

# Efeito de dois sais de lítio no comportamento da *Eisenia andrei* em ensaios de evitamento

## Lithium salt type effect on behaviour of *Eisenia andrei* in short-test avoidance assay

João Barroso<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.38922>

Recebido/received: 2024.08.31

Aceite/accepted: 2024.10.25

### RESUMO

Diferentes sais de lítio (Li) têm sido usados na avaliação do efeito do lítio (Li) no solo, dificultando a comparação dos resultados e conclusões sobre a contaminação emergente. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do Li, na forma de dois sais,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (CLi) e  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  (SLi), através de um teste de evitamento com *Eisenia andrei*, usando o comportamento de fuga como parâmetro de medição. Foram testadas cinco concentrações de Li (0, 100, 200, 400 e 800  $\text{mg kg}^{-1}$ ) na forma de CLi e SLi. O efeito do Li no comportamento de *E. andrei* foi avaliado com base na percentagem de evitamento (%E) e no  $AD_{50}$  para cada tipo de sal. Os resultados revelaram efeitos significativos ( $p < 0,001$ ) da presença dos dois sais de Li no comportamento da *E. andrei*. A %E variou entre 26,7% a 91,1%, para SLi, e 20% a 66,7%, para CLi. A aplicação dos sais influenciou ( $p < 0,001$ ) o pH e condutividade elétrica (CE) do solo, com o maior stress alcalinizante e osmótico a verificar-se para o CLi e SLi, respetivamente. Características ácido-base ou solubilidade em água podem explicar os valores de  $AD_{50}$  obtidos para os sais de SLi (202  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e CLi (404  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

**Palavras-chave:** carbonato de lítio, sulfato de lítio, *Eisenia andrei*, evitamento, poluição.

### ABSTRACT

Various lithium (Li) salts have been used to evaluate Li impacts on soil, difficulting the comparison of results and conclusions on emerging contamination. This study aimed to investigate the effect of Li in the form of two salts,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (CLi) and  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  (SLi), through an avoidance test with *Eisenia andrei*, using avoidance behaviour as parameter. Five Li concentrations (0, 100, 200, 400, and 800  $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the form of CLi and SLi were tested. The effect of Li on *E. andrei* behaviour was evaluated based on avoidance percentage (%A) and  $AD_{50}$  for each salt type. The results revealed significant effects ( $p < 0.001$ ) of the presence of both Li salts on the behaviour of *E. andrei*. The %A ranged from 26.7% to 91.1% for SLi and from 20% to 66.7% for CLi. The application of salts significantly influenced ( $p < 0.001$ ) soil pH and electrical conductivity (EC), with the greatest alkalizing and osmotic stress observed for CLi and SLi, respectively. Acid-base characteristics or water solubility may explain the differences found in  $AD_{50}$  values estimated for SLi (202  $\text{mg kg}^{-1}$ ) and CLi (404  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

**Keywords:** carbonate lithium, sulphate lithium, *Eisenia andrei*, avoidance, pollution.

## INTRODUÇÃO

A crescente procura por fontes de energia alternativas aos combustíveis fósseis tem impulsionado a exploração intensiva de lítio (Li), potenciando fenómenos de poluição em larga escala, levantando preocupações ambientais na proteção de recursos naturais como o solo. Neste contexto, os testes de evitamento com organismos representativos do ecossistema edáfico têm sido uma ferramenta valiosa na avaliação da toxicidade de substâncias químicas no solo (Xu *et al.*, 2023a). Estes testes permitem uma deteção rápida de contaminantes e são eficazes na avaliação de métodos de remediação ambiental, permitindo uma perceção sobre possíveis impactos nos ecossistemas terrestres e sendo um instrumento importante de suporte a uma gestão mais eficiente e sustentável do solo. Neste tipo de testes, as minhocas têm sido dos modelos biológicos mais usados devido à elevada sensibilidade a alterações das condições ambientais (OECD, 2016), sendo indicadores de possíveis impactos decorrentes da presença de compostos químicos, nomeadamente de lítio, no solo. Além disso, desempenham um papel fundamental na manutenção da capacidade do solo fornecer serviços ecossistémicos, sendo designados como “engenheiros do solo” (Ojha & Devkota, 2014). O número limitado de estudos sobre o efeito do lítio no solo, com a utilização de diversos indicadores ou parâmetros, destacam o desafio associado à variedade de sais de lítio utilizados. Os trabalhos desenvolvidos revelam uma variedade de compostos de lítio usados, cada um com distintas propriedades físico-químicas e potenciais efeitos no solo e na fauna edáfica (Bakhat *et al.*, 2020; Kuloglu *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2023b). A diversidade de sais de lítio, combinada com diferentes indicadores como comportamento de evitamento, crescimento ou marcadores bioquímicos, pode dificultar a comparação dos resultados e a obtenção de conclusões claras e consistentes sobre os efeitos do lítio no solo e na fauna edáfica. Deste modo, o trabalho agora apresentado tem como

objetivo avaliar o efeito de diferentes tipos de sais de lítio, no comportamento de evitamento da *Eisenia andrei*, de modo a obter informações relevantes para a gestão e mitigação dos potenciais impactos deste contaminante emergente no solo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Solo teste

Neste trabalho foi utilizado um solo artificial (SA), de acordo com as normas da OECD (2016) para avaliação do efeito de substâncias químicas no solo, como alternativa aos solos naturais. As normas fornecem orientações para a produção e caracterização do solo, garantindo uniformidade e facilitando a comparação de resultados. Para a respetiva elaboração dos ensaios procedeu-se à mistura de 70 % de areia, constituída por partículas de 50 a 200  $\mu\text{m}$ , 20 % de caulino, com no mínimo 30 % de argila do tipo caulinite, e 10 % de turfa seca, sem resíduos de plantas visíveis (OECD, 2016). Uma amostra composta foi recolhida após a preparação da mistura inicial para efeitos de determinação de vários parâmetros físico-químicos: classe de textura franco-arenosa, pH (KCl 1 M) de 4,7, matéria orgânica de 57,9  $\text{g kg}^{-1}$ , condutividade elétrica 0,15  $\text{dS m}^{-1}$ , N total 0,2  $\text{g kg}^{-1}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ (Egner-Riehm) 57,0  $\text{mg kg}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ (Egner-Riehm) 92,0  $\text{mg kg}^{-1}$ , capacidade de troca catiónica efetiva 6,1  $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$  e uma fração de argila equivalente a 102  $\text{g kg}^{-1}$ . Para a realização dos ensaios, procedeu-se à normalização dos valores de pH para valores finais de 6,1 (ISO, 2005) e determinação da capacidade máxima de retenção de água (CMRA).

### Sais de lítio e concentrações ensaiadas

Para o estudo do lítio foram usados dois sais diferentes, na forma de carbonato de lítio (CLi) e sulfato de lítio (SLi), adquiridos comercialmente.

**Quadro 1** - Propriedades físico-químicas dos sais de lítio usados no ensaio experimental

Sal de lítio	Formula	MM ( $\text{g mol}^{-1}$ )	densidade ( $\text{g cm}^{-3}$ )	$S_w$ ( $\text{g 100 mL}^{-1}$ )	apresentação
CLi	$\text{Li}_2\text{CO}_3$	73,89	2,11	1,29	pó
SLi	$\text{Li}_2\text{SO}_4$	109,94	2,22	2,22	cristais

MM: massa molecular; SW: solubilidade em água (25 °C).

No Quadro 1 são apresentadas algumas características físico-químicas dos respetivos compostos para efeitos da determinação da respetiva massa a aplicar ao solo, de acordo com as concentrações estudadas e massa de SA seco usado em cada secção do recipiente-teste.

As massas dos respetivos sais foram determinadas para as concentrações de lítio a testar de 100, 200, 400 e 800 mg Li kg<sup>-1</sup> de SA (peso seco). Estes tratamentos foram testados em combinações duplas com solo humedecido com água destilada (i.e. livre de qualquer substância teste). Uma combinação controlo de 0 mg Li kg<sup>-1</sup> em ambas as secções dos recipiente-teste, foi também considerado de modo a avaliar se na ausência da substância teste a distribuição dos organismos é aleatória.

### Procedimento experimental

Para o ensaio foi, em parte, seguido o procedimento descrito na norma ISO 17512-1 (ISO, 2005), com pequenas alterações. Para cada tratamento estudado foram consideradas três repetições, num total de trinta recipientes-teste de plástico transparente. Na preparação de cada recipiente-teste, procedeu-se à sua separação em duas secções, com a inserção de uma placa divisória. Na secção-controlo (-) foram colocadas 500 g de SA, sem lítio, e na secção-teste (+), igual massa de solo, misturado com solução de lítio, previamente preparada, relativa à

respetiva concentração pretendida. A placa divisória foi retirada e 10 minhocas colocadas na interface das secções em cada recipiente-teste. Este procedimento foi seguido para um total de 15 recipientes-testes utilizados para o respetivo sal de lítio estudado que, depois de colocada a respetiva tampa, igualmente perfurada, foram dispostos em condições controladas de laboratório (temperatura de 20±2 °C e 16-h luz:8-h escuro), durante um período de 48 horas de exposição, sem alimentação das minhocas (Figura 1).

Após o período de exposição, a placa divisória foi novamente introduzida e procedeu-se à contagem do número de minhocas em cada uma das secções, secção-controlo (-) e secção-teste (+), para cada uma das concentrações de lítio estudadas e respetivas repetições. Para cada tratamento foi determinada a percentagem de evitamento (%E), de acordo com a equação apresentada por Busch *et al.* (2012), (%E = [(n<sub>c</sub>-n<sub>t</sub>)/N] \*100), em que n<sub>c</sub>, n<sub>t</sub> e N são relativos ao número de minhocas no solo-controlo, solo-teste e total de minhocas por recipiente-teste, respetivamente. De acordo com os resultados obtidos, valores positivos (+) indiciam evitamento, enquanto valores negativos (-) sugerem uma não reposta ou preferência (ISO, 2005). A normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade de variâncias dos dados entre tratamentos foi analisada pelos testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respetivamente. Para análise da significância entre as secções, relativas a cada tratamento estudado foi usado o *t-Student*

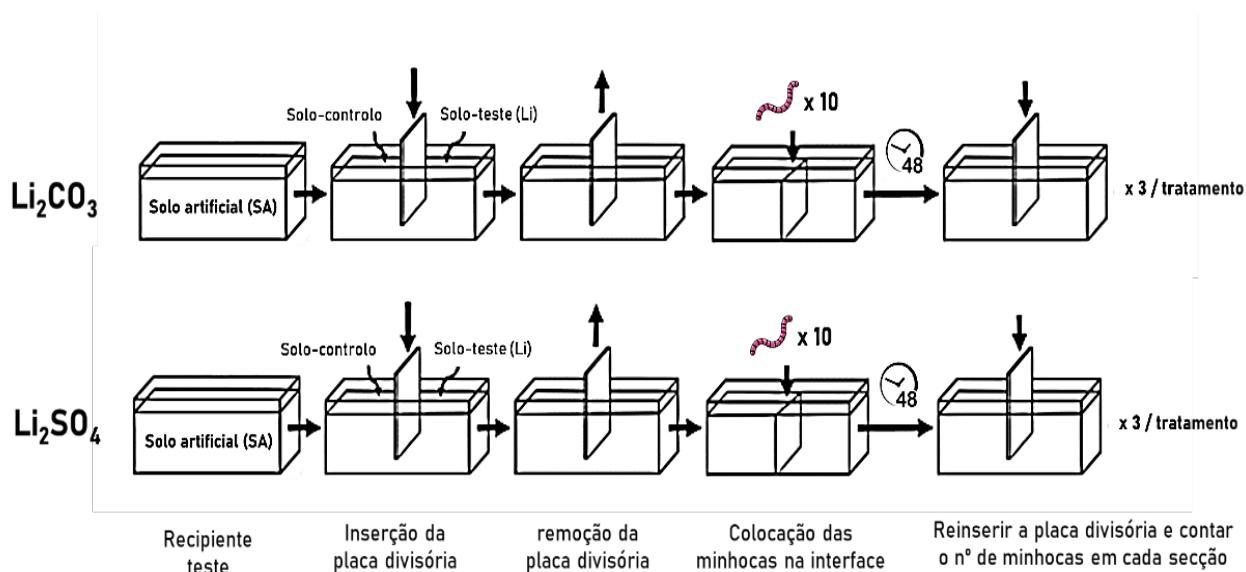


Figura 1 - Esquema do procedimento aplicado no ensaio de evitamento.

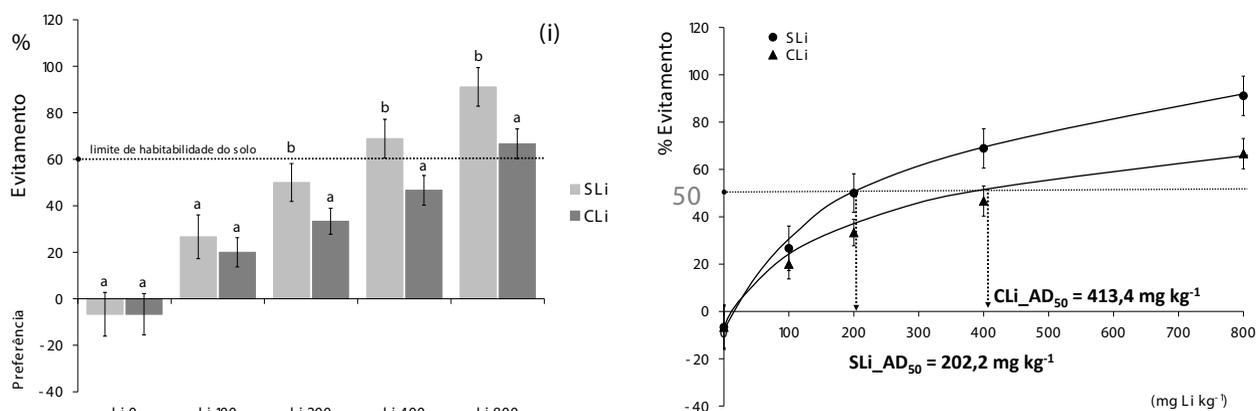
( $p < 0,05$ ). Entre tratamentos procedeu-se a uma análise de variância de uma via (ANOVA) e um teste de LSD (*Least Significant Difference*), para um nível de probabilidade de  $\alpha = 0,05$ . Os valores de  $AD_{50}$  (*avoidance dose*) foram calculados por uma regressão linear *Probit* (Sakuma, 1998), em software *Excel* (Windows® 10) e a respetiva análise entre os respetivos sais, com base no *t-Student* ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

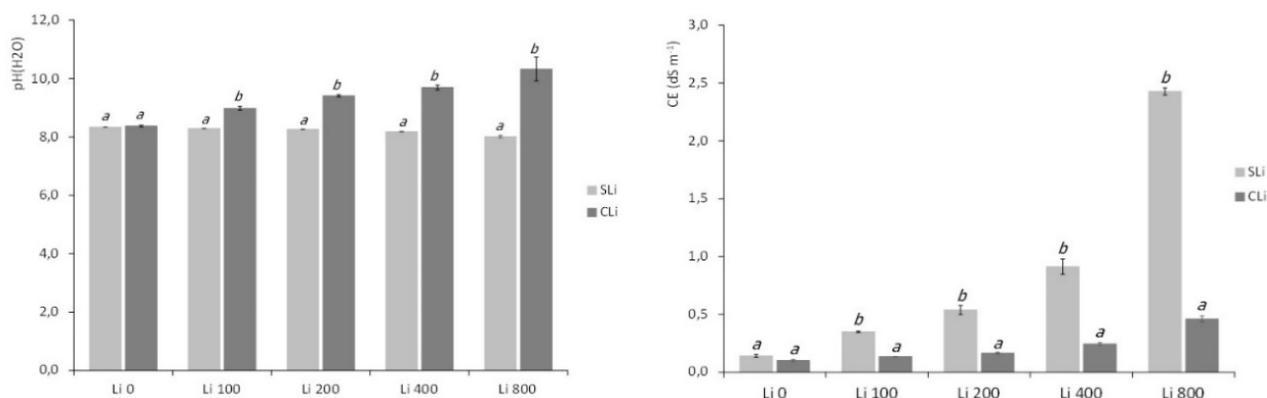
No cumprimento dos pressupostos definidos para validação dos ensaios realizados com os respetivos sais de lítio (Niemeyer *et al.*, 2019), com os resultados obtidos na combinação controlo não revelaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre o número de organismos teste encontrados em cada secção dos recipientes-teste. Estes resultados foram, ainda, reforçados pela ausência de mortalidade sendo possível concluir que a matriz de SA preparada não influencia o comportamento das minhocas. Em termos de %E, o efeito do lítio revelou uma tendência similar para ambos os tipos de sais de lítio estudados (Figura 2.i), com as minhocas a demonstrar uma preferência para solo sem presença ou adição de lítio ( $0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Li 0), com um valor médio de (-) 6,7%.

A similaridade da sensibilidade dos organismos teste aos dois sais estudados manteve-se para todas as combinações de tratamentos, com as minhocas a revelar um comportamento de evitamento tanto maior à medida que a concentração de lítio aumenta. Os valores de %E variaram (entre a combinação

da concentração mais baixa e a combinação da concentração mais alta) entre 26,7% e 91,1%, para o SLi e 20% e 66,7%, para o CLi (Figura 2.i). O aumento do *stress* oxidativo ou de lesões histológicas observadas por Bakhat *et al.* (2020) e Xu *et al.* (2023b), para um intervalo de concentrações aproximado ao usado neste estudo, podem explicar a tendência crescente de evitamento observada com a concentração de Li. O efeito da concentração revelou-se, também, dependente do tipo de sal, nomeadamente para concentrações superiores a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , a partir da qual o SLi promove valores de %E mais elevados e significativos ( $p < 0,05$ ) que o CLi (Figura 2.i). Os resultados sugerem que as propriedades dos respetivos sais (Quadro 1), poderão agir como vetores de *stress*, através da alteração de características químicas do solo, como o pH  $\text{H}_2\text{O}$  e a CE (Figura 3), promovendo o comportamento de evitamento por parte do organismo teste. A existência de diferentes tipos de aniões, como o caso do sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) gerados respetivamente com SLi e CLi, têm diferente comportamento ácido-base, podendo influenciar de forma diferenciada o pH do solo. Os valores de pH mais baixos do solo observados para o caso do SLi comparativamente ao CLi (Figura 3.i), poderão ter promovido uma maior disponibilidade do lítio, tal como reportado por Hayyat *et al.* (2021). Por sua vez, a maior solubilidade em água do SLi poderá explicar os maiores valores de condutividade elétrica (CE) ( $\text{dS m}^{-1}$ ) dos solos com solução de SLi comparativamente aos solos com solução de CLi. Este facto poderá assim explicar os maiores valores de %E observados nos solos com SLi em relação aos solos com SLi (Figura 2.i), com as diferenças entre



**Figura 2** - Resultados (i) da percentagem de evitamento/preferência (%) para as concentrações e (ii) avoidance dose ( $AD_{50}$ ) para os sais de lítio estudados de SLi e CLi.



**Figura 3** - Valores de: (i) pH em água (H<sub>2</sub>O) e (ii) condutividade elétrica (CE) (dS m<sup>-1</sup>), para as respectivas concentrações de lítio estudadas, na forma de *SLi* e *CLi*.

os respetivos sais a acentuarem-se com o aumento da concentração de lítio (Figura 3.ii). O maior potencial de *stress* do *SLi* comparativamente ao *CLi*, decorrente dos efeitos ao nível do solo, sugerem que, em concentrações semelhantes, a função de habitat do solo é mais afetada em solos com *SLi* do que com *CLi*. O comprometimento da função de habitat do SA para um limite de 60% de evitamento (Loureiro *et al.*, 2005), ocorreu para concentrações a partir dos 200 mg kg<sup>-1</sup>, para o *SLi*, e 800 mg kg<sup>-1</sup>, para o *CLi* (Figura 2.i).

Os menores valores de  $AD_{50}$  observados para o *SLi* (202,2 mg kg<sup>-1</sup>) poderão, assim, indiciar um maior potencial tóxico de *SLi* comparativamente ao *CLi* (413,4 mg kg<sup>-1</sup>) (Figura 2.ii).

## CONCLUSÕES

O estudo revelou que a presença de lítio no solo provoca comportamento de evitamento em *E. andrei*, com um aumento da percentagem de evitamento com o aumento da concentração de lítio, variando de acordo com o tipo de sal utilizado. Os valores de  $AD_{50}$  estimados revelaram um efeito mais acentuado do *SLi* comparativamente ao *CLi*, no evitamento de *E. andrei*. As diferenças no comportamento observado entre os sais de lítio estudados podem ser explicadas pelos efeitos distintos que cada sal provoca no pH e CE do solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bakhat, H.F.; Rasul, K.; Farooq, A.B.U.; Zia, Z.; Natasha, S.; Fahad, S.; Abbas, G.M. & Hammad, H.M. (2020) - Growth and physiological response of spinach to various lithium concentration in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, p. 39717-39725. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06877-2>
- 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>
- 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. & Alyyemini, 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>
- 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.
- Kuloğlu, S.S.; Yalçın, E.; Çavusolğlu, K. & Acar, A. (2022) - Dose-dependent toxicity profile and genotoxicity mechanism of lithium carbonate. *Nature*, vol. 12, art. 13504. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17838-0>
- 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, n. 1, p. 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.013>
- Niemeyer, J.C.; Alves, P.R.L.; Nunes, M.E.T.; Cardoso, E.J.B.N.; Brown, G.G.; Cantelli, K.B.; Sautter, K.D.; Segat, J.C.; Cesar, R.G.; Colonese, J.P.; Pasini, A.; Römbke, J.; Sousa, J.P.; Buch, A.C. & Baretta D. (2019) - Ensaio de comportamento de fuga. In: Niva, C.C. & Brown, G.G. (Ed.) - *Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas*. Brasília, DF: Embrapa, p. 199-208.
- OECD (2016) - *Test No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris.
- Ojha, R.B. & Devkota, D. (2014) - Earthworms: 'Soil and Ecosystem Engineers' – a Review. *World Journal of Agricultural Research*, vol. 2, p. 257-260. <https://doi.org/10.12691/wjar-2-6-1>
- Sakuma, M. (1998) - Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 33, p. 339-347. <https://doi.org/10.1303/aez.33.339>
- Xu, Z.; Zhang, Z.; Peng, S.; Yuan, Y. & Wang, X. (2023b) - Influences of lithium on soil properties and enzyme activities. *Chemosphere*, vol. 313: art. 137458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137458>
- Xu, Z.; Zhang, Z. & Wang, X. (2023a) - 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>