foi calculada através da Equação 1 (ISO, 2008). Uma RF entre 0 e 20% representa atração ou ausência de fuga, entre 20 e 80% considera-se que houve comportamento de fuga e acima de 80% perda de habitat.

$$RF = \left(\frac{C-T}{10} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, RF = resposta de fuga; C = total de organismos no controle; T = total de organismos no solo com rejeito; e 10 = total de organismos por replicata.

2.3 Ensaio crônico: avaliação da biomassa e da reprodução

A avaliação de efeito crônico em solo natural foi realizada de acordo com o protocolo descrito pela ASTM (2012). O ensaio crônico teve como objetivo avaliar os efeitos sobre a biomassa e a reprodução dos organismos expostos a diferentes proporções do rejeito com o solo controle: 3,12; 6,25; 12,5 e 25% (m/m), e um grupo controle (apenas solo). A exposição dos organismos ocorreu em béqueres de 400 mL contendo a mistura de solo e rejeito nas proporções supracitadas, totalizando uma massa de 200 g por replicata. Os meios de exposição (solo + rejeito) foram umedecidos de acordo com a capacidade de campo do solo calculada. Cada grupo de exposição foi composto por 4 replicatas, assim como dos grupos controle, os quais foram cobertos com tecido microperfurado para permitir a oxigenação e evitar a saída dos organismos. Cada replicata recebeu 10 minhocas. O tempo de exposição foi de 60 dias (8 semanas) com abertura semanal para avaliação de possíveis alterações na biomassa. Já a avaliação das alterações na reprodução dos organismos foi monitorada, também de forma semanal, porém iniciada após 30 dias de experimento. As condições experimentais foram mantidas em controle de temperatura (20 ± 2 °C), luminosidade (400 lux) e fotoperíodo (12 h).

Além disso, semanalmente, foram realizadas correções de umidade e adição de esterco bovino para a alimentação das minhocas.

2.4 Análise estatística

A estimativa da CL_{50} foi determinada pelo teste de Spearman-Kärber. Para o teste de fuga, os resultados foram analisados pelo teste Exato de Fisher. Os resultados obtidos com os testes agudo e crônico em solo passaram pela avaliação de normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk e foram comparadas posteriormente, com as amostras controles, através do teste análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) seguido do post hoc Dunnett test, quando a distribuição se caracterizou normal, e o teste de Kruskal-Wallis seguido do post hoc Dunn's test, quando a distribuição se caracterizou não normal. Foi utilizado intervalo de confiança de 95 % para todas as análises.

3 RESULTADOS

3.1 Ensaio agudo: biomassa e letalidade

Durante o ensaio agudo em solo, foi observada apenas uma morte na concentração de 25%, a qual foi atribuída ao acaso. Portanto, não foi observado efeito agudo de letalidade ao longo dos 14 dias de exposição, não sendo possível estimar a CL_{50} para a exposição ao rejeito. Em relação à variação na biomassa, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) aos 7 e 14 dias de exposição em relação ao controle.

3.2 Teste de fuga (comportamental)

Não foi observado efeito de fuga das seções com adição do rejeito nas proporções de 12,5 e 25%. Contudo, foi observada a fuga com perda de habitat (fuga > 80 %) dos organismos a partir da adição de 37,5% de rejeito. A partir do resultado do teste de fuga, foi estimada uma CE_{50} de $27,2 \pm 2,83$ %, a qual foi utilizada como critério de definição das concentrações do ensaio crônico em solo.

3.3 Ensaio crônico: biomassa e reprodução

Em relação à biomassa, não foram observadas variações estatisticamente significativa ($p > 0,05$) que indicassem efeitos negativos da exposição ao rejeito nas proporções testadas. Por outro lado, foi observado aumento de biomassa verificado apenas no 42º dia com adição de 25% do rejeito. No que tange à reprodução, não foram observadas diferenças estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos de exposição e seus respectivos grupos controle. No entanto, os resultados indicaram uma tendência na redução do número de indivíduos juvenis em relação ao número de casulos nas proporções de 3,1; 12,5 e 25% de rejeito (**Figura 3**). A baixa presença de indivíduos juvenis em relação a quantidade de casulos indica a possível produção de casulos inviáveis ou a ocorrência de condições ambientais inadequadas à eclosão e/ou sobrevivência dos indivíduos juvenis.

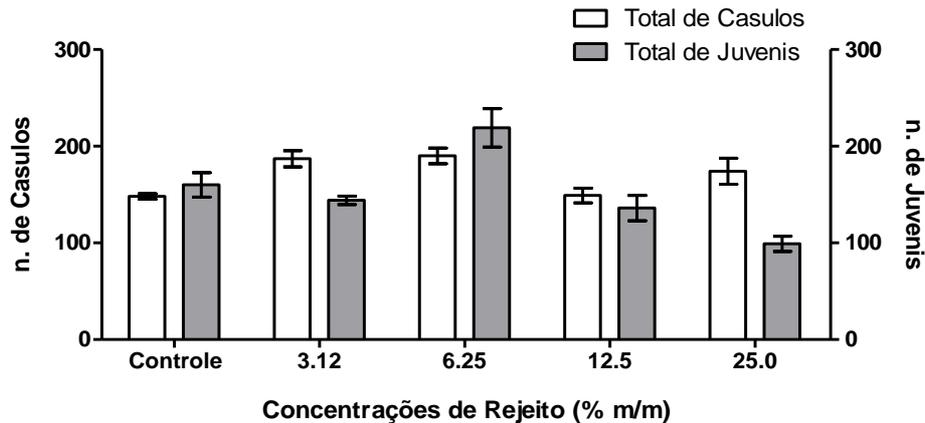


Figura 3. Número total de casulos (branco) e organismos juvenis (cinza) contabilizados ao final do ensaio crônico em solo com adição do rejeito nas proporções de 3,12; 6,25; 12,5 e 25% (m/m) e um grupo controle. A barra de erros em cada coluna representa o desvio padrão das amostras. ANOVA: $p_{\text{casulos}} = 0,1853$; $p_{\text{juvenis}} = 0,1268$.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente não foi observada toxicidade aguda, letalidade, nos organismos expostos a 100% do rejeito ao longo dos 14 dias de experimento. Além disso, não foram observados efeitos negativos sobre a biomassa das minhocas nos ensaios agudo e crônico. Contudo, foi observada alteração comportamental, com efeito de fuga de 80% dos organismos nas seções com adição de 37,5% do rejeito e uma estimativa de efeito (fuga) em 50% dos organismos com a adição de 27,2% do rejeito.

Embora os efeitos sobre a reprodução não tenham sido estatisticamente significativos, foi observada uma tendência a efeitos negativos principalmente a partir da adição de 12,5% do rejeito. Diante dos resultados, é fundamental avançar na investigação através da avaliação de outros indicadores toxicológicos e grupos taxonômicos. Apesar de conclusivo, destacamos a possível heterogeneidade do rejeito e a necessária cautela quanto à extrapolação dos resultados.

5 REFERÊNCIAS

ASTM (2012). American Society for Testing and Materials E1676-12, Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus*, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.

ISO (2008). INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 17512-1: Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Washington, 2008.

ISO (2012a). INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 11268-1: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part. 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. Washington, 2012.

ISO (2012b). INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 11268-2: Soil quality - Effects of Pollutants on Earthworms - Part 2: Determination of Effects on Reproduction of *Eisenia fetida/Eisenia andrei*. Washington, 2012.

Ma, Y.; Dickinson, N.; Wong, M. (2002). Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biol Fertil Soils* 36, 79–86. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0506-0>

OECD (1984). ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test no 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. Washington, DC.: OECD Publishing.

Pivato, A.; Lavagnolo, M.C.; Manachini, B.; Vanin, S.; Raga, R.; Beggio, G. (2017). Ecological risk assessment of agricultural soils for the definition of soil screening values: A comparison between substance-based and matrix-based approaches. *Heliyon*, 3(4), e00284.

Pramer, D.; Schmidt, E.L. (1964). Experimental soil microbiology: By David Pramer [and] E.L. Schmidt. Minneapolis: Burgess Pub. Co.