

# Avaliação do impacto do lítio no evitamento da *Eisenia fetida*: efeito da concentração e do tipo de solo

## Evaluation of the impact of lithium on *Eisenia fetida*: concentration and soil type effect

Lídia Oliveira<sup>1</sup>, Rupesh Kumar Singh<sup>1,2</sup>, Abhishek Singh<sup>3</sup>, Karen Ghazaryan<sup>3</sup>, Paula Rodrigues<sup>1</sup> & João Ricardo Sousa<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>2</sup> Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, Vila Real, Portugal

<sup>3</sup> Yerevan State University, Yerevan, Armenia

(\*E-mail: jricardo@utad.pt)

<https://doi.org/10.19084/rca.38549>

Recebido/received: 2024.08.31

Aceite/accepted: 2024.10.25

### RESUMO

A exploração de lítio (Li) no solo tem intensificado a diminuição da respetiva qualidade. Este estudo avaliou o efeito do Li no solo, com base no comportamento da *Eisenia fetida* para diferentes concentrações (0, 100, 200, 400 e 800 mg kg<sup>-1</sup>), num solo artificial (SA) e natural (SN). Cerca de 15 recipientes-teste, relativos a 5 tratamentos e 3 repetições, foram preparados para cada solo, em que 10 minhocas adultas foram adicionadas e expostas por 48-h. A percentagem de evitamento (%E) para cada concentração e a dose de evitamento ( $AD_{50}$ ) para cada solo foram determinadas. Um comportamento de evitamento foi observado nos tratamentos com Li para ambos os solos, com um aumento da %E com a concentração de Li, variando entre 27% e 93%, para SA, e 13% a 69%, para SN. Os valores de pH e CE explicaram a %E observada, com respetivos valores de  $r^2$  de 0,981 e 0,634, para o SA, e 0,944 e 0,736, para o SN. Os valores de  $AD_{50}$  do SA (172 mg kg<sup>-1</sup>) foram inferiores ao SN (404 mg kg<sup>-1</sup>), com as respetivas características a explicar as diferenças. Os resultados destacam os efeitos adversos do Li nos anélidos do solo, com estes a revelarem-se dependentes da concentração de Li e do tipo de solo.

**Palavras-chave:** lítio, minhocas, *Eisenia fetida*, evitamento, poluição.

### ABSTRACT

The increasing exploitation of lithium (Li) in soil has intensified pollution, compromising the quality of this natural resource. This study evaluated the effect of Li on soil by examining the avoidance behaviour of *Eisenia fetida* at different Li concentrations (0, 100, 200, 400, and 800 mg kg<sup>-1</sup>) in artificial (AS) and natural (NS) soils. A total of 15 test containers, corresponding to 5 treatments with 3 replicates each, were prepared for each soil type, where 10 adult earthworms were introduced and exposed for 48 hours. At the end, the avoidance percentage (%A), for each concentration, and the avoidance dose ( $AD_{50}$ ), for each soil type, were determined. An avoidance behaviour was observed in the treatments with Li for both soils, with %A increasing with Li concentration, ranging from 27% to 93%, in AS, and from 13% to 69%, in NS. The pH and EC values explained the observed %A, with  $r^2$  values of 0,981 and 0,634, for AS, and 0,944 and 0,736, for NS. The  $AD_{50}$  values for AS (172 mg kg<sup>-1</sup>) were lower than those for NS (404 mg kg<sup>-1</sup>), with the differences attributed to the respective soil characteristics. The results highlight the adverse effects of Li on soil organisms, with effects depending on both Li concentration and soil type.

**Keywords:** lithium, earthworm, *Eisenia fetida*, avoidance, pollution.

## INTRODUÇÃO

A problemática do lítio no solo, relacionada com a respetiva extração, está associada a práticas de exploração intensiva que potenciam fenómenos de degradação do solo, erosão, perda de biodiversidade e, conseqüentemente, impactos negativos nos ecossistemas (Robinson *et al.*, 2018). O processo de produção e deposição inadequada de resíduos da respetiva exploração ou resultantes da deposição de baterias de lítio (Gao *et al.*, 2019) podem, igualmente, contribuir para a contaminação do solo numa escala elevada. Como contaminante emergente, os fenómenos de poluição resultantes do aumento da concentração de Li no solo estão a suscitar cada vez mais atenção na avaliação dos respetivos efeitos ambientais ao nível do solo, plantas e animais (Bolan *et al.*, 2021). Neste contexto, a utilização de testes ecotoxicológicos constitui uma ferramenta importante na avaliação do efeito da presença de compostos no ecossistema e como podem afetar recursos como o solo, permitindo obter informação sobre a respetiva qualidade. Entre os vários bioindicadores disponíveis, as minhocas são dos mais usados neste tipo de testes, por responderem a diferentes tipos de uso e gestão do solo (Lavelle *et al.*, 2006), apresentando uma elevada sensibilidade a situações de perturbação e contaminação do habitat (Brown & Domínguez, 2010). Neste contexto, *Eisenia fetida* é considerada o modelo de referência, de acordo com as normas definidas pela Organização de Economia e Cooperação para o Desenvolvimento (OCDE), devido à sua elevada sensibilidade e facilidade de adaptação em laboratório (OCDE, 2016). Assim, considerando os aspetos relativos aos potenciais efeitos do lítio na capacidade do solo fornecer serviços ao ecossistema, o trabalho agora apresentado tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de lítio (Li)

no comportamento da espécie *E. fetida*, de acordo com as normas aplicadas para este tipo de estudos (ISO 17512-1) (ISO, 2005) e a avaliação do potencial efeito do tipo de solo no comportamento do bioindicador usado, com base na utilização de uma segunda matriz edáfica, de origem natural.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Matriz edáfica

Como matriz edáfica de suporte, definida como solo artificial (SA), recomendado pelas normas para este tipo de estudos (ISO, 2005), foi usada uma mistura de 70% de areia, 20% de caulino e 10% de turfa (ISO, 2005) (peso seco). Um solo natural (SN), classificado como um *cambissolo districo* (IUSS Working Group WRB, 2015), foi também selecionado como alternativa ao SA. Uma toma composta do SA foi selecionada para efeitos de caracterização físico-química inicial. Igual procedimento foi seguido para o SN, após preparação prévia, através de secagem a 40-60 °C, durante um período de 24 a 48-h, até teor de humidade constante, e crivagem a 2 mm, com seleção da fração terra fina. Alguns dos principais parâmetros físico-químicos para as respetivas matrizes edáficas estudadas são apresentados no Quadro 1. Para efeitos de normalização procedeu-se à correção da reação do solo em ambas as matrizes, para os valores de pH KCl 1 M (1:5) normativos definidos (6,1±0,5) (ISO, 2005), através da adição prévia de CaCO<sub>3</sub> (pa).

Igual procedimento foi seguido para os teores de humidade no solo que, após avaliação da capacidade máxima de retenção de água (CMRA), foram corrigidos para 60% do respetivo valor.

**Quadro 1** - Propriedades físico-químicas das matrizes edáficas usadas no ensaio experimental, solo artificial (SA) e solo natural (SN)

Solo	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl 1M <sup>#</sup>	CE (dS m <sup>-1</sup> )	MO (g kg <sup>-1</sup> )	N <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	CTC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	argila (g kg <sup>-1</sup> )
SA	5,7	6,1	0,15	57,9	0,2	6,1	102,0
SN	5,4	6,0	0,11	56,4	9,6	9,6	106,0

# após correção com CaCO<sub>3</sub>; CE (condutividade elétrica, 1:5 em água); CTC (capacidade de troca catiónica)

## Ensaio experimental

Para estudo do efeito da concentração de lítio foi considerado a realização de um teste de evitamento (ISO, 2005), sendo usada a *E. fetida* como modelo biológico. Em termos de delineamento para cada matriz edáfica estudada, SA e SN, foram considerados 5 tratamentos, relativos às concentrações de lítio de 0, 100, 200, 400 e 800 mg kg<sup>-1</sup>, na forma de Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, com três repetições por tratamento, num total de 30 recipientes-teste (Figura 1). Para efeitos de validação do ensaio (ISO, 2005) foi também realizado um teste de controlo duplo para cada solo estudado, em que no tratamento controlo as respectivas secções estudadas sem Li (-) são comparadas entre si. Cada recipiente-teste foi dividido em duas secções, relativas à secção-teste (+), com adição de lítio equivalente às concentrações estudadas (Li100, Li200, Li400 e Li800), e à secção-controlo (-), sem adição de lítio (Li0), que foram preenchidas com 500 g (peso seco) de SA ou SN. Após remoção da placa divisória, 10 minhocas adultas de *E. fetida*, previamente aclimatadas em condições dos respectivos solos estudados (SA e SN), com clitelo desenvolvido e biomassa fresca entre 300 a 600 mg, foram colocadas na interface das secções comparadas em cada recipiente-teste (Figura 1).

Os recipientes foram fechados, com tampas igualmente perfuradas, e colocados em condições controladas de temperatura (20±2 °C) e fotoperíodo (8-h de escuro e 16-h de luz), durante 48-h, durante o

qual não se procedeu à alimentação das minhocas. Após o período de exposição, procedeu-se à contagem de indivíduos em cada secção, solo-controlo (-) e solo-teste (+), para cada tratamento e repetição, para efeitos de determinação da percentagem de evitamento (%E), com base na equação descrita por Busch *et al.* (2012) ( $% E = [(n_c - n_t) / N] * 100$ ), em que  $n_c$ ,  $n_t$  e  $N$  são relativos ao número de minhocas no solo-controlo, solo-teste e total de minhocas por recipiente-teste, respetivamente, em que resultados positivos (+) indiciam evitamento e negativos (-) uma não reposta ou atração (ISO, 2005). Para as secções comparadas procedeu-se, também, à determinação de parâmetros físico-químicos dinâmicos do solo, como o pH e condutividade elétrica (CE), para melhor compreender o efeito da presença e concentração de Li no comportamento das minhocas em cada matriz edáfica. Os dados obtidos foram sujeitos a uma análise de normalidade e homogeneidade pelos testes de *Shapiro-Wilk* e *Barlett*, respetivamente, seguido de uma análise de variância (ANOVA) e um teste de LSD (*Least Significant Difference*), para um nível de probabilidade de  $\alpha=5\%$ . Os valores de  $AD_{50}$  (*avoidance dose*) foram calculados pelo método *Probit* (Sakuma, 1998), em software *Excel* (Windows® 10).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para efeitos de validação foi possível verificar que, no teste duplo controlo, para as diferentes matrizes

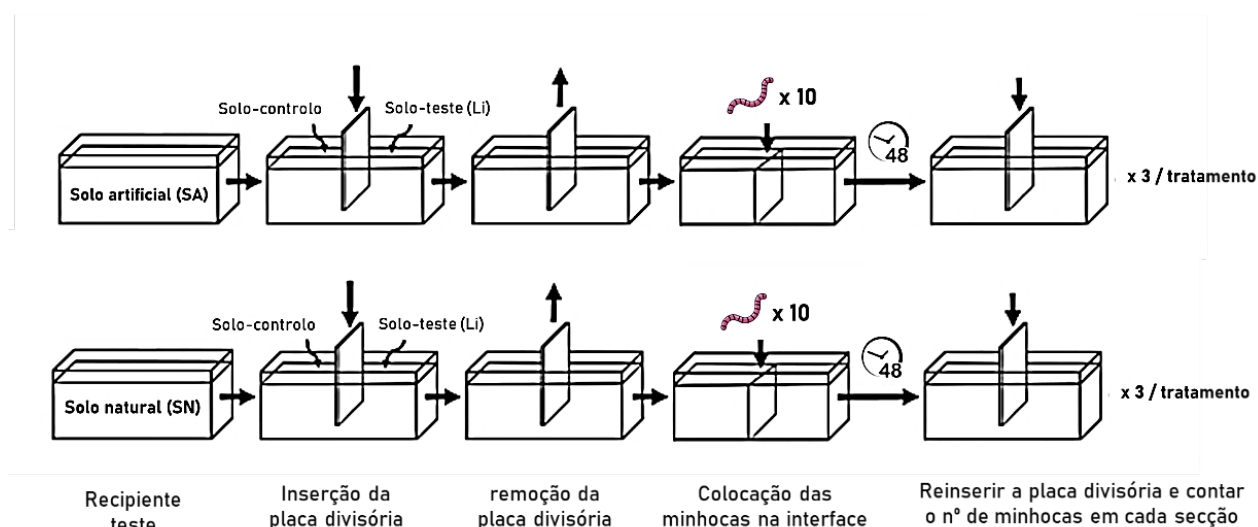
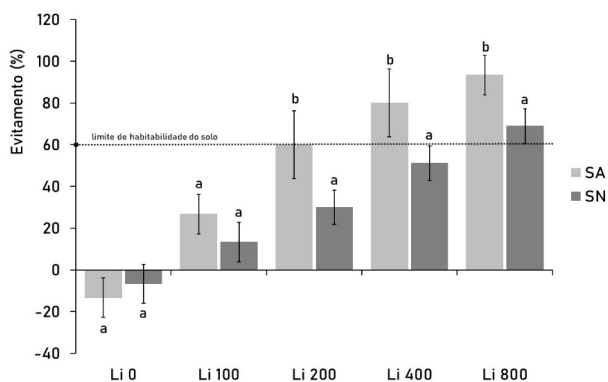


Figura 1 - Esquema do procedimento aplicado no ensaio de evitamento com *E. fetida*.

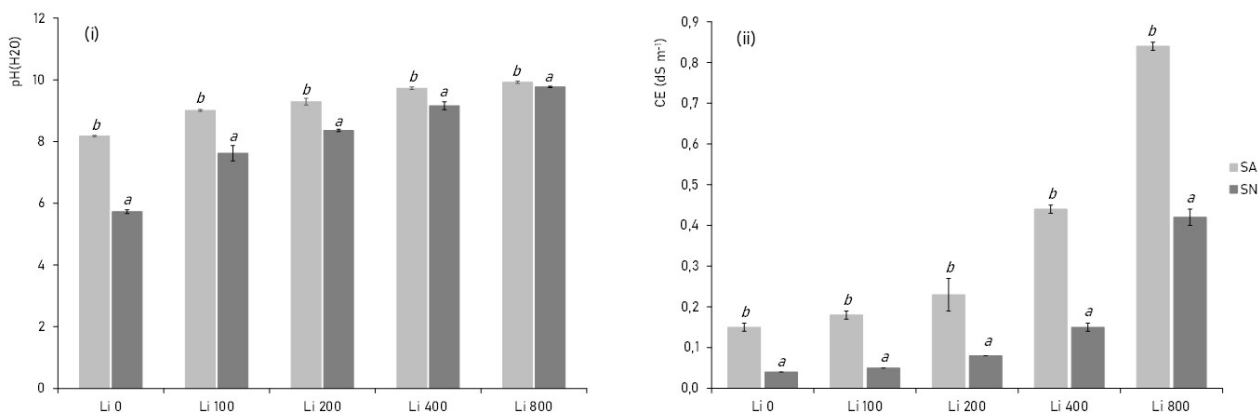


**Figura 2** - Percentagem de evitamento/preferência (%) no teste de comportamento com *E. fetida* no solo artificial (SA) e natural (SN), para os tratamentos estudados, sem (Li 0) e com lítio (Li 100, Li 200, Li 400 e Li 800) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

edáficas testadas, SA e SN, as minhocas não demonstraram preferência significativa ( $p > 0,05$ ), revelando uma distribuição entre as respectivas secções comparadas enquadrada nos valores normativos (40 a 60%) para este tratamento (Li0) (ISO, 2005) e ausência de mortalidade durante o período de exposição. Os resultados mostraram um efeito significativo ( $p < 0,001$ ) do tipo de solo e concentração de lítio no comportamento das minhocas em termos de percentagem de evitamento (Figura 2). Em termos da percentagem de evitamento (%E), os resultados observados revelaram uma tendência similar em ambas matrizes edáficas estudadas, SA e SN, com as minhocas a demonstrar uma não resposta ou preferência para condições de ausência de lítio (Li 0), com valores de (-)13,3 e (-)6,7%,

respetivamente. Por sua vez, na presença de lítio, as minhocas revelaram um comportamento de evitamento, aumentando com a respetiva concentração no solo, com valores entre os 27-93%, para o SA, e os 13,3-68,9%, para o SN. A perda de habitabilidade do solo devido à presença de Li, relativa a 60% do evitamento (Loureiro *et al.*, 2005), foi observada para concentrações de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  no SA e valores superiores a  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  no SN (Figura 2). Xu *et al.* (2023), usando como *endpoint* a atividade de enzimas antioxidantes na *E. fetida*, observaram um aumento da respetiva atividade com a concentração lítio no solo, podendo o *stress* oxidativo ser um dos fatores responsáveis pelo aumento do evitamento observado.

Efeitos indiretos, relacionados com alterações nas propriedades físico-químicas do solo, podem também induzir fatores de *stress* (Pandit & Maheshwari, 2012) e reduzir a habitabilidade do solo, influenciando o respetivo comportamento. As propriedades alcalinizantes do sal utilizado ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) resultaram num aumento nos valores de pH em água e CE, ambos dependentes da concentração de lítio nas duas matrizes edáficas estudadas (Figura 3), explicando o comportamento de evitamento observado (Figura 2), com coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de 0,981 e 0,634 para o SA, e 0,944 e 0,736 para o SN, respetivamente. Estes resultados são corroborados por Hayyat *et al.* (2021) que, em solos de natureza salina, com concentrações de lítio até  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ , registaram aumentos significativos dos valores de pH e CE com a dose de lítio aplicada que, por sua vez, promoveram um aumento da



**Figura 3** - Valores de: (i) pH em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e (ii) condutividade elétrica (CE) ( $\text{dS m}^{-1}$ ), para o solo artificial (SA) e natural (SN), nos tratamentos sem (Li 0) e com lítio (Li 100, Li 200, Li 400 e Li 800) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), no final do período de exposição (48-h) no ensaio de comportamento com *E. fetida*.

respetiva letalidade (Inokuchi *et al.*, 2015). Os resultados deste estudo revelaram que os parâmetros estudados influenciaram a concentração para a qual 50% dos indivíduos apresenta uma resposta positiva (+) de evitamento ou fuga ( $AD_{50}$ ), com valores de 172 mg kg<sup>-1</sup> e 404 mg kg<sup>-1</sup> para o SA e SN, respectivamente. As diferenças estão relacionadas com as características físico-químicas das respectivas matrizes (Quadro 1). Os menores teores de argila do SA, associados a minerais do tipo caulinite, que possuem menor superfície específica (caulinite) e capacidade de troca catiônica (CTC), resultam numa menor retenção de lítio, aumentando a biodisponibilidade e o potencial de toxicidade do lítio nesta matriz.

O menor poder tampão do SA contribui para uma maior biodisponibilidade de lítio e maiores aumentos de parâmetros como o pH e CE (Figura 3), traduzindo o maior potencial de toxicidade do lítio

presente nesta matriz, com um valor de  $AD_{50}$  inferior ao registado para o SN.

## CONCLUSÕES

A presença de lítio no solo induz um comportamento de evitamento de *E. fetida*, variando de acordo com a concentração de Li e o tipo de solo. O potencial de risco é maior no SA do que no SN, com valores de  $AD_{50}$  de 172 e 404 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Parte dos efeitos estão relacionados com a natureza do sal de lítio usado (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que promove um aumento do pH e da CE do solo, acentuando o comportamento de evitamento. Fatores edáficos como matéria orgânica e tipo de argila presentes no solo podem mitigar esses efeitos, atuando como vetores tamponizantes, contribuindo para uma maior habitabilidade do solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolan, N., Hoang, S.A.; Tanveer, M.; Wang, L.; Bolan, S.; Sooriyakumar, P.; Robinson, B.; Wijesekara, H.; Wijesooriya, M.; Keerthanam, S.; Vithanage, M.; Markert, B.; Franzle, S.; Wunschmann, S.; Sarkar, B.; Vinu, A.; Kirkham, M.B.; Siddique, K.H.M. & Rinkleber, J. (2021) - From mine to mind and mobile-lithium contamination and its risk management. *Environmental Pollution*, vol. 290, art. 118067. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118067>
- Bronw, G.G. and Dominguez, J. (2010) - Uso das minhocas como bioindicadores ambientais: princípios e práticas. III Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas. (ELAETA03). *Acta Zoologica Mexicana*, vol. 20, p. 1-18.
- Busch, D.; Kammann, C.; Grünhage, L. & Müller, C. (2012) - Simple biotoxicity tests for evaluation of carbonaceous soil additives: Establishment and reproducibility of four test procedures. *Journal of Environmental Quality*, vol. 41, n. 4, p. 1023-1032. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0122>.
- Gao, G.; He, X. & Lou, X. (2019) - A Citric Acid/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> System for the Efficient 393 Leaching of Valuable Metals from Spent Lithium-Ion Batteries. *JOM*, vol. 71, p. 3673-3681. <https://doi.org/10.1007/s11837-019-03629-y>.
- Hayyat, M.U.; Nawaz, R.; Siddiq, Z.; Shakoor, M.B.; Mushtaq, M.; Ahmad, S.R.; Ali, S.; Hussain, A.; Irshad, M.A.; Alsahli, A.A., & Alyemeni, M.N. (2021) - Investigation of Lithium application and effect of organic matter on soil health. *Sustainability*, vol. 13, art. 1705. <https://doi.org/10.3390/su13041705>.
- Inokuchi, A.; Yamamoto, R.; Morita, F.; Takumi, S.; Matsusaki, H.; Ishibashi, H.; Tominaga, N. & Arizono, K. (2015) - Effects of lithium on growth, maturation, reproduction and gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Applied Toxicology*, vol. 35, n. 9, p. 999-1006. <https://doi.org/10.1002/jat.3058>
- ISO (2005) - *Soil quality. Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part I: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. ISO 17512-1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- IUSS Working Group WRB (2015) - *World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015*. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. Rome. ISBN 978-92-5-108369-7.
- Lavelle, P.; Decaëns, T.; Aubert, M.; Barot, S.; Blouin, M.; Bureau, F.; Margerie, P.; Mora, P. & Rossi, J.P. (2006) - Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, vol. 42, p. S3-S15. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.10.002>.
- Loureiro, S.; Soares, A.M.V.M. & Nogueira, A.J.A. (2005) - Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, vol. 138, p. 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.013>.
- OCDE (2016) - *Test No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD Publishing, Paris.
- Pandit, N.P. & Maheshwari, S.K. (2012) - Optimization of vermicomposting technique for sugarcane waste management by using *Eisenia fetida*. *International Journal of Biosciences*, vol. 2, p. 143-155.
- Robinson, B.H.; Yalamanchali, R.; Reiser, R. & Dickson, N.M. (2018) - Lithium as an emerging environmental contaminant: Mobility in the soil-plant system. *Chemosphere*, vol. 197, p. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.012>.
- Sakuma, M. (1998) - Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 33, n. 3, p. 339-347. <https://doi.org/10.1303/aez.33.339>.
- Xu, Z.; Zhang, Z. & Wang, X. (2023) - Ecotoxicological effects of soil lithium on earth-worm *Eisenia fetida*: lethality, bioaccumulation, biomarker responses, and histopathological changes. *Environmental Pollution*, vol. 330, art. 121748. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121748>.