



volume 8 • número 2 • p 67-78

## Resposta de evitamento do isópode *Porcellionides pruinosus* a solos salinizados

O excesso de sais nos solos é um problema atual, causado por fatores antropogénicos e naturais, e que leva à degradação deste compartimento, o que compromete a manutenção da biodiversidade que alberga. Para além de análises químicas, uma das formas de monitorizar a qualidade deste recurso é através da realização de testes ecotoxicológicos, analisando as respostas dos organismos a ele expostos. No presente estudo, investigámos o impacto da salinização de solos, através da realização de testes subletais de comportamento com o isópode *Porcellionides pruinosus*, avaliando a sua resposta de evitamento a solos contaminados com diferentes concentrações de NaCl, durante 24 h. Os testes permitiram observar uma resposta de evitamento significativa para as concentrações de NaCl de 15 e 30 g kg<sup>-1</sup>, para as quais se verificou igualmente a perda da função de *habitat* do solo. Desta forma, este estudo permitiu não só ilustrar os impactos da salinização do solo sobre espécies que nele habitam, mas também evidenciar a utilidade de realização de testes ecotoxicológicos simples, para a biomonitorização da sua qualidade, através da avaliação de parâmetros comportamentais.

### Palavras-chave

salinização  
bioindicador  
isópode  
testes subletais  
comportamento

Elsa Ribeiro<sup>1\*</sup>

João Romão<sup>1\*\*</sup>

Pedro Manuel<sup>1\*</sup>

Fernando JM Gonçalves<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

\* Os autores contribuíram equitativamente para o estudo

joaoromao@ua.pt

ISSN 1647-323X

## INTRODUÇÃO

O solo é um sistema complexo e dinâmico que serve de *habitat* a diversas formas de vida, compreendendo uma elevada diversidade de microrganismos, plantas e animais (Artz & Jeffery, 2010; European Commission, 2016). O próprio ser humano está dependente da qualidade deste recurso, quer por motivos estruturais, para a edificação de diversas infraestruturas, quer para a extração de recursos através da agricultura e outras atividades (Blum et al., 2006). No entanto, o agravamento das alterações climáticas tem tido consequências ameaçadoras para a qualidade dos solos em todo o mundo e, conseqüentemente, na biodiversidade que albergam (Mandal e Sathyaseelan, 2012; Khursheed, 2016). Para além deste fator, outras causas para a sua degradação incluem a exploração intensiva pelo ser humano, como é o caso de diversas práticas agrícolas em que a alternância da irrigação com períodos de seca resulta na permanência dos sais provenientes do processo de rega (Oosterbaan, 1988; Rengasamy, 2006). O aumento da salinidade do solo pode igualmente dever-se a causas naturais relacionadas com a redução do nível da água nos aquíferos, pluviosidade, características hidráulicas e intrusão salina (Rengasamy, 2006). A salinização dos solos também representa um problema em regiões onde ocorre queda de neve e formação de gelo, com a descida das temperaturas mínimas, já que se utiliza cloreto de sódio (NaCl) para acelerar o degelo, principalmente nas estradas. Sendo este sal um composto de elevada solubilidade, é transportado em solução pela água até ao solo, localizado na berma ou nas imediações das estradas. A salinização pode estender-se a outros *habitats* por infiltração e transporte, por meio de cursos de água subterrâneos ou superficiais, através de escoamento superficial, o que resulta na contaminação de diversos ecossistemas e na alteração do seu estado nutricional, por via da troca de iões (Christopher et al., 1992; Norrström e Bergstedt, 2001; Novotny et al., 2008).

A concentração de NaCl encontrada no solo aumenta à medida que o conteúdo em água diminui com a evapotranspiração e o conteúdo de eletrólito dissolvido permanece constante (Rhoades et al., 1989). Solos naturalmente afetados por sais ocorrem normalmente em regiões áridas ou semiáridas, caracterizadas por elevadas taxas de evapotranspiração e onde a precipitação é insuficiente para causar a sua lixiviação (Oosterbaan, 1988; Rengasamy, 2006). A presença excessiva de sais no solo pode limitar o crescimento dos organismos, devido à toxicidade iónica específica ou ao *stress* osmótico provocado, dependendo da tolerância dos organismos, da concentração de iões e da interação com outros fatores (Hu e Schmidhalter, 2005; Juniper e Abbott, 2006; Owojori et al., 2009a). Um exemplo das consequências deste processo é a diminuição da colonização das raízes das plantas vasculares por parte de micorrizas arbusculares (fungos), um processo simbiótico essencial para a sobrevivência das plantas e que pode ser comprometido por efeitos em qualquer um dos organismos. Dependendo do nível de salinidade, a própria germinação de esporos de fungos ou de sementes de plantas pode ser inibida, comprometendo severamente a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas (Kaya e Pek, 2003; Juniper e Abbott, 2006).

Para além das relações bióticas, a diversidade de espécies e a abundância de organismos num dado local são limitadas pelos fatores abióticos do seu nicho ecológico (Khemaissia et al., 2010; Pocheville, 2015). De forma a ter uma compreensão dos potenciais impactos causados pela alteração destes fatores, é necessário avaliar as respostas de organismos, sendo a mortalidade uma resposta objetiva e menos suscetível a ambiguidades de interpretação, razão pela qual é frequentemente utilizada como critério de avaliação de sensibilidade de espécies. No entanto, efeitos tóxicos menos severos num indivíduo podem ter

efeitos marcantes na sua história de vida, os quais podem comprometer populações, comunidades e ecossistema, sendo por isso igualmente importante a avaliação de efeitos subletais (Huffaker e Dahlsten, 1999; Johnson e Tabashnik, 1999; Bernot et al., 2005; Juniper e Abbott, 2006). Este tipo de efeitos pode englobar alterações fisiológicas, comportamentais, de desenvolvimento e de história de vida (Mensah et al., 2018). Alterações ao nível do comportamento são muitas vezes observadas a intensidades de *stress* inferiores às de outros efeitos subletais, sendo por isso um parâmetro sensível para a avaliação de toxicidade. Adicionalmente, visto representarem uma manifestação física de respostas bioquímicas e fisiológicas de um organismo ao ambiente envolvente, este tipo de alterações pode oferecer pistas acerca dos efeitos fisiológicos, podendo ser observadas diretamente e dispensando metodologias de análise morosas e dispendiosas (Heinz, 1989; Bernot et al., 2005).

O isópode *Porcellionides pruinosus* é um artrópode terrestre frequentemente encontrado em locais húmidos com muita matéria orgânica em decomposição, como é o caso da manta morta de florestas e parques urbanos. Por serem detritívoros, estes isópodes possuem um papel de extrema importância para o ciclo de nutrientes no ecossistema, sendo responsáveis pela decomposição de matéria vegetal morta e aumento da disponibilidade de macronutrientes nas camadas superiores do solo, favorecendo a respiração microbiana (Loureiro et al., 2005; Santos et al., 2010; European Commission, 2016). A exposição destes organismos a substâncias que coloquem em causa o seu bem-estar e sobrevivência compromete, por conseguinte, o bom funcionamento do ecossistema em que estão inseridos. Esta exposição pode ocorrer por intermédio do consumo de alimento ou solo, bem como pela ingestão de água, quer diretamente com o auxílio das peças bocais, quer através da sua absorção mediante ação capilar através dos urópodes ou da cutícula (Sutton, 1972). Adicionalmente, quaisquer efeitos causados por contaminantes, e que podem influenciar processos fisiológicos são ainda potenciados pelas baixas taxas de excreção destes organismos, o que permite avaliações quantitativas da toxicidade e biodisponibilidade do contaminante (Loureiro et al., 2005). Estes motivos tornam os isópodes em bons bioindicadores ambientais, razão pela qual são muitas vezes utilizados em estudos de qualidade do solo, monitorização e avaliação de risco (Loureiro et al., 2005; Loureiro et al., 2006; Ferreira et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo demonstrar como a exibição de uma resposta de evitamento de organismos terrestres pode ser utilizada para avaliar a qualidade do solo em testes que permitem aferir, de forma simples e direta, o comportamento dos organismos perante a possibilidade de escolha entre dois solos com diferentes condições. Para tal, foram realizados testes de evitamento com o isópode *P. pruinosus* a solos com diferentes níveis de salinização. Os organismos e cenário de contaminação podem ser facilmente adaptados, mantendo a simplicidade de execução e análise, rapidez, baixo custo e, acima de tudo, o potencial pedagógico, ilustrando a importância de respostas subletais como ferramentas na avaliação dos riscos ambientais de contaminantes químicos para a biota dos solos.

## METODOLOGIA

### **Captura e manutenção dos animais**

Indivíduos da espécie *Porcellionides pruinosus* foram capturados no Parque Infante D. Pedro I, Aveiro, Portugal, em dezembro de 2018. A estratégia de captura consistiu na recolha manual dos indivíduos que se situavam entre o horizonte O (predominância de restos orgânicos) e o horizonte A (estrato mineral com acumulação de matéria orgânica) do solo (Press e Siever, 2001). Os animais foram transportados para o laboratório e mantidos numa caixa de plástico contendo uma camada com aproximadamente 5 cm de solo natural e folhas da manta morta, recolhidos no local de captura. O material vegetal adicionado possuiu a dupla função de abrigo e de alimento para os isópodes. A caixa com os organismos foi ainda borrifada com água destilada, de forma a prevenir a dessecação. Após este procedimento, os animais foram mantidos numa câmara climática a  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro, estando a caixa coberta por papel aderente perfurado e abrigada da luz direta através do seu revestimento lateral, com folha de alumínio, e superior, com folhas de papel. Este procedimento teve por fim evitar o comportamento de fototaxia negativa dos isópodes (o qual poderia limitar a sua atividade) sem, no entanto, os privar totalmente de fotoperíodo. Os animais permaneceram na caixa 24h antes do início das experiências, de forma a permitir uma aclimação ao ambiente de laboratório.

### **Solo**

O solo utilizado nos ensaios de evitamento foi obtido no Parque Infante D. Pedro I, Aveiro, Portugal, e crivado sequencialmente por malha de 4 e 2 mm para fins de homogeneização de tamanho e remoção de rochas e detritos vegetais de maior dimensão, não tendo sido submetido a quaisquer tratamentos de secagem ou esterilização para não comprometer a comunidade microbiana presente. De modo a conhecer a quantidade de água presente no solo, foram pesados cerca de 10 g de solo natural (peso efetivo: 11,50 g) com recurso a uma balança analítica (Ohaus Discovery), seguindo-se a sua secagem em estufa (Estufa Binder) até ser atingido um peso constante, que foi igualmente registado (peso seco efetivo: 8,77 g). Foi assim estimado que o solo recolhido no Parque Infante D. Pedro I continha 23,7% de humidade, sendo este valor utilizado para estimar o peso seco de solo durante a contaminação.

Antes de se dar início à contaminação, foi estimada a concentração de sal presente no solo recolhido. Para isso adicionou-se 200 ml de água desmineralizada aos 8,77 g de solo seco pesado anteriormente, num Erlenmeyer. Seguiu-se a mistura dos dois componentes por agitação, o que permitiu a dissolução dos sais presentes. A concentração de sais dissolvidos na suspensão foi medida em psu (*practical salinity unit*; 1 psu equivale a 1 g de sal por kg ou, no caso da água, pode ser aproximado para 1 g de sal por litro) com o auxílio de um salinómetro (WTW MultiLine P4). A partir desta medição, calculou-se o peso de sal presente na amostra de solo e, seguidamente, a concentração de sal por unidade de solo seco, expressa em  $\text{g kg}^{-1}$ . Assim, o solo recolhido continha uma salinidade de  $1,14 \text{ g kg}^{-1}$  de solo seco, sendo o mesmo utilizado como concentração de controlo.

A contaminação do solo foi feita com recurso a diferentes quantidades de cloreto de sódio de forma a obter as concentrações de 3, 7, 15 e  $30 \text{ g kg}^{-1}$  solo seco. O NaCl utilizado para estas contaminações foi obtido na forma de sal marinho, utilizado em culinária. Para facilitar a pesagem das diferentes quantidades e obtenção das diferentes concentrações de teste, os cristais de sal foram macerados com recurso a um almofariz e um pilão, de modo a obter cristais de menores dimensões. Os solos dos diferentes tratamentos foram

misturados com NaCl manualmente, através do revolvimento da mistura com uma colher de aço inoxidável durante 3 minutos. De forma a facilitar a dissolução do sal, após a mistura inicial e também aumentar a humidade do solo antes do início da experiência, foi adicionada água desmineralizada (em igual quantidade relativa nos diferentes tratamentos) até ser obtida uma consistência do solo semelhante à observada no campo. Visualmente, esta foi obtida quando todo o solo estava humedecido, não havendo partículas soltas, mas sem a formação de agregados. Os solos foram novamente misturados durante 5 minutos, garantindo uma hidratação homogênea.

### Testes de evitamento de solo

Para os testes de evitamento foram selecionados isópodes com comprimentos entre os 5 e os 7 mm, que não apresentassem problemas de mobilidade e que possuíssem as duas antenas intactas. Os testes foram realizados em caixas de plástico redondas com 10 cm de diâmetro e 6 cm de altura, perfuradas lateralmente, de forma a permitir trocas gasosas, e cobertas com uma tampa para reter a humidade (Figura 1). A preparação do teste consistiu na colocação de uma divisória que separava a caixa pelo seu diâmetro, seguida da adição de 25 g de solo controlo (solo sem adição de cloreto de sódio) e 25 g de solo salinizado nos dois lados opostos (Figura 2). Foi também realizado um teste de duplo-controlo para verificar a distribuição equitativa de indivíduos de ambos entre ambas as secções, tendo sido colocado solo controlo de ambos os lados da divisória para o efeito. Após esta fase, foram retiradas as divisórias e adicionados 5 animais no centro de cada caixa, tapando-se a mesma em seguida. Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicado e mantidos numa câmara climática a  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 h luz e 8 h escuro. As caixas foram abrigadas de luz direta, de forma a estimular o comportamento de fototaxia negativa dos animais, levando-os a enterrarem-se no solo, mas sem inibir o movimento pela superfície devido a uma intensidade de luz demasiado forte. Os testes decorreram durante 24 h, após as quais a divisória foi novamente colocada e os animais de cada lado contados e registados.



**FIGURA 1.** Caixas de plástico redondas (10 cm de diâmetro e 6 cm de altura) com solo, onde se realizaram os testes de evitamento.

O cálculo da percentagem de presença de isópodes na fração de solo salinizado foi efetuado de acordo com a seguinte equação:  $x = [(nt)/N] * 100$ , onde  $nt$  é o número de organismos encontrados do lado salinizado e  $N$  é o número total de organismos, para cada réplica.

Os dados obtidos foram ainda comparados com o limite proposto pela ISO (2008) para a classificação de perda de função *habitat* em testes de evitamento de solo, utilizando os anelídeos *Eisenia fetida* e *Eisenia*

*andrei*. De acordo com este protocolo, considera-se que a função de *habitat* do solo está comprometida quando um mínimo de 80% dos indivíduos permanece no solo de controlo (ou, inversamente, quando um máximo de 20% dos indivíduos permanece no solo contaminado).

### Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de evitamento foram analisados através do teste exato de Fisher, utilizando tabelas de contingência para comparar a distribuição de animais observada com a distribuição esperada na ausência de uma resposta de evitamento, a qual resultaria numa divisão equitativa dos animais por ambas as secções de solo (i.e., metade do número de animais de cada lado) (Zar, 2009). Como foi utilizado um número ímpar de animais por réplica, a análise foi efetuada sobre a soma do número de animais em cada lado da divisória em todas as réplicas de um mesmo tratamento. O nível de significância foi definido como  $p = 0,05$  para o teste realizado.

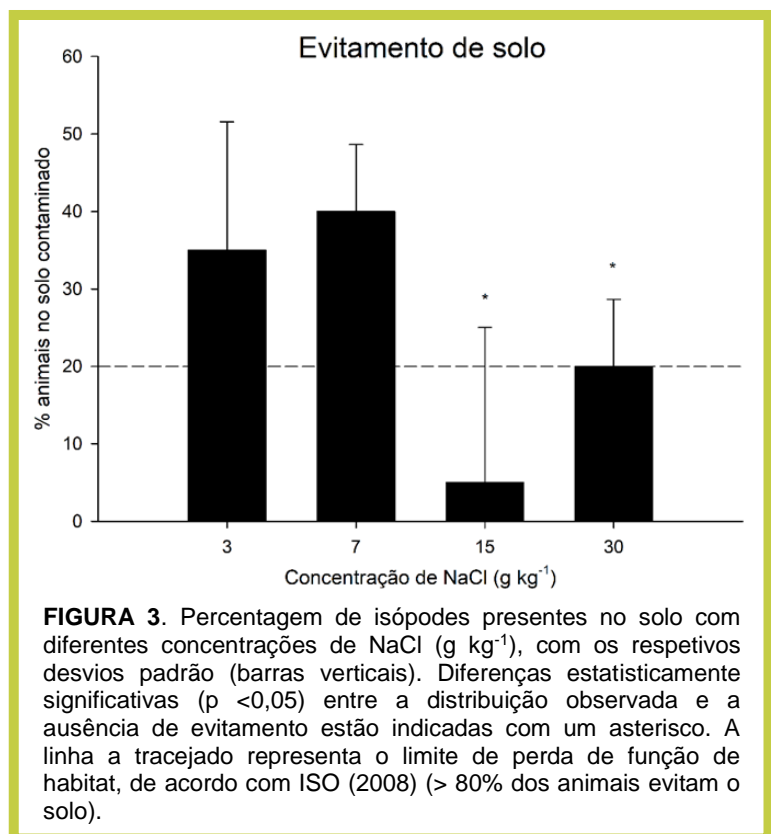


**FIGURA 2.** Preparação do sistema de teste com divisória para colocação de solo controlo e contaminado, nos dois lados opostos.

## RESULTADOS

As caixas de plástico foram verificadas 24 h após o início da experiência, tendo sido possível observar vários buracos no solo feitos pelos isópodes. Apenas se observou um animal na superfície do solo no teste com a concentração de NaCl mais elevada ( $30 \text{ g kg}^{-1}$ ), tendo sido contabilizado de acordo com o local em que se encontrava no final da experiência. Apenas um indivíduo foi encontrado morto, tendo o mesmo sido detetado no teste com a concentração de NaCl de  $3 \text{ g kg}^{-1}$ , do lado do controlo.

A validade do teste foi avaliada através da comparação da distribuição observada no duplo controlo com a distribuição esperada na ausência de evitamento, que não revelou diferenças significativas ( $p = 1.000$ ). A percentagem de isópodes presentes no solo contaminado, para as concentrações de 3, 7, 15 e  $30 \text{ g NaCl kg}^{-1}$  solo seco, foi, respetivamente, de 35%, 40%, 5% e 20% (Figura 3). Os resultados



**FIGURA 3.** Percentagem de isópodes presentes no solo com diferentes concentrações de NaCl ( $\text{g kg}^{-1}$ ), com os respetivos desvios padrão (barras verticais). Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre a distribuição observada e a ausência de evitamento estão indicadas com um asterisco. A linha a tracejado representa o limite de perda de função de habitat, de acordo com ISO (2008) ( $> 80\%$  dos animais evitam o solo).



observados nos diferentes tratamentos foram igualmente comparados com a distribuição esperada na ausência de evitamento, não se tendo verificado diferenças significativas para as concentrações de NaCl de 3 e 7 g kg<sup>-1</sup> ( $p = 0,2616$  e  $p = 0,3756$ , respetivamente). Por outro lado, as concentrações de 15 e 30 g kg<sup>-1</sup> causaram uma resposta de evitamento estatisticamente significativa ( $p = 0,0017$  e  $p = 0,0479$ , respetivamente). Adicionalmente, e de acordo com o conceito de função de *habitat* definido por ISO (2008), a função de *habitat* dos solos com as duas concentrações de NaCl mais elevadas foi comprometida, sendo que os resultados da concentração de 30 g kg<sup>-1</sup> se encontram no limite de 20% (Figura 3).

## DISCUSSÃO

Não obstante à utilização de outras metodologias (nomeadamente químicas), a avaliação da qualidade dos solos é muitas vezes possível devido à aplicação de testes ecotoxicológicos que têm por base a avaliação de respostas de invertebrados do solo (ISO, 2008). Testes de evitamento são, por isso, propostos como um método simples que permite obter respostas rápidas, sendo considerados como uma ferramenta de triagem primária de avaliação dos riscos de contaminação de solos (ISO, 2008; Natal-da-Luz et al., 2008). Os organismos do solo como *P. pruinosus*, que exercem papéis fundamentais na manutenção da estrutura e função dos solos, constituem um elemento importante para a avaliação da qualidade dos mesmos, podendo evidenciar cenários de contaminação deste recurso (Crouau et al., 2002).

No seu meio natural, a maioria dos animais possui adaptações comportamentais, conseguindo mover-se para locais que apresentem condições mais favoráveis à sua sobrevivência, através da utilização de pistas químicas. À semelhança de outros isópodes, a espécie em estudo exhibe comportamentos sociais possibilitados pela presença de quimiorreceptores altamente sensíveis que não só lhes permitem detetar alterações no meio que possam afetar a qualidade ecológica do mesmo, mas também reconhecer feromonas de agregação, produzidas por outros organismos da mesma espécie (Loureiro et al., 2005; Loureiro et al., 2009; Khemaisia et al., 2010). Este comportamento gregário pode influenciar a resposta ao nível do individual, uma vez que o movimento de um organismo num mesmo teste será não só influenciado pela condição do meio, mas também pelo movimento dos restantes, não apresentando por isso respostas independentes. No entanto, a produção destas feromonas permite que animais que não conseguem identificar eficientemente condições adversas do ambiente se desloquem juntamente com o resto do grupo, sendo por isso importante para o reconhecimento e evitamento de compostos químicos no solo, podendo potenciar esta resposta (Loureiro et al., 2005). Esta capacidade dota também os organismos de uma maior eficácia na procura de alimento, de fuga a predadores ou mesmo de reconhecimento de animais da mesma espécie, sendo por isso essencial para a sua reprodução e sobrevivência (Bengtssone et al., 1991; Aldaya et al., 2006).

Sendo a salinização do solo um problema global e reconhecido com uma das principais razões para a degradação do mesmo, os seus efeitos sobre diferentes organismos têm sido estudados e documentados nas últimas décadas, sendo que a maioria dos estudos realizados se concentra na avaliação de solo contaminado com NaCl ou KCl ou solo naturalmente salino (Owojori et al., 2009b). A literatura existente acerca dos impactos da salinização dos solos por NaCl em plantas é relativamente extensa, contemplando principalmente avaliações com espécies com valor agrícola e ornamental (Salodkar et al., 1989; Özmen et al., 2003; Gebauer et al., 2004; Lefèvre et al., 2009; McCullough e Raymer, 2011; Han et al., 2012;

Tarchoune et al., 2013). Por outro lado, a literatura existente para invertebrados é comparativamente diminuta, sendo maioritariamente constituída por testes ecotoxicológicos com o anelídeo *E. fetida* (Robidoux e Delisle, 2001; Owojori et al., Reinecke, & Rozanov, 2009a; Owojori et al., 2009b; Owojori e Reinecke, 2014; Yesudhasan et al., 2018) e o nemátode *Caenorhabditis elegans*, possivelmente devido à elevada permeabilidade dos seus tegumentos e à existência de testes padronizados para a realização de estudos com estes organismos (ISO, 2008, 2010). Não obstante, os poucos estudos existentes evidenciam que este tipo de salinização tem efetivamente impacto sobre os invertebrados terrestres. Owojori et al. (2008) realizaram testes de 28 dias com *E. fetida* em solo contaminado com NaCl, tendo calculado um  $CL_{50}^1$  de  $5,436 \text{ g kg}^{-1}$  e valores de  $CE_{50}^2$  para crescimento e produção de casulos de  $4,985$  e  $2,020 \text{ g kg}^{-1}$ , respetivamente. Num estudo semelhante, realizado por Guzyte et al. (2011), utilizando também *E. fetida* e um ensaio com duração de 28 dias, foi calculado um  $CL_{50}$  de  $5,623 \text{ g kg}^{-1}$  e um  $CE_{50}$  para a produção de casulos de  $2,512 \text{ g kg}^{-1}$ . Tanto quanto é do nosso conhecimento, apenas dois estudos descrevem comportamentos de evitamento de invertebrados a solos salinizados com NaCl, cujos ensaios duraram ambos 48 h. O primeiro estudo avaliou a resposta de evitamento com *Aporrectodea caliginosa* e *E. fetida*, tendo-se obtido os valores de  $CE_{50}$  de  $0,667$  e  $1,164 \text{ g kg}^{-1}$ , respetivamente (Owojori e Reinecke, 2009). No segundo estudo foi avaliada a resposta do ácaro *Hypoaspis aculeifer*, tendo-se obtido um  $CE_{50}$  de  $11,689 \text{ g kg}^{-1}$  (Owojori et al., 2014).

No presente estudo, a concentração de NaCl de  $15 \text{ g kg}^{-1}$  de solo apresentou o maior efeito, seguindo-se da concentração de  $30 \text{ g kg}^{-1}$ , tendo sido evitada por 95% e 80% dos isópodes, respetivamente, representando ambas uma resposta de evitamento estatisticamente significativa. Adicionalmente, ambas as concentrações referidas produziram efeitos que classificam o solo como tendo perdido a sua função de habitat, de acordo com ISO (2008) (Figura 3). A presença de *P. pruinosos* em solos com concentrações de NaCl até  $35 \text{ g kg}^{-1}$  foi reportada por Khemaissia et al. (2010), pelo que a resistência destes isópodes a salinidades elevadas pode condicionar a sua resposta de evitamento. A diminuição da percentagem de evitamento observada na concentração mais alta, relativamente à anterior, poderá estar relacionada com o efeito do cloreto de sódio sobre o reconhecimento ou produção de feromonas de agregação, comprometendo o comportamento gregário dos isópodes. Foi já demonstrado em estudos prévios que concentrações elevadas de compostos químicos podem alterar as taxas de processamento e excreção de alimento e solo por isópodes (Silva et al., 2014; Tourinho et al., 2015; van Gestel et al., 2018). Uma vez que as feromonas de agregação são libertadas juntamente com as fezes, podemos colocar a hipótese que a presença de uma concentração mais elevada de sal de um dos lados da caixa resultou numa diminuição do processamento de solo pelos animais e, por conseguinte, da sua taxa de excreção (Takeda, 1980). Por outro lado, e caso não ocorra a inibição da excreção de compostos, existe igualmente a possibilidade da presença de cloreto de sódio no intestino interagir com as feromonas diretamente, alterando as suas características, ou indiretamente,

---

<sup>1</sup>  $CL_{50}$ , ou Concentração Letal 50, é a concentração de um composto ou substância que causa a morte de 50% de organismos da amostra, para um determinado tipo de teste e respetivo período de exposição. É utilizada em ecotoxicologia como uma forma de avaliar a toxicidade e é obtida através de modelos estatísticos, de regressão que dão origem às curvas de dose-resposta (i.e., a expressão que traduz a resposta dos organismos em função da concentração à qual estão expostos).

<sup>2</sup> Da mesma forma,  $CE_{50}$ , ou Concentração Efeito 50, representa a concentração que dá origem a 50% da resposta máxima na população da amostra, mas referindo-se normalmente a efeitos subletais (crescimento, reprodução, etc.).



afetando a sua produção, levando em ambos os casos a uma modificação do comportamento de agregação destes animais.

Importa reforçar que as implicações da salinização se estendem para além do evitamento de solo verificado para os isópodes, podendo estes efeitos influenciar todo o ecossistema por perda de funções desempenhadas por estes organismos, comprometendo assim a sua biodiversidade e serviços. Apesar da sua simplicidade, os testes de evitamento demonstram assim ser uma ferramenta fulcral para a avaliação de risco ecológico de solos contaminados, enfatizando a importância das respostas comportamentais de organismos como forma de biomonitorização da qualidade deste recurso.

## APLICAÇÕES e PERSPETIVAS FUTURAS

A preservação da qualidade do solo é fundamental para a manutenção da biodiversidade e para o bom funcionamento dos ecossistemas terrestres, podendo ser comprometida por fatores de origem antropogénica ou natural. Torna-se assim imperativo diagnosticar o seu bom estado através de testes adequados, com resultados objetivos e fáceis de interpretar. Neste contexto, o presente trabalho demonstra que bioensaios subletais, com base em testes de evitamento, e utilizando organismos amplamente disponíveis, são uma ferramenta profícua para a avaliação da qualidade dos solos. Neste caso em particular, os isópodes da espécie *P. pruinosus* mostraram respostas evidentes após uma exposição de apenas 24 h, tendo sido capazes de detetar a salinização do solo, evitando-o. Não obstante o papel bioindicador desta espécie, o nosso estudo pretende ultimamente demonstrar a utilidade e potencial pedagógico deste tipo de ensaios subletais para ilustrar as respostas de populações à degradação do seu *habitat*. Este estudo pode ainda ser facilmente adaptado para outras espécies e/ou contaminantes, mantendo a sua simplicidade de execução e análise com recursos mínimos.

---

**agradecimentos** • O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da participação de ER, JR e PM numa unidade curricular do Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia (Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro). São devidos agradecimentos à FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CESAM (UID/AMB/50017/2019) através de fundos nacionais e cofinanciamento FEDER, dentro do Acordo de Parceria dos programas PT2020 e Compete 2020.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldaya, M. M., Lors, C., Salmon, S., & Ponge, J. F. (2006). Avoidance bio-assays may help to test the ecological significance of soil pollution. *Environmental Pollution*, 140(1), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.011>
- Artz, R., & Jeffery, S. (2010). European Atlas of Soil Biodiversity. Publications Office of the European Union. Retrieved from <https://books.google.pt/books?id=TO3xtgAACAAJ>
- Bengtsson, G., Hedlund, K., & Rundgren, S. (1991). Selective odor perception in the soil collembola *Onychiurus armatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 17(11), 2113–2125. <https://doi.org/10.1007/BF00987995>
- Bernot, R. J., Kennedy, E. E., & Lamberti, G. A. (2005). Effects of Ionic Liquids on the Survival, Movement, and Feeding Behavior of the Freshwater Snail, *Physa acuta*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1759. <https://doi.org/10.1897/04-614R.1>
- Blum, W. E. H., Warkentin, B. R., & Frossard, E. (2006). Soil, human society and the environment. Geological Society, London, Special Publications, 1-8. Retrieved from <http://sp.lyellcollection.org/content/266/1/1.full.pdf>

- Christopher, A., Strong, J. E., & Mosher, P. A. (1992). Effect of Deicing Salts on Metal and Organic Matter Mobilization in Roadside Soils. *Environmental Science and Technology*, 26(4), 703–709. <https://doi.org/10.1021/es00028a006>
- Crouau, Y., Gisclard, C., & Perotti, P. (2002). The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) in bioassays of waste. *Applied Soil Ecology*, 19, 65–70.
- European Commission. (2016). Global Soil Biodiversity Atlas.
- Ferreira, N. G. C., Cardoso, D. N., Morgado, R., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2015). Long-term exposure of the isopod *Porcellionides pruinosus* to nickel: Costs in the energy budget and detoxification enzymes. *Chemosphere*, 135, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.025>
- Gebauer, J., El-Siddig, K., Salih, A. A., & Ebert, G. (2004). *Tamarindus indica* L. seedlings are moderately salt tolerant when exposed to NaCl-induced salinity. *Scientia Horticulturae*, 103(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.022>
- Guzyte, G., Sujetoviene, G., & Zaltauskaite, J. (2011). Effects of salinity on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Engineering*, 111–114.
- Han, R. M., Lefèvre, I., Ruan, C. J., Beukelaers, N., Qin, P., & Lutts, S. (2012). Effects of salinity on the response of the wetland halophyte *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. to copper toxicity. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(3), 1137–1150. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0931-5>
- Heinz, G. H. (1989). How lethal are sublethal effects? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(6), 463–464. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080601>
- Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 541–549. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420516>
- Huffaker, C. B., & Dahlsten, D. L. (1999). Scope and Significance of Biological Control (pp. 1–16). <https://doi.org/10.1016/B978-012257305-7/50048-5>
- ISO. (2008). Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects on behavior – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).
- ISO. (2010). Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), 2010.
- Johnson, M., & Tabashnik, B. (1999). Enhanced Biological Control through Pesticide Selectivity. In Handbook of Biological Control (pp. 297–317). <https://doi.org/10.1016/B978-012257305-7/50060-6>
- Juniper, S., & Abbott, L. K. (2006). Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16(5), 371–379. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0046-9>
- Kaya, M. D., & Pek, A. (2003). Effects of Different Soil Salinity Levels on Germination and Seedling Growth of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27, 221–227.
- Khemaissia, H., Souty-Grosset, C., & Nasri-Ammar, K. (2010). Impact of soil quality on the distribution of terrestrial isopods in some tunisian wetlands. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(2), 131–136. <https://doi.org/10.7161/ANAJAS.2010.25.2.131-136>
- Khursheed, S. (2016). Soil Biodiversity and Climate Change. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 3(5), 166–168. <https://doi.org/10.15406/apar.2016.03.00113>
- Lefèvre, I., Marchal, G., Meerts, P., Corréal, E., & Lutts, S. (2009). Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany*, 65(1), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.07.005>
- Loureiro, S., Amorim, M. J. B., Campos, B., Rodrigues, S. M. G., & Soares, A. M. V. M. (2009). Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behavior as an endpoint. *Environmental Pollution*, 157(2), 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.010>
- Loureiro, S., Sampaio, A., Brandão, A., Nogueira, A. J. A., & Soares, A. M. V. M. (2006). Feeding behavior of the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* Brandt, 1833 (Crustacea, Isopoda) in response to changes in food quality and contamination. *Science of the Total Environment*, 369(1–3), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.05.023>
- Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., & Nogueira, A. J. A. (2005). Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, 138(1), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.013>
- Mandal, A., & Sathyaseelan, N. (2012). Impact of Climate Change on Soil Biodiversity- a Review. *Agri. Reviews*, (4), 33–33.
- McCullough, P. E., & L. Raymer, P. (2011). Sodium Chloride Efficacy for Smooth Crabgrass (*Digitaria ischaemum*) Control and Safety to Common Bermudagrass and Seashore Paspalum. *Weed Technology*, 25(4), 688–693. <https://doi.org/10.1614/WT-D-11-00039.1>
- Mensah, P. K., Palmer, C. G., & Muller, W. J. (2018). Lethal and Sublethal Effects of Pesticides on Aquatic Organisms: The Case of a Freshwater Shrimp Exposure to Roundup®. *Intech Open*, 2, 64. <https://doi.org/10.5772/32009>

- Natal-da-Luz, T., Amorim, M. J. B., Römbke, J., & Paulo Sousa, J. (2008). Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.09.005>
- Norrström, A. C., & Bergstedt, E. (2001). The impact of road de-icing salts (NaCl) on colloidal dispersion and base cation pools in roadside soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 127(1–4), 281–299. <https://doi.org/10.1023/A:1005221314856>
- Novotny, E. V., Murphy, D., & Stefan, H. G. (2008). Increase of urban lake salinity by road deicing salt. *Science of the Total Environment*, 406(1–2), 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.037>
- Oosterbaan, R. J. (1988). Effectiveness and Social / Environmental Impacts of Irrigation Projects: a Critical Review, 18–34.
- Owojori, O. J., & Reinecke, A. (2009). Avoidance behavior of two eco-physiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere*, 75(3), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.051>
- Owojori, O. J., & Reinecke, A. J. (2014). Differences in ionic properties of salts affect saline toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*, 83, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.019>
- Owojori, O. J., Reinecke, A. J., & Rozanov, A. B. (2008). Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2385–2393. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.019>
- Owojori, O. J., Reinecke, A. J., & Rozanov, A. B. (2009a). The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*, 41(3), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.11.006>
- Owojori, O. J., Reinecke, A. J., Voua-Otomo, P., & Reinecke, S. A. (2009b). Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil-dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). *Pedobiologia*, 52(6), 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.12.002>
- Owojori, O. J., Waszak, K., & Roembke, J. (2014). Avoidance and reproduction tests with the predatory mite *Hypoaspis aculeifer*: Effects of different chemical substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 230–237. <https://doi.org/10.1002/etc.2421>
- Özmen, A. D., Özdemir, F., & TÜRkan, I. (2003). Effects of paclobutrazol on response of two barley cultivars to salt stress. *Biologia Plantarum*, 46, 263–268.
- Pocheville, A. (2015). The Ecological Niche: History and Recent Controversies. In *Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences* (pp. 1–910). <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9014-7>
- Press, F., & Siever, R. (2001). *Understanding Earth*. W.H. Freeman. Retrieved from <https://books.google.pt/books?id=9-gxOAAACAAJ>
- Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1017–1023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj108>
- Rhoades, J. D., Manteghi, N. A., Shouse, P. J., & Alves, W. J. (1989). Soil Electrical Conductivity and Soil Salinity: New Formulations and Calibrations. *Soil Science Society of America Journal*, 53(2), 433. <https://doi.org/10.2136/sssaj1989.03615995005300020020x>
- Robidoux, P. Y., & Delisle, C. E. (2001). Ecotoxicological evaluation of three deicers (NaCl, NaFo, CMA) - Effect on terrestrial organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(2), 128–139. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2035>
- Salodkar, R. V., Deshpande, V. K., & Singh, K. (1989). Enhancement of the ionic conductivity of lithium borophosphate glass: a mixed glass former approach. *Journal of Power Sources*, 25(4), 257–263. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9707-7>
- Santos, M. J. G., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2010). Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. *Chemosphere*, 80(9), 1021–1030. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.031>
- Silva, P. V., Silva, A. R. R., Mendo, S., & Loureiro, S. (2014). Toxicity of tributyltin (TBT) to terrestrial organisms and its species sensitivity distribution. *Science of The Total Environment*, 466–467, 1037–1046. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.002>
- Sutton, S. (1972). *Woodlice*. Pergamon Press.
- Takeda, N. (1980). The aggregation pheromone of some terrestrial isopod crustaceans. *Experimentia*, 36(1296–1297), 20–21.
- Tarchoune, I., Sgherri, C., Baâtour, O., Izzo, R., Lachaâl, M., Navari-Izzo, F., & Ouerghi, Z. (2013). Effects of oxidative stress caused by NaCl or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> excess on lipoic acid and tocopherols in Genovese and Fine basil (*Ocimum basilicum*). *Annals of Applied Biology*, 163(1), 23–32. <https://doi.org/10.1111/aab.12036>

- Tourinho, P. S., van Gestel, C. A. M., Jurkschat, K., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2015). Effects of soil and dietary exposures to Ag nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*. *Environmental Pollution*, 205, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.044>
- van Gestel, C. A. M., Loureiro, S., & Zidar, P. (2018). Terrestrial isopods as model organisms in soil ecotoxicology: a review. *ZooKeys*, 801(801), 127–162. <https://doi.org/10.3897/zookeys.801.21970>
- Yesudhasan, B. V., Kanniah, P., Subramanian, E. R., Ponesakki, V., Rajendiran, V., & Sivasubramaniam, S. (2018). Exploiting the unique phenotypes of the earthworm *Eudrilus eugeniae* to evaluate the toxicity of chemical substances. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(3). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6477-x>
- Zar, J. (2009). Statistical Analysis. *PsycCRITIQUES* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1037/0012764>.