



Comportamento de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em Solo com Glifosato: Testes de Fuga em Laboratório

J. C. NIEMEYER,^{1*} V. C. DOS SANTOS,¹ J. M. L. RODRIGUES² & E. M. DA-SILVA¹

¹Universidade Federal da Bahia, Rua Barão do Geremoabo, s/n, Campus Ondina, Salvador, Bahia

²Universidade do Aveiro, Portugal

RESUMO

Testes agudos e testes de fuga foram realizados com populações laboratoriais do isópodo *Cubaris murina* para avaliar sua sensibilidade ao glifosato. As soluções contaminantes foram preparadas a partir do herbicida Roundup®. Nos testes agudos, dez filhotes foram confinados e expostos em cada tratamento: solo com três concentrações diferentes de glifosato e solo controle (sem contaminante). A mortalidade foi observada após 7 dias. Utilizou-se o teste de Spearman-Kärber para calcular a LC₅₀. Nos testes de fuga, dez juvenis foram soltos no centro de cada recipiente-teste, com quatro porções de solo: três porções com diferentes concentrações de glifosato e um controle. A preferência dos isópodos foi registrada após 1,5, 2, 3, 4 e 24 horas. Utilizou-se ANOVA para verificar se houve diferenças significativas entre o número médio de isópodos em cada tratamento e o controle. A 7-d-LC₅₀ foi de 35,5 mg gli/g solo. Nos testes de fuga, diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, indicando a fuga, ocorreram em todos os tratamentos, inclusive em 5,12 mg gli/g solo, já após 1,5 hora. O comportamento de fuga foi um alvo fisiológico muito sensível, avaliável em experimentos de baixo custo, apresentando uma resposta rápida e de grande relevância ecológica.

Palavras-chave: ecotoxicologia, isopoda, glifosato, mortalidade, testes de fuga.

ABSTRACT

Behavior of *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) in soil contaminated with glyphosate: avoidance tests in laboratory

Acute tests and avoidance tests were carried out using laboratory populations of *Cubaris murina*, to assess their sensitivity to glyphosate. The contaminant solutions were prepared by herbicide Roundup®. In the acute tests, ten offspring were confined and exposed to each treatment: soil with different concentrations of glyphosate and soil without contaminant (control). Mortality was observed after 7 days. The Spearman-Kärber test was used to calculate the LC₅₀. In the avoidance tests, ten juveniles were put on the center of each recipient-test, with four portions of soil: three portions with different concentrations of glyphosate and one control. The preference of the isopods was registered after 1.5, 2, 3, 4 and 24 hours. ANOVA was used to verify whether there were significant differences among the mean number of isopods in each treatment and the control. The 7-d-LC₅₀ was 35.5 mg gli/g soil. In the avoidance tests, significant differences ($p < 0.05$) in relation to the control, which indicated avoidance, occurred in all treatments, including 5.12 mg gli/g soil, already at 1.5 hour. The avoidance behavior was a very sensitive endpoint, assessed in low cost experiments, showing a rapid response and having an important ecological role.

Key words: ecotoxicology, isopoda, glyphosate, mortality, avoidance tests.

INTRODUÇÃO

Atualmente, testes de toxicidade baseados em *alvos fisiológicos* que avaliam alterações bioquímicas, comportamentais ou histológicas têm sido desenvolvidos em lugar das

tradicionais respostas na sobrevivência, crescimento e reprodução (Drobne, 1997). Porém, os alvos fisiológicos mais comumente usados nos estudos com isópodos ainda são mortalidade, crescimento e reprodução. Ainda segundo Drobne (1997), a desvantagem de usar a mortalidade é que se trata

*Corresponding author: Júlia Carina Niemeyer, e-mail: juliacarina@yahoo.com.br.

de um alvo de baixa sensibilidade; já crescimento e reprodução podem requerer experimentos de longa duração, além da alta variabilidade individual das respostas.

Testes de comportamento de fuga podem ser indicadores muito sensíveis de contaminação química. Dados sobre preferências e fuga são relativamente simples de ser coletados e ecologicamente relevantes, além do baixo custo e da resposta rápida (Yearley *et al.*, 1996).

Mudanças comportamentais induzidas por xenobióticos podem alterar o regime de exposição de um organismo ao tóxico e podem ser importantes para a avaliação do risco ambiental, desde que o risco seja em função da probabilidade de exposição e suscetibilidade ao tóxico (Yearley *et al.*, 1996).

Testes de fuga vêm sendo realizados com organismos aquáticos, como peixes (Svecevicus, 2001), cladóceros (Lopes *et al.*, 2004) e anfípodos (Kravitz *et al.*, 1999), e principalmente com organismos terrestres, como minhocas (Yearley *et al.*, 1996) e isópodos (Loureiro *et al.*, 2002; Odendaal & Reinecke, 1999).

Em muitos estudos, o comportamento de fuga tem sido muito mais sensível do que a letalidade (Yearley *et al.*, 1996). Alguns exemplos são os trabalhos de: Kravitz *et al.* (1999), sobre a resposta de anfípodos a sedimentos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos; Svecevicus (2001), sobre a resposta de trutas a misturas de metais pesados; e Lopes *et al.* (2004), sobre a evitação da contaminação com chumbo por *Daphnia longispina*.

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivos determinar a LC_{50} (concentração letal para 50% dos organismos) do glifosato para a espécie *Cubaris murina* Brandt (1833) e verificar se há nesse isópodo a capacidade de evitar ou não o solo contaminado com glifosato em concentrações menores que a LC_{50} .

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isópodos utilizados nos testes foram oriundos de uma fazenda em Simões Filho, Bahia, sendo mantidos por várias gerações em laboratório há cerca de dois anos. O solo utilizado foi o mesmo dos cultivos dos isópodos no laboratório, oriundo do Centro de Mandioca e Fruticultura – EMBRAPA (Cruz das Almas). O solo foi peneirado antes do uso.

Testes agudos foram realizados para encontrar a 7-d- LC_{50} (concentração letal para 50% dos organismos em 7 dias) do glifosato para *Cubaris murina*. Optou-se pelos ensaios com duração de 7 dias devido à resistência dessa espécie ao glifosato em ensaios com duração de 48 horas, já verificada anteriormente (Niemeyer, 2004). Para a montagem dos testes agudos, porções de 75 g de solo foram pesadas e contaminadas com soluções preparadas a partir do herbicida Roundup® e água destilada. Posteriormente, o solo foi homogeneizado e distribuído entre as réplicas da mesma concentração, em recipientes de

vidro com 7 cm de diâmetro e 4 cm de altura. No controle, utilizaram-se apenas solo e água destilada. As concentrações utilizadas foram: controle, C1 (12 mg gli/g solo), C2 (24 mg gli/g solo) e C3 (48 mg gli/g solo).

Os filhotes utilizados, com quatro a sete dias de vida, foram distribuídos aleatoriamente entre as réplicas, perfazendo um total de dez indivíduos por réplica, com os testes sendo realizados em triplicata. Utilizaram-se filhotes por se acreditar que nessa fase os indivíduos são mais sensíveis do que na fase adulta. Durante o experimento, nenhum alimento foi adicionado. O número de sobreviventes em cada tratamento após o período determinado foi registrado. Os dados foram lançados no programa TSK, Teste de Spearman-Kärber, para calcular a LC_{50} .

Para os testes de fuga, foram utilizadas 6 bandejas plásticas de 34 cm de diâmetro e 11 cm de altura, seguindo a distribuição das concentrações em cada réplica (Figura 1).

Para testar a hipótese de que os isópodos distribuem-se aleatoriamente entre os quadrantes dos recipientes-teste, um experimento inicial foi realizado sem contaminante algum, apenas com solo e água destilada em todos os quadrantes. As leituras e a análise dos dados foram realizadas da mesma forma que no teste com contaminante.

Em cada réplica havia quatro quadrantes: um controle (Co) e três concentrações crescentes de glifosato (C1, C2 e C3). Cada quadrante dentro das réplicas continha 75 g de solo, com aproximadamente 1,5 cm de altura, contaminado com a respectiva solução contaminante ou contendo apenas água destilada (controle). As soluções contaminantes foram preparadas a partir do herbicida Roundup® e água destilada, em balões volumétricos. As concentrações nominais iniciais de glifosato usadas foram 5,12 mg gli/g solo (C1), 10,24 mg gli/g solo (C2) e 20,48 mg gli/g solo (C3).

No centro de cada réplica, dez indivíduos de *C. murina* da população mantida em laboratório foram soltos. Utilizaram-se organismos juvenis, de ambos os sexos, que não continham acúmulos de cálcio (que antecedem a ecdise). Os organismos foram distribuídos aleatoriamente entre as réplicas. Borrifadas de água destilada foram adicionadas às paredes internas das bandejas-teste, e as mesmas permaneceram parcialmente cobertas com uma tampa escura, evitando a excessiva evaporação da água e reduzindo a incidência de luz.

Os isópodos puderam andar livremente entre os quadrantes. As leituras foram realizadas após 1,5, 2, 3, 4 e 24 horas, observando-se quantos isópodos estavam presentes em cada quadrante. Os isópodos que se encontravam nos espaços entre os quadrantes não foram considerados na análise.

Para a análise dos dados do teste de fuga, utilizou-se análise de variância (ANOVA), de entrada única, para verificar se as médias obtidas no controle apresentavam diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparadas às médias das demais concentrações, para cada leitura realizada (Zar, 1996).

Para verificar se as concentrações diferiam entre si quanto ao número de isópodos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Com o teste de Bartlett, verificou-se a homogeneidade das amostras; em alguns casos, o mesmo recomendou o uso de ANOVA não-paramétrica. Nesses casos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No resultado do teste agudo, o isópodo *Cubaris murina* apresentou-se pouco sensível ao glifosato, sendo a 7-d-LC₅₀ do glifosato para essa espécie igual a 35,55 mg gli/g solo (31,89-

39,62). Os resultados evidenciam a necessidade de estudar outros *alvos fisiológicos* mais sensíveis do que mortalidade para essa espécie, em relação ao glifosato.

Quanto aos testes de fuga, no experimento inicial sem contaminantes, os isópodos distribuíram-se aleatoriamente, não havendo diferenças estatísticas entre os quadrantes (Figura 2). Sendo assim, realizou-se o experimento com solo contaminado.

No experimento onde se utilizou solo contaminado com glifosato, pôde-se notar imediata evitação aos quadrantes contaminados, que apresentaram diferenças significativas em relação ao controle já 1,5 hora após o início do experimento (Figura 3).

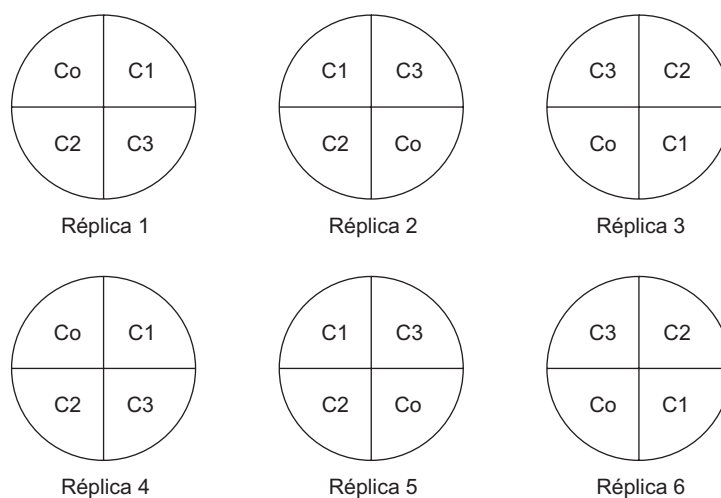


Figura 1 — Diagrama esquemático da distribuição das concentrações nas seis réplicas do teste de fuga.

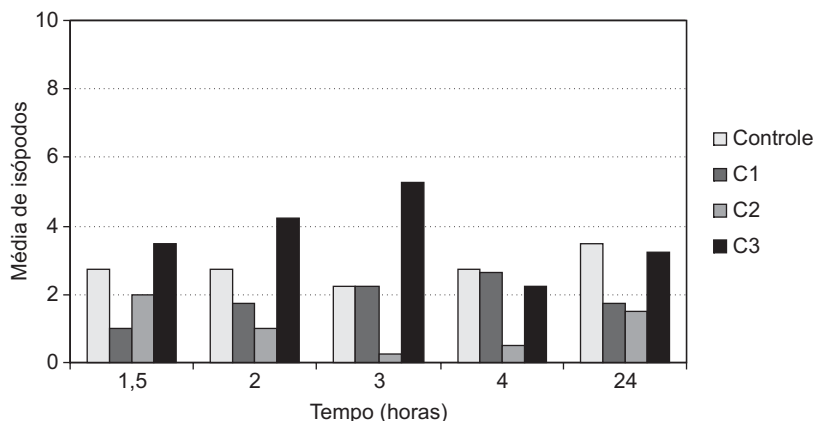


Figura 2 — Número médio de isópodos em cada quadrante nos diferentes horários de leitura após o início do experimento. Experimento inicial, utilizando apenas solo e água destilada em todos os quadrantes, demonstrando a distribuição aleatória dos isópodos.

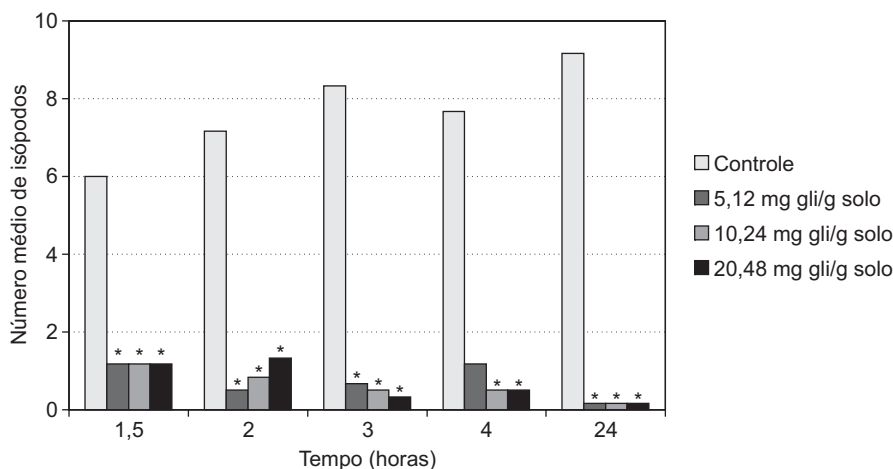


Figura 3 — Número médio de isópodos em cada tratamento nos diferentes horários de leitura após o início do experimento. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Já entre os quadrantes contaminados, estes nunca foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$) quanto ao número médio de isópodos.

Van Straalen & Van Rijn (1998) afirmam que “reprodução e crescimento são alvos fisiológicos mais relevantes do que mortalidade, porque os efeitos nestes parâmetros aparecem a menores níveis de exposição”.

Sendo assim, no presente trabalho, o comportamento de fuga foi um *alvo fisiológico* mais relevante do que a mortalidade, devido à sua sensibilidade em detectar o glifosato. Enquanto a 7-d-LC₅₀ do glifosato para essa espécie foi 35,5 mg gli/g solo, o comportamento de fuga ocorreu até mesmo para a concentração de 5,12 mg gli/g solo, já após 1,5 hora do início do experimento. Além de ser muito sensível e de apresentar resposta rápida, o comportamento de fuga pôde ser observado através de experimentos de baixo custo.

Segundo Lopes *et al.* (2004), se as populações naturais têm a habilidade de fugir do ambiente contaminado antes que efeitos letais ou subletais ocorram, então o desaparecimento desses animais é equivalente à erradicação da população inteira. Isso demonstra a relevância ecológica de estudos sobre o comportamento de fuga dos organismos, pois testes onde os mesmos ficam confinados tornam os resultados distantes da realidade, nos casos em que a fuga seja provável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DROBNE, D., 1997, Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6): 1159-1164.
- KRAVITZ, M. J., LAMBERSON, J. O., FERRARO, S. P., SWARTZ, R. C., BOESE, B. L. & SPECHT, D., 1999, Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* to polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated, field-collected sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(6): 1232-1235.
- LOPES, I., BAIRD, D. J. & RIBEIRO, R., 2004, Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1702-1708.
- LOUREIRO, S., ROMBKE, J. & SOARES, A. M. V. M., 2002, Testes de resposta de evitamento: a capacidade de escolha de um solo com melhor qualidade. In: A. Duarte, T. R. Santos, A. Panteleitchouk & R. Prego (eds.), *Ecotoxicologia e remoção de poluentes: estudos na Península Ibérica*. Instituto Piaget, Lisboa, pp. 47-53.
- NIEMEYER, J. C., 2004, *Aspectos biológicos de Cubaris murina Brandt (Crustacea: Isopoda) em laboratório e seu uso em Ecotoxicologia: estudo da sensibilidade ao Glifosato*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento.
- ODENDAAL, J. P. & REINECKE, A. J., 1999, The toxicity of sublethal lead concentrations for the woodlouse, *Porcellio laevis* (Crustacea, Isopoda). *Biol. Fertil Soils*, 29: 146-151.
- SVECEVICIUS, G., 2001, Avoidance response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to heavy metal model mixtures: a comparison with acute toxicity tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 680-687.
- VAN STRAALLEN, N. M. & VAN RIJN, J. P., 1998, Ecotoxicological risk assessment of soil fauna recovery from pesticide application. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 154: 83-141.
- YEARLEY, R. B., LAZORCHAK, J. M. & GAST, L. C., 1996, The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1532-1537.
- ZAR, J. H., 1996, *Biostatistical analysis*. 3. ed. Prentice-Hall, Londres.