



## Efeitos na Biomassa de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) Expostos ao Solo com Glifosato em Laboratório

J. C. NIEMEYER,<sup>1\*</sup> D. VILAÇA<sup>2</sup> & E. M. DA-SILVA<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Universidade Católica de Salvador

### RESUMO

Os isópodos terrestres desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes, contribuindo para os primeiros processos de decomposição do folhicho. Neste trabalho, foram utilizados indivíduos oriundos de cultivo laboratorial do isópodo terrestre *Cubaris murina* em ensaios ecotoxicológicos, buscando-se avaliar sua sensibilidade ao glifosato através de efeitos na biomassa. As soluções contaminantes foram preparadas a partir do herbicida Roundup®. As concentrações nominais iniciais usadas foram 4,8; 9,6; 14,4; e 19,2 mg glifosato/g solo. Dez filhotes com 2 a 4 dias de vida foram expostos em cada tratamento e em um controle. Os tratamentos, em quadruplicata, receberam borrifadas de água destilada regularmente. Ao final de cinco semanas, os isópodos foram pesados, e o peso médio dos indivíduos de cada tratamento foi comparado com o controle, utilizando-se ANOVA. Diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) foram encontradas nos tratamentos com 14,4 e 19,2 mg glifosato/g solo nas duas vezes em que o experimento foi realizado. Efeitos na biomassa mostraram-se mais sensíveis do que a 7-d-LC<sub>50</sub> do glifosato para *C. murina* (35,5 mg gli/g solo).

*Palavras-chave:* ecotoxicologia, isopoda, glifosato, biomassa.

### ABSTRACT

#### Effects on biomass of *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) exposed to soil contaminated with glyphosate in laboratory studies

Terrestrial isopods play an important role in the cycling of nutrients, contributing to the first processes of litter decomposition. In this work, organisms of *Cubaris murina* from laboratory cultures were used in ecotoxicity tests, to assess their sensibility to glyphosate how it affects their biomass. The contaminant solutions were prepared by herbicide Roundup®. The initial nominal concentrations were 4.8, 9.6, 14.4 and 19.2 mg glyphosate/g soil. Ten offspring of 2 to 4 days old were exposed in each treatment and in one control. All the treatments, in quadruplicate, received regularly sprays of distilled water. After five weeks, the isopods were weighed, and the mean weight of the isopods of each treatment was compared to the control, using ANOVA. Significant differences in relation to control ( $p < 0.001$ ) were encountered on 14.4 and 19.2 mg gli/g soil in two repetitions of the experiment. Effects on biomass showed more sensibility than 7-d-LC<sub>50</sub> of glyphosate to *C. murina* (35.5 mg gli/g soil).

*Key words:* ecotoxicology, isopoda, glyphosate, biomass.

### INTRODUÇÃO

Alvos fisiológicos ou *endpoints* como sobrevivência, crescimento e reprodução são respostas mensuráveis a poluentes (Drobne, 1997). A mudança na massa do corpo é geralmente reconhecida como um sensível *alvo fisiológico* em estudos

de toxicidade com invertebrados (Odendaal & Reinecke, 1999), devido à relevância ecológica deste parâmetro.

Vários trabalhos vêm sendo realizados com isópodos terrestres, utilizando a biomassa ou reservas de energia dos organismos como resposta a substrato ou dieta contaminada. Khalil *et al.* (1995) constataram que o crescimento de *Porcellio*

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

*scaber* foi seriamente afetado pela exposição ao cádmio, através do alimento contaminado, por seis semanas.

Ainda sobre metais pesados, Odendaal & Reinecke (1999) estudaram os efeitos subletais do chumbo para o isópodo *Porcellio laevis* em experimentos que duraram oito semanas, tendo os resultados indicado que o chumbo afetou negativamente o peso dos isópodos.

Vink et al. (1995) demonstraram que a rota de exposição é de grande importância para a determinação de efeitos letais e subletais de pesticidas em isópodos. Usando três pesticidas (benomyl, carbofuran e diazinon), testando separadamente as vias de exposição *substrato* e *alimento* para o isópodo *Porcellionides pruinosus*, concluíram que foi mais crítica para o isópodo a exposição através do substrato do que através do alimento. Os valores para  $LC_{50}$  (concentração letal para 50% dos organismos) de benomyl e diazinon para o isópodo chegou a ser 25 vezes menor quando a via de exposição foi o substrato. Os autores explicam que o substrato pode ser uma rota de exposição mais crítica devido ao fato de ele geralmente conter menos matéria orgânica do que os itens alimentares. Sabe-se que substâncias tóxicas como pesticidas são menos disponíveis e menos tóxicas aos organismos onde há grande quantidade de matéria orgânica, devido à adsorção do pesticida a ela.

Estudando os efeitos subletais do organofosforado dimetoato para o isópodo terrestre *Porcellio scaber*, Fischer et al. (1997) observaram redução no crescimento e na taxa reprodutiva quando o produto foi misturado ao solo. Os isópodos ficaram expostos ao pesticida durante quatro semanas. O valor de  $EC_{50}$  (concentração de efeito para 50% dos organismos) do dimetoato para a taxa de crescimento foi em torno da metade da  $LC_{50}$ . O dimetoato foi mais tóxico a *P. scaber* quando misturado ao solo do que quando misturado à dieta. Como a cutícula de *Porcellio* sp. é constituída por 53-54% de água, embora traços de lipídios estejam presentes, a cutícula não forma efetiva barreira ao fluxo de água (Warburg, 1993), o que pode ser uma provável explicação para o fato de a exposição pelo solo contaminado (via absorção) ser mais crítica do que o alimento contaminado.

Estudos sobre a toxicidade de herbicidas já vêm sendo realizados com isópodos terrestres. Eijssackers (1991) concluiu que o isópodo *Philoscia muscorum* foi afetado por contato direto, ingestão de herbicida acumulado no folhíço e reduzida taxa de consumo devido aos herbicidas 2,4,5-T, amitrole e glifosato. Dependendo da combinação específica do folhíço e herbicida, isto pode afetar a fragmentação do folhíço, primeiro passo para a ciclagem da matéria orgânica na natureza.

Mohamed et al. (1992) constataram que a sobrevivência e o peso do isópodo *Hemilepistus reaumuri* foram adversamente afetados pelo glifosato em experimentos que duraram sete dias e cuja via de exposição foi o substrato.

Em ensaios ecotoxicológicos agudos, com duração de sete dias, o isópodo *Cubaris murina* apresentou grande resistência ao glifosato, cuja 7-d- $LC_{50}$  foi de 35,5 mg glifosato/g solo (Niemeyer, 2004). Devido à ausência de estudos sobre efeitos subletais em *Cubaris murina*, e pelo fato de os isópodos serem usados como representantes da fauna macrodecompositora do solo nos estudos sobre os efeitos de pesticidas em espécies não-alvo, buscou-se neste trabalho pesquisar os efeitos do glifosato, herbicida amplamente utilizado, sobre essa espécie de isópodos. Os alvos fisiológicos escolhidos foram biomassa (peso médio dos indivíduos em cada tratamento) e sobrevivência, após cinco semanas em solo contaminado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os isópodos utilizados nos testes vieram 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 estocado em sacos plásticos, mantido no laboratório e peneirado antes do uso.

Para observação de efeitos subletais do glifosato em *C. murina* e também da sobrevivência desses isópodos, as seguintes concentrações nominais iniciais foram utilizadas: controle (solo com água destilada), C1 (4,8 mg glifosato/g solo), C2 (9,6 mg glifosato/g solo), C3 (14,4 mg glifosato/g solo) e C4 (19,2 mg glifosato/g solo). Para obter a concentração nominal inicial desejada de glifosato no solo, as porções de solo foram peneiradas e pesadas. Após, foram contaminadas com soluções preparadas a partir do herbicida Roundup® e água destilada. A concentração nominal de glifosato no Roundup® é de 480 g/L.

Recipientes plásticos de 14 × 10 cm e 4 cm de altura receberam 1 cm de solo do respectivo tratamento. Dez organismos, com idade entre dois e quatro dias de vida, foram distribuídos aleatoriamente entre as quatro réplicas de cada tratamento. Utilizaram-se filhotes por se acreditar que nessa fase os indivíduos são mais sensíveis do que na fase adulta.

Os tratamentos receberam borrifadas diárias de água destilada para manter a umidade mínima necessária à sobrevivência dos isópodos. A principal fonte de alimento foi o próprio substrato, porque apenas semanalmente foi adicionada ração AlconBasic® ao teste para complementar a alimentação.

Após completar as cinco semanas, todos os indivíduos foram contados e pesados, e a média de peso dos indivíduos de cada concentração foi comparada ao controle e aos demais tratamentos, através da utilização da ANOVA, para verificar se as diferenças entre as médias de peso foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Devido à não homogeneidade das amostras,

apontada pelo teste de Bartlett, foi utilizada ANOVA não paramétrica com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 1996). Animais que morreram durante o experimento foram excluídos dos dados de peso, sendo a análise restrita aos animais que sobreviveram durante todo o experimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a pesagem dos indivíduos após cinco semanas nos diferentes tratamentos, pôde-se observar os efeitos do glifosato sobre o peso médio dos isópodos (Figura 1). Em todos os tratamentos, o peso médio foi menor do que no controle. Porém, apenas nas concentrações C3 e C4, que continham 14,4 e 19,2 mg gli/g solo, respectivamente, as diferenças em relação ao controle foram significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) também foram encontradas ao comparar essas concentrações com C1 e C2, que continham 4,8 e 9,6 mg gli/g solo, respectivamente. O experimento foi realizado duas vezes, e as mesmas diferenças foram encontradas.

A redução no crescimento pode ser resultado de evitação ao alimento (neste caso, ao substrato, que também serviu de alimento), conforme Vink *et al.* (1995), que constataram redução no consumo de alimento contaminado com pesticidas por *Porcellionides pruinosus*, através da quantidade de fezes gerada. Sugere-se que a palatabilidade do alimento possa ser afetada pelo pesticida.

Porém, a inanição pode não ser a única razão da redução do crescimento. Pode ter havido a ingestão do substrato contaminado ou, como sugerido por Fischer *et al.* (1997), pode haver a absorção do contaminante do substrato através da cutícula do isópodo. Donker (1992) sugere que os organismos usam energia para resistir ao contaminante, deixando menos

energia para o crescimento, podendo, assim, resistir por meio de evitação e/ou detoxificação, e ambos utilizam energia.

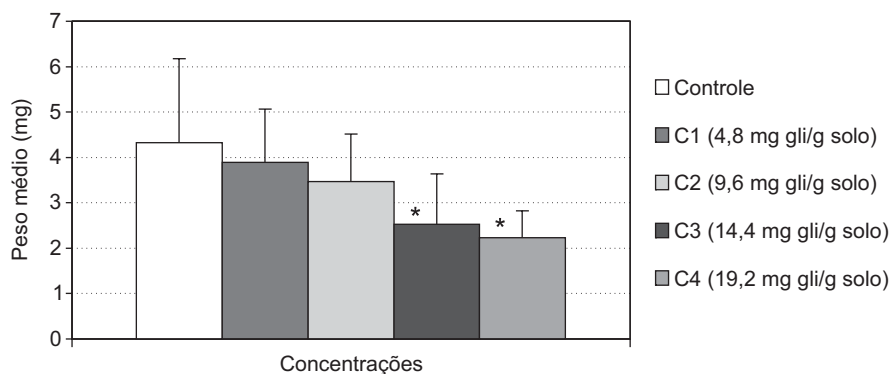
As variações de peso dos isópodos dentro de um mesmo tratamento e no controle refletem que a taxa de crescimento é muito variável mesmo entre os indivíduos de uma mesma espécie e com a mesma idade, como indicado por Drobne (1997), Odendaal & Reinecke (1999) e Staak *et al.* (1998).

Houve grande mortalidade no controle (Figura 2), e é bem provável que isso se deva à taxa normal de mortalidade entre os filhotes, já que foram utilizados organismos com idade entre dois e quatro dias de vida. A literatura sobre o assunto cita grande mortalidade entre os filhotes no primeiro mês de vida fora do marsúpio (Warburg, 1993).

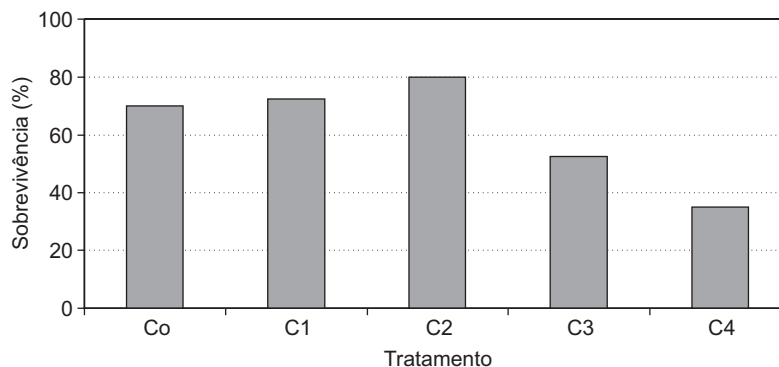
A partir dos resultados apresentados, foi possível constatar que a biomassa, após exposição prolongada em concentrações subletais, foi um *alvo fisiológico* bastante sensível ao glifosato, em relação aos testes agudos de curta duração. Todos os tratamentos apresentaram crescente diminuição do peso médio dos indivíduos à medida que a concentração do glifosato era maior no solo. Porém, diferenças significativas em relação ao controle foram encontradas apenas para as concentrações C3 e C4, contendo 14,4 e 19,2 mg gli/g solo, respectivamente; também apresentaram diferenças significativas em relação a C1 e C2 (4,8 e 9,6 mg gli/g solo, respectivamente).

Como houve grande mortalidade no controle (30%), recomenda-se a realização de ensaios com isópodos de mais idade, buscando-se evitar a mortalidade comum entre os filhotes.

Acredita-se que a biomassa seja um *alvo fisiológico* mais adequado para avaliação dos efeitos do glifosato em ensaios de longa duração com *Cubaris murina* do que a sobrevivência, apesar das variações de peso encontradas dentro dos tratamentos e já discutidas na literatura.



**Figura 1** — Peso médio dos indivíduos, após cinco semanas, nos diferentes tratamentos com glifosato. As barras indicam o desvio-padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) e em relação a C1 e C2 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2** — Porcentagem de sobrevivência dos isópodos após 5 semanas nos diferentes tratamentos: Co (controle), C1 (4,8 mg gli/g solo), C2 (9,6 mg gli/g solo), C3 (14,4 mg gli/g solo) e C4 (19,2 mg gli/g solo).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DONKER, M. H., 1992, Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal-polluted sites. *Funct. Ecol.*, 6: 445-454.
- DROBNE, D., 1997, Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6): 1159-1164.
- EIJSACKERS, H., 1991, Litter fragmentation by isopods as affected by herbicide application. *Netherlands Journal of Zoology*, 41(4): 277-303.
- FISCHER, E., FARKAS, S., HORNING, E. & PAST, T., 1997, Sublethal effects of an organophosphorous insecticide, dimethoate, on the isopod *Porcellio scaber* Latr. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116C(2): 161-166.
- KHALIL, M. A., DONKER, M. H. & VAN STRAALLEN, N. M. 1995. Long-term and short-term changes in the energy budget of *Porcellio scaber* Latreille (Crustacea) exposed to cadmium polluted food. *Eur. J. Soil Biol.*, 31(3): 163-172.
- MOHAMED, A. I., NAIR, G. A., ABBAS, H. L. & KASSAM, H. H., 1992, Effects of pesticides on the survival, growth and oxygen consumption of *Hemilepistus reaumuri* (Audouin & Savigny 1826) (Isopoda Oniscidea). *Tropical Zoology*, 5: 145-153.
- 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, Ecologia e Biomonitoramento, Universidade Federal da Bahia.
- 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.
- STAAK, A., FROST, M. & KRATZ, W., 1998, Ecotoxicological studies on the impact of the herbicide trifluralin on *Porcellio scaber* (Isopoda). *Applied Soil Ecology*, 9: 405-409.
- VINK, K., DEWI, L., BEDAUX, J. & TOMPOT, A., 1995, The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprotrophic isopods. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(7): 1225-1232.
- ZAR, J. H., 1996, *Biostatistical analysis*. 3. ed. Prentice-Hall, Londres.
- WARBURG, M. R., 1993, *Evolutionary biology of land isopods*. Springer-Verlag, Germany.