

EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP ORIGINAL® A BASE DE GLIFOSATO EM ORGANISMOS NÃO ALVO UTILIZANDO MODELO MESOCOSMO

Marina Andrada Maria*

Lisete Celina Lange**

Samuel Rodrigues Castro***

Rose Lílian Miranda****

Mônica Alves Mamão*****

RESUMO: Foram criados mesocosmos de lagoa para avaliação do efeito de glifosato a organismos não alvo, quando utilizado para o controle de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) e *Salvinia* sp., macrófitas aquáticas flutuantes. Foi utilizada a formulação comercial Roundup Original®. Avaliou-se o efeito sobre bactérias por meio de ensaios de determinação de coliformes totais, *Escherichia coli* e contagem de bactérias heterotróficas; sobre fitoplâncton e perifíton; e sobre caramujos e peixes. Ocorreram flutuações na comunidade bacteriana com rápido reestabelecimento, sem consequências consideráveis para a qualidade da água, por não causar alterações na comunidade geral, nem de patógenos. O fitoplâncton e perifíton apresentaram redução da riqueza de espécies e diversidade de Shannon, elevação da densidade de organismos, porém não significativas, e alterações na abundância relativa das famílias das espécies. Os peixes e caramujos ficaram por aproximadamente vinte dias sem reproduzir, a partir de quando voltaram a reproduzir e crescer. Os experimentos foram conduzidos com cobertura total de macrófitas no espelho d'água e mostraram que é possível o uso da formulação em ambientes com crescimento descontrolado de macrófitas aquáticas flutuantes, na concentração testada e com controle do processo de aspersão, sem causar efeito significativo aos organismos não alvo avaliados. As alterações não significativas podem ser potencializadas com o uso recorrente de

* Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, pesquisadora em Tecnologia do Centro de Inovação e Tecnologia SENAI FIEMG, Brasil. E-mail: mamaria@fiemg.com.br

** Doutora em Tecnologia Ambiental, professora Titular do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Brasil.

*** Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, professor Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora - ESA/UFJF, Brasil.

**** Especialista em Gerenciamento Municipal de Recursos Hídricos, consultora na empresa Sempre Viva Soluções Ambientais, Belo Horizonte, Brasil.

***** Mestre em Biodiversidade Tropical, analista de Tecnologia do Centro de Inovação e Tecnologia SENAI FIEMG, Brasil.

herbicidas, além da possibilidade de seleção de espécies resistentes dos organismos alvo.

PALAVRAS-CHAVE: Bactéria; Fitoplâncton; Glifosato; Organismos não alvo; Perifíton.

EFFECT OF GLYPHOSATE HERBICIDE ROUNDUP ORIGINAL® ON NON-TARGET ORGANISMS BY THE MESOCOSM MODEL

ABSTRACT: Lake mesocosms were established to evaluate the effect of glyphosate on non-target organisms for the control of the floating aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) and *Salvinia* sp. Roundup Original® was used. The effect on bacteria by assays was evaluated for the determination of total coliforms, *Escherichia coli* and heterotrophic bacteria counts on phytoplankton, periphyton, snails and fish. Fluctuations in the bacteria community occurred with rapid reestablishment, without any significant consequences for water quality not to cause any alteration in the community, not even to pathogens. Phytoplankton and periphyton showed a decrease in species richness and Shannon diversity, no significant increase in the density of organisms and changes in the relative abundance of species families. Fish and snails did not reproduce during approximately 20 days, after which they reproduced and grew. Assays were conducted with complete macrophyte coverage and revealed that the use of the formula in environments with uncontrolled growth of floating aquatic macrophytes, in the tested concentration and with aspersion control, without causing a significant effect on the non-target organisms under analysis. Non-significant alterations may be enhanced by herbicides and the possibility of the selection of species resistant to target organisms.

KEY WORDS: Bacteria; Phytoplankton; Glyphosate; Non-target organisms; Periphyton.

INTRODUÇÃO

Macrófitas aquáticas são vegetais que vivem em corpos de água, podendo ser submersas ou flutuantes, muitas vezes de rápida proliferação, apresentando grande capacidade de adaptação ecológica. Este fato possibilita que a mesma espécie colonize os mais diferentes tipos de ambientes, o que facilita a sua ampla distribuição geográfica, sendo considerada, de um modo geral, cosmopolita (TRINDADE *et al.*, 2010).

O controle de macrófitas em reservatórios é de grande relevância econômica devido aos inúmeros prejuízos à geração de energia em várias usinas hidroelétricas brasileiras. A forma mais comum de controle é a retirada manual e mecanizada, o que gera elevado custo, com resultados nem sempre satisfatórios. Atualmente, são utilizados três métodos de controle: mecânicos, químicos e biológicos. Os métodos químicos são os menos aceitos pela sociedade, por utilizarem substâncias, tais como agrotóxicos, cuja toxicidade a diferentes espécies e ao próprio homem nem sempre é inteiramente conhecida.

Em 16 de julho de 2015 foi publicada a Resolução nº 467 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que dispõe sobre critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou contaminantes em corpos hídricos superficiais e estabelece que deve ser apresentada análise detalhada dos riscos da intervenção pretendida considerando as peculiaridades do ambiente aquático, os múltiplos usos de seus recursos assim como os meios de gerenciamento desses riscos, precauções de uso da água, medidas de segurança e indicação dos períodos de carência e possíveis efeitos do tratamento pretendido sobre os usos da água.

Segundo Levis e Johnson (2015), herbicidas a base de glifosato são os mais utilizados nos Estados Unidos e são comumente usados em todo o mundo. Compreender os efeitos dos herbicidas a base de glifosato sobre os organismos não alvo é crítico para a avaliação dos regulamentos relativos à utilização de tais herbicidas. Segundo Yusof (2014), o glifosato apesar de globalmente utilizado, aponta que são escassas informações sobre a sua toxicidade para o ecossistema aquático.

O glifosato é um fosfonato, uma classe de compostos que são estruturalmente similares aos organofosforados. É amplamente utilizado como herbicida, sendo considerado um composto menos tóxico que os demais herbicidas, por ser eliminado sem ser metabolizado, por não ser residual e não há evidências de bioacúmulo em tecidos animais (BAIRD; CANN, 2011). Inibe a enzima 5-endpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSP), que sintetiza os aminoácidos aromáticos, interrompe a biossíntese dos aminoácidos aromáticos, reduzindo assim a síntese de proteína e o crescimento, e eventualmente, provocar a perturbação celular e morte (FORLANIA *et*

al., 1999). A via shikimato não é presente em animais e, desta forma, não apresenta ameaça à fauna. Sua tendência é permanecer adsorvido no solo, apesar de apresentar alta solubilidade em água (BAIRD; CANN, 2011).

Segundo Fiori *et al.* (2012), embora se acredite que o glifosato seja inofensivo para organismos não alvo, as formulações comerciais podem ter aditivos que afetem não só as plantas, mas também os animais e microrganismos aquáticos e terrestres, podendo causar outros efeitos nos corpos de água, incluindo alterações da dinâmica populacional da comunidade microbiana, efeitos negativos em organismos aquáticos, principalmente filtradores, tais como crustáceos e moluscos e organismos que se alimentam de sedimento (peixes e anfíbios). De Lorenzo *et al.* (1999) acreditam que o efeito de pesticidas é em nível ecológico no ecossistema aquático, ao alterar a cadeia alimentar, uma vez que o impacto na comunidade microbiana pode interferir na ciclagem e transferência de nutrientes para os demais níveis tróficos.

Há uma crescente preocupação sobre o impacto dos herbicidas a base de glifosato sobre o meio ambiente, sendo necessária a realização de trabalhos para avaliação da exposição da fauna e flora em ambientes com diferentes concentrações de herbicida a base de glifosato, a longo tempo de exposição (ROCHA *et al.*, 2015).

A influência causada em organismos não alvo e qualidade da água, frente à utilização de herbicidas nas práticas agrícolas, vem sendo debatida e avaliada por diversos autores. Vera *et al.* (2010) relatam a modificação da estrutura e funcionalidade dos ecossistemas de água doce, atribuindo efeito toxicológico do Roundup pela redução do crescimento do perifíton em áreas afetadas.

Pesce (2009) detectou efeitos sobre a composição da comunidade de algas apenas nas amostras coletadas no verão, demonstrando que o efeito pode ser sazonal. Este trabalho relata efeito limitado e variável.

Pizarro *et al.* (2016), em um experimento de vinte e cinco dias usando mesocosmos, observaram que a adição do glifosato levou a baixos valores de turbidez e diminuiu significativamente a abundância fitoplanctônica.

Vera e colaboradores (2012) relataram em uma única aplicação de glifosato em corpos d'água temporários uma rápida estimulação de bacterioplâncton e cianobactérias picoplanctônicas, bem como a elevação da concentração de clorofila na coluna de água, que, além de acelerar a eutrofização do sistema, elevou a

disponibilização de nutrientes, aumentando a abundância de rotíferos. Neste cenário, aplicações de uso intensivo e repetidos de herbicidas rapidamente promovem mudanças profundas nesses corpos d'água, podendo acarretar a diminuição da qualidade da água.

Segundo Santos (2012), a forma mais comum de degradação do glifosato é pela ação das bactérias que fazem a clivagem da ligação fósforo-carbono formando sarcosina ou a sua clivagem pela oxidação da ligação carbono-nitrogênio produzindo o AMPA, que é bem mais resistente, mas pode ser quebrado em metilamina, pelo rompimento da ligação fósforo-carbono, que também pode ser degradada em formaldeído. Sedimentos desempenham um papel fundamental na degradação microbiana de glifosato tanto por meio da via sarcosina quanto pela AMPA (WANG, 2016).

A comunidade microbiana muitas vezes fica negligenciada, mas ela contribui extensivamente para a atenuação, mineralização e transformação dos contaminantes orgânicos no ambiente (FIORI *et al.*, 2012). O tempo de residência do contaminante no ambiente pode ser variável de acordo com a comunidade microbiana, assim como a mesma passa a ser alterada com a presença do contaminante, sendo também um organismo não alvo que pode ser significativamente afetado.

Devido à complexidade do tema, considerando a composição química e variações físico-químicas do glifosato e interações moleculares no ambiente, faz-se necessária a realização de estudos que mimetizem as condições naturais. Por este motivo foram conduzidos experimentos em mesocosmos em condição de crescimento descontrolado de macrófitas aquáticas flutuantes, que foram controladas com glifosato a fim de avaliar o efeito às comunidades microbiana, fitoplanctônica, perifítica, íctica e bentônica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 EXPERIMENTAÇÃO EM MESOCOSMOS

Foram desenvolvidos mesocosmos de lagoa para avaliação do controle de indivíduos da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) e *Salvinia* sp., macrófitas aquáticas flutuantes, utilizando a formulação Roundup Original®, a base de glifosato.

Os mesocosmos foram construídos de forma padronizada e simulando a lagoa ocorrente na coordenada geográfica 19°53'15.702''S 43°54'57.906''O, com características iniciais de pH = 7,6, OD = 7,8 mg.L⁻¹ e condutividade de 89,5 µScm⁻¹, onde foi coletado para cada aquário 35 litros de água e 4 quilos de sedimento, formando uma coluna com 2 cm de sedimento e 20 cm de coluna d'água, com altura total de 22 cm, além de 10 indivíduos de peixes do gênero *Poecilia*.

Foram acrescentados ainda 8 indivíduos com massa média de 70 g cada e total de 560 g de *E. crassipes* ou 300 g de *Salvinia* sp. por aquário, além de 10 caramujos e 10 peixes *Danio rerio*, a fim de se aproximar ao máximo a realidade de um ecossistema lacustre (Tabela 1). Os aquários foram cobertos lateralmente e mantidos em laboratório controlado, com temperatura de 23 ± 2 °C e luminosidade média de 3000 lux com foto período de 16 horas claro e 8 horas escuro.

Tabela 1. Constituintes de cada mesocosmos

Água	Sedimento	<i>Salvinia</i> sp.	<i>E. crassipes</i>	Peixes	Caramujo
35 L (20 cm de altura)	4 kg (2 cm de altura)	300 g	8 indivíduos de aproximadamente 70 g cada (total 560 g)	10 <i>D. rerio</i> 10 <i>Poecilia</i>	10 organismos

Os experimentos foram montados em réplica para cada uma das espécies de macrófitas e controle e mantidos em estabilização por quinze dias, quando foi aplicada a dose única de Roundup Original® na concentração de 100 L.ha⁻¹ (1,8 mL por aquário). Após a aplicação o experimento foi monitorado por vinte dias e observado por mais trinta dias.

Em cada um dos aquários, foram suspensas por fio de *nylon* 8 (oito) lâminas de vidro nas dimensões de 26 x 76 mm, funcionando como substrato para avaliação da comunidade perifítica.

A cada cinco dias foi retirada uma amostra de água e ao final dos vinte dias foi retirada uma amostra de sedimento de cada aquário, para a realização dos ensaios microbiológicos. Amostras de fitoplâncton foram coletadas antes da aplicação do herbicida e ao final do experimento, já as de perifíton foram coletadas ao final do experimento.

Realizou-se a quantificação de glifosato a cada cinco dias, por meio de cromatografia iônica, utilizando um cromatógrafo da marca Metrohm, modelo 850 Professional IC com amostrador 850, utilizando um dozino para permitir o sistema de gradiente automático.

2.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Foram realizadas quantificações da carga de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Echerichia coli*, antes da administração do herbicida e nas coletas sequenciais à administração em intervalo de cinco dias. Também foram ensaiadas amostras do extrato solubilizado do sedimento, antes e após a finalização do experimento.

Para determinação da carga bacteriana foi utilizado procedimento metodológico de contagem em placa, conforme SMEWW 9215, considerando as unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na amostra sob análise. A técnica de semeadura utilizada foi a de profundidade, onde se distribui alíquotas da amostra ou das diluições escolhidas em placas de petri estéreis, acrescentando 15 a 20 mL de Agar Padrão de Contagem de bactérias (PCA), homogeneizando em movimentos na forma de 8, deixando solidificar e incubando a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 ± 4 horas.

Foi realizada a quantificação de *E. coli* e coliformes totais pela metodologia de substrato cromogênico, conforme SMEWW 9223 A e B. Esse ensaio foi realizado utilizando-se o substrato da marca Colitag™ e iMONplate™ - 1600, placa para contagem de número mais provável (NMP).

2.3 AVALIAÇÃO FITOPLANCTÔNICA E PERIFÍTICA

A avaliação do fitoplâncton foi realizada nas amostras coletadas nos mesocosmos antes da aplicação do herbicida e ao final do experimento. Já o perifíton foi removido do substrato artificial utilizado, ao final do experimento, tendo como comparação o controle experimental.

As amostras quantitativas para fitoplâncton foram coletadas diretamente com frasco âmbar de 500 mL na superfície e fixadas com solução de lugol acético 5%.

O perifíton foi fracionado em amostras para avaliação quantitativa e qualitativa, fixadas com Lugol acético 5% e formol 4%, respectivamente.

As amostras foram sedimentadas, de acordo com Uthermöl (1958) e as algas foram contadas através de campos aleatórios (Uehlinger, 1964) até 100 indivíduos da espécie predominante, garantindo erro de $\pm 20\%$ para um intervalo de confiança de 95% (Lund *et al.*, 1958). Os cálculos de densidade foram feitos conforme Weber (1973).

Os organismos encontrados foram identificados até o menor nível taxonômico possível, com auxílio de bibliografia especializada.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A maior concentração de glifosato quantificada nos mesocosmos foi de 38,65 mg.L⁻¹ medida no dia em que foi realizada a aplicação do herbicida. As concentrações médias de glifosato no 1º, 5º, 10º, 15º e 20º dias após a aplicação foram de 19,31; 11,79; 6,68; 4,67; e 3,66 mg.L⁻¹, respectivamente.

A água utilizada nos mesocosmos possuía concentração de coliformes totais superior a 1600 NMP.100 mL⁻¹ e essa concentração apresentou pequenas oscilações, não significativas, ao longo do experimento, este sob a influência do tratamento com herbicida (*Kruskal-Wallis* $p = 1,00$).

A carga de *Escherichia coli* inicial era baixa, média de 7 NMP.100 mL⁻¹, e esta contaminação deixou de existir com o passar dos dias, ocorrendo diferença significativa entre as amostras iniciais e finais (*Kruskal-Wallis* $p = 0,014$), não sendo esta diferença influenciada pelo tratamento com o herbicida pelo fato de ocorrer

de forma equivalente no experimento controle e tratado (Figura 1-A). A população de *E. coli* em ambientes aquáticos se deve, principalmente, à contaminação fecal, assim, utilizando o modelo mesocosmo, já era esperado o decréscimo da carga desta bactéria, devido a eliminação da fonte de contaminação.

O mesmo acontece com as bactérias heterotróficas. Ocorreu redução de bactérias a partir do décimo dia de experimento, apresentando diferença significativa entre os experimentos iniciais e finais (*Kruskal-Wallis* $p = 0,018$), não sendo em decorrência do tratamento com o herbicida pelo fato de ocorrer de forma equivalente no experimento controle e tratado (Figura 1-B).

Os resultados encontrados podem ter ocorrido pelo fato do modelo experimental de microcosmo ser um ecossistema isolado, isto é, sem fluxo de entrada ou saída de água bruta como fonte de entrada de populações microbianas.

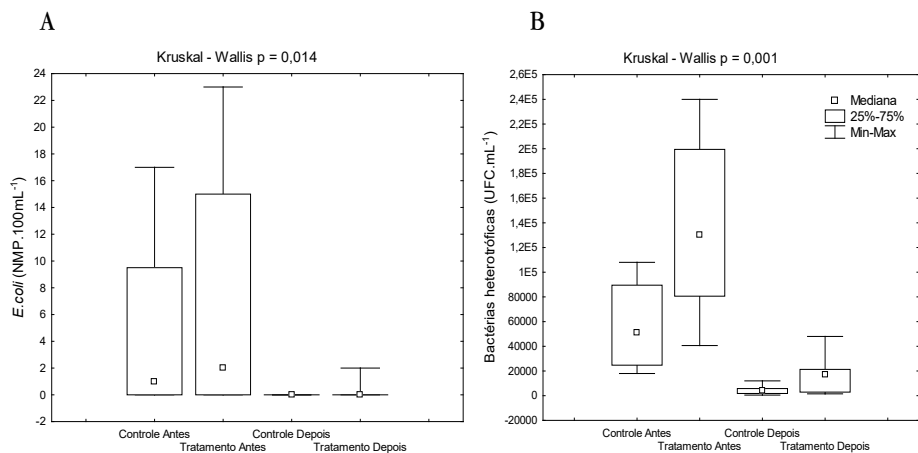


Figura 1.- Box-plot e teste de *Kruskal-Wallis* para comparação dos resultados dos ensaios de *E.coli* (A) e Bactérias heterotróficas (B)

Não foram evidenciadas alterações significativas na comunidade bacteriana do sedimento, visto pelos resultados dos ensaios de contagem de bactérias heterotróficas antes da aplicação e ao final do experimento (*Kruskal-Wallis* $p = 1,00$). No entanto, na contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água foi possível observar o predomínio de bactérias, com células mais homogêneas e características, com diferente coloração, nas amostras coletadas após cinco

dias, sendo normalizado até o décimo quinto dia. Esta ocorrência pode refletir uma alteração momentânea do ambiente, que levou à homogeneidade biótica, selecionando espécies mais resistentes ou mais efetivas na degradação do glifosato (Figura 2).

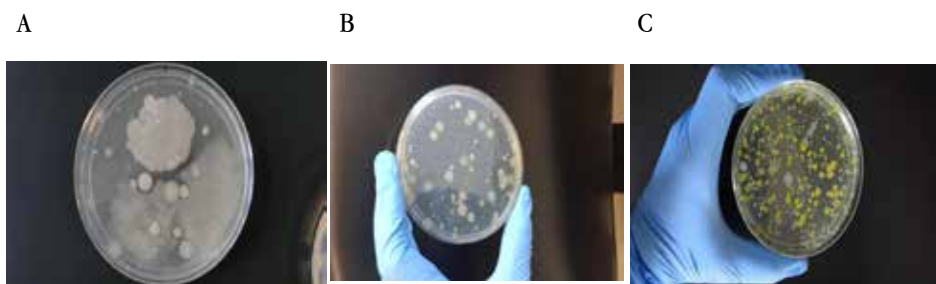


Figura 2. Contagem de bactérias heterotróficas: sedimento (A), água antes da aplicação (B) e na água após aplicação (C)

Para a comunidade fitoplanctônica, ocorreu diferença significativa para a riqueza e a diversidade antes e após o tratamento, no entanto, a diferença ocorreu também para o experimento controle, havendo redução da riqueza e elevação da densidade. Apesar da diferença na estrutura da comunidade fitoplanctônica ter sido mais variável para o aquário tratado, essa diferença é resposta ao tempo de experimento e não pelo tratamento com o herbicida, pelo fato de ocorrer de forma equivalente no experimento controle e tratado (Figura 3).

Esse padrão, observado para *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fitoplâncton, de diferenciação da comunidade entre o início e final do experimento e de ausência de diferença significativa entre tratamento e controle, pode ser resposta de variações ambientais ocorridas nos aquários desde sua implementação até o final do experimento. Assim, essas comunidades são mais afetadas por causas ambientais do que pelo herbicida. Sullivan *et al.* (1981) concluíram que a comunidade fitoplanctônica sobre efeito do glifosato foi determinada, principalmente, pelo efeito do habitat e sazonalidade.

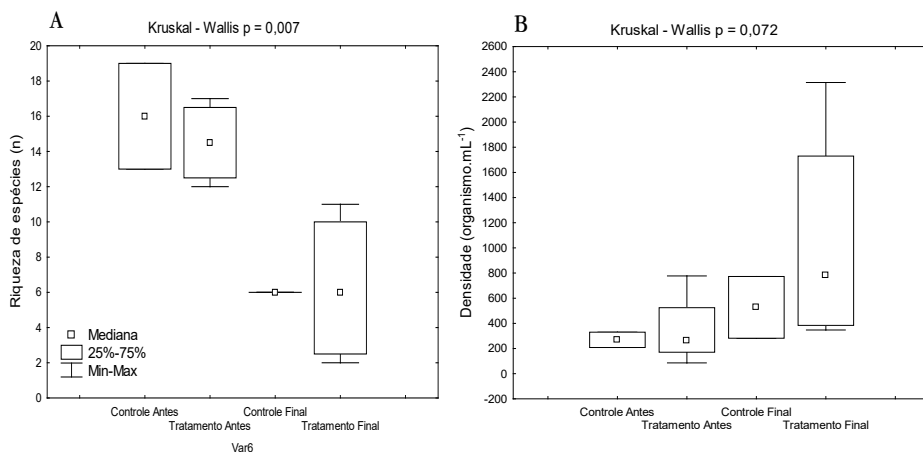


Figura 3. Box-plot e teste de Kruskal-Wallis para comparação da riqueza de espécies (A) e densidade (B) encontrada nas amostras de fitoplâncton

A diversidade de *Shannon* não apresentou diferença significativa, mas foi reduzida com o tempo de experimento, afetando de forma similar os aquários controle e experimento (*Kruskal-Wallis* p = 0,262).

Ao correlacionar a densidade das famílias encontradas nos experimentos controle e tratamento para *Salvinia* sp. e *E. crassipes* antes e ao final do experimento observa-se relação inversa entre o controle inicial e o tratamento final de *Salvinia* sp. (-0,09); controle inicial e tratamento final de *E. crassipes* (-0,03); tratamento final de *Salvinia* sp. e *E. crassipes* (-0,01), e relação direta significativa entre: controle e tratamento de *Salvinia* sp. antes da aplicação (0,81); controle e tratamento de *E. crassipes* antes da aplicação (0,83); controle de *Salvinia* sp. e *E. crassipes* ao final do experimento (0,89) e controle de *E. crassipes* antes da aplicação e ao final do experimento (0,79).

Esses resultados mostram que os mesocosmos responderam bem ao objetivo do estudo com boa estabilidade, de forma que os experimentos possuíam elevada correlação antes do tratamento com herbicida, passando a diferenciar-se ao final do estudo, o que pode ser evidenciado pelo gráfico de abundância relativa das famílias (Figura 4).

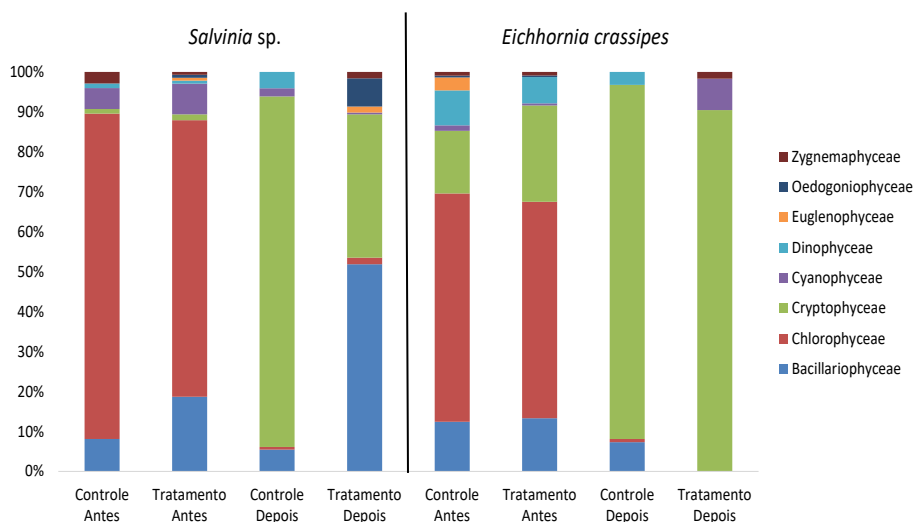


Figura 4. Abundância relativa das famílias fitoplanctônicas encontradas nas amostras.

Pode-se perceber diferença entre o início e o final do experimento para a abundância relativa das famílias fitoplanctônicas, houve redução e até mesmo eliminação de Chlorophyceae, que teve sua predominância substituída, principalmente, por Cryptophyceae. As espécies pertencentes à família Cryptophyceae possuem a vantagem adaptativa de possuírem flagelos, o que lhes possibilita seu posicionamento na coluna d'água em condições luminosas e nutricionais ideais (JANSSON *et al.*, 1996). Além disso, as diferentes condições tróficas encontradas no início e final do experimento podem ter favorecido as Cryptophyceae, uma vez que ocorrem com frequência em ambientes com elevada trofia (BICUDO *et al.*, 2009), tendo sido observado o aumento da abundância dessa família em experimentos de mesotrofia (CROSSETI; BICUDO, 2005).

Masini *et al.* (2009) demonstraram alteração no crescimento de duas algas fitoplanctônicas a partir de concentração de 50 mg.L⁻¹ de glifosato. Como a maior concentração de glifosato detectada nesse trabalho foi de 38,65 mg.L⁻¹, pode justificar a ausência de diferença entre controle e tratamento na estrutura da comunidade fitoplanctônica - riqueza, densidade e diversidade. Contrariamente, o estudo de Haberkorn *et al.* (2008) em microcosmo demonstrou que o fitoplâncton marinho

foi afetado com uma concentração de apenas 0,001 mg.L⁻¹ de glifosato. Isso indica que o efeito do glifosato pode ser espécie-específico. Além disso, alguns estudos têm apontado influência do glifosato somente no picoplâncton (PÉREZ *et al.*, 2007; VERA *et al.*, 2012) que são espécies pertencentes à comunidade fitoplanctônica mas de tamanho reduzido (< 2µm), possuindo assim rápida resposta a impactos (REYNOLDS, 2006).

Como pode ser visto na Figura 5, a comunidade perifítica não teve grandes variações na riqueza de espécies em decorrência do tratamento, manteve as medianas dos controles e tratamentos equivalentes muito próximas, não apresentando diferença significativa (*Kruskal-Wallis* p = 0,112). Já a densidade foi maior nas amostras dos mesocosmos tratados com herbicidas, no entanto esta diferença não foi significativa (*Kruskal-Wallis* p = 0,393).

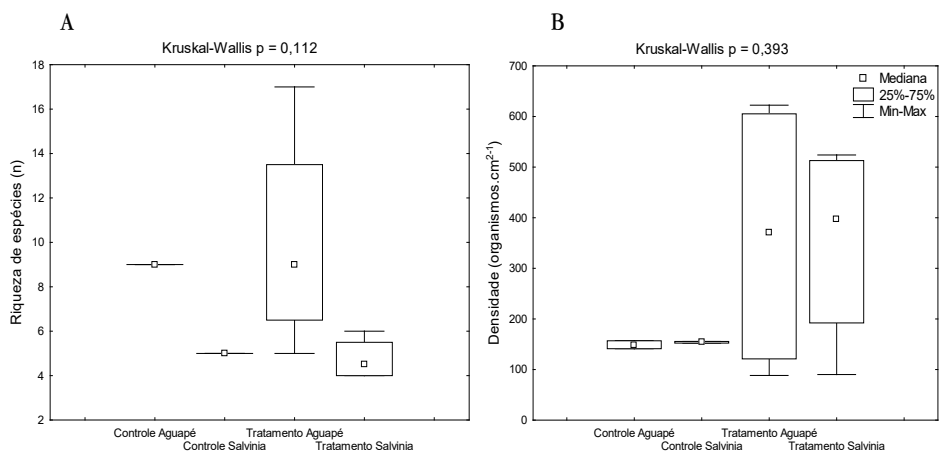


Figura 5. Box-plot e teste de Kruskal-Wallis para comparação da riqueza de espécies (A) e densidade (B) encontrada nas amostras de perifiton

Por sua vez, a diversidade apresentou diferença significativa (p = 0,007), porém entre os tratamentos e não entre o controle e o tratamento, explicitando que o tratamento de *E. crassipes* apresentou diversidade significativamente maior que de *Salvinia* sp. (Figura 6). Nos experimentos com *E. crassipes* foi visível o surgimento do perifiton após a morte das macrófitas, assim como foi possível evidenciar alteração na abundância de outros grupos vegetais que passaram a ser mais predominantes no

ambiente. Alterações ambientais podem levar a predominância de diferentes espécies que coexistem e que passam a crescer com o decréscimo da outra. Com o início da morte dos aguapés, abriu-se uma clareira no espelho d'água que possibilitou o crescimento de perifiton aderido à macrófita e de macrófitas menores, como a do gênero *Lemna*, que são inclusive utilizadas como organismos teste em ensaios ecotoxicológicos. Esse aumento da luminosidade pode também ter favorecido a comunidade perifítica, aderida às lâminas, dos aquários com *E. crassipes*, levando assim ao aumento da diversidade. O efeito do Roundup sobre a composição algal pode ser observado tardiamente, indiretamente, devido ao efeito no ambiente em torno, por exemplo, com a desfoliação ocasionada pelo herbicida, haverá aumento da luminosidade e temperatura da água (SULLIVAN *et al.*, 1981).

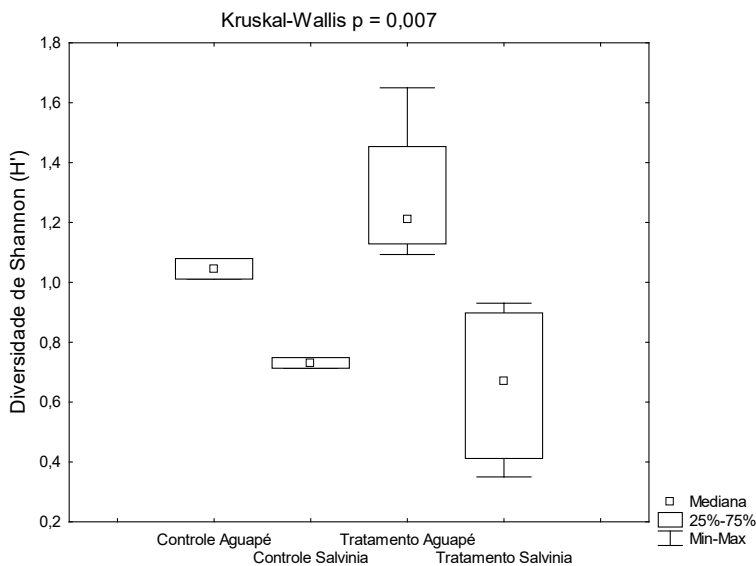


Figura 6. Box-plot e teste de *Kruskal-Wallis* para comparação da Diversidade de Shannon encontrada nas amostras de perifiton

A Figura 7 apresenta o gráfico de abundância relativa das famílias de perifiton encontradas nas amostras analisadas, o que confirma e evidencia a elevação da diversidade nos experimentos após o tratamento com herbicida, principalmente nos mesocosmos de *E. crassipes*. Observa-se menor frequência de Bacillariophyceae

(diatomáceas) nos aquários tratados com herbicida, dando espaço a diferentes famílias. Fiori e Pistocchi (2014), em laboratório, perceberam diminuição no crescimento e atividade fotossintética de uma espécie de Bacillariophyceae sobre efeito de herbicida. Já em um outro experimento (WANG, 2016b), observou-se resposta de diferentes de espécies de Bacillariophyceae, algumas responderam ao glifosato com crescimento da população enquanto para outras o glifosato foi tóxico. Dessa forma, o efeito do glifosato parece ser espécie-específico.

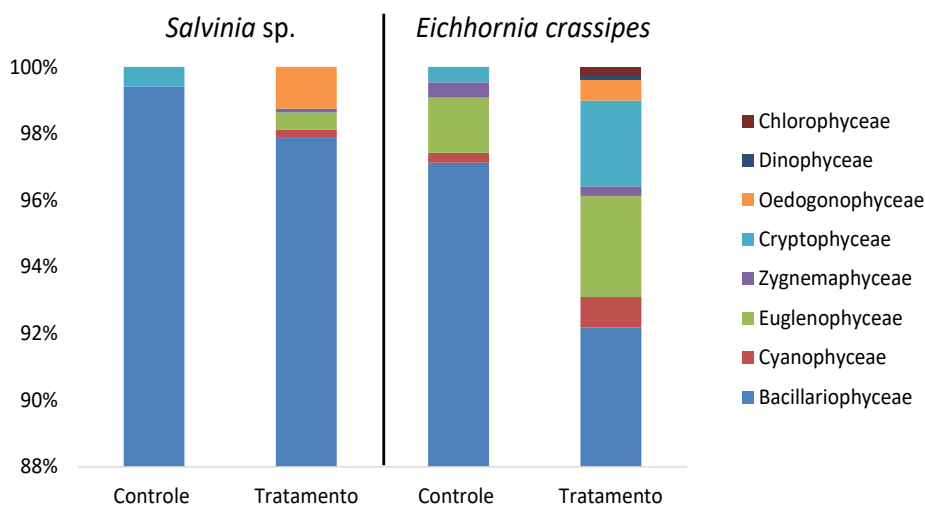


Figura 7. Abundância relativa das famílias perifíticas encontradas nas amostras.

Durante os 20 dias de experimento não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos peixes (*D. rerio* e *Poecilia* sp.) e moluscos, assim como não houve reprodução e a taxa de mortalidade foi relativamente baixa ($\leq 20\%$), equivalente ao controle. Durante os dias seguintes de observação ambos os grupos voltaram a reproduzir e após 50 dias foram identificados indivíduos de diferentes faixas etárias. Esse resultado corrobora com os estudos de Silva *et al.* (2014) que reportam efeitos nocivos à reprodução de *D. rerio*, porém, há indicativos de que esse efeito é reversível. Há de se considerar, ainda, a necessidade de avaliação do surgimento de mutações ou má formações a longo prazo.

O efeito do glifosato em um nível trófico acarretará mudança em todos os outros. No entanto, o que pode se perceber nesse estudo sob efeito de glifosato, foi que não houve alteração de densidade no nível trófico primário assim como não se detectou toxicidade em predadores e grandes alterações nas bactérias decompositoras. Dessa forma, além do efeito do glifosato ser fraco no uso pontual, baixa aplicação, seu efeito pode ter sido mais indireto com alteração da composição físico-química da água.

Ao avaliarmos os dados físico-químicos conjuntamente com os biológicos para os experimentos tratados com glifosato, foi possível observar por meio de teste de correlação de *Spearman* e observado pela análise de componentes principais que o glifosato é diretamente relacionado com a riqueza (0,80) e diversidade (0,40) de fitoplâncton e inversamente à densidade de fitoplâncton (-0,20), cloreto (-0,60), nitrato (-0,21) e sulfato (-0,65). Os referidos ânions, por sua vez, apresentam correlação inversa com a diversidade e riqueza de perifíton. As bactérias heterotróficas apresentam correlação inversa à densidade (-0,62), riqueza (-0,57) e diversidade (-0,55) perifítica. A densidade de fitoplâncton e perifíton apresentam perfil semelhante, com correlação inversa a temperatura da água, condutividade, bactérias (*E. coli* e heterotróficas), riqueza e diversidade do próprio grupo (fitoplâncton ou perifíton), cloreto e fosfato, sem, no entanto, correlações diretas com o glifosato. Já a turbidez apresenta correlação inversa para as densidades de fitoplâncton e perifíton e correlação direta para riqueza e diversidade.

Esses resultados mostram que a presença de glifosato eleva a riqueza e diversidade e reduzem a densidade de fitoplâncton, enquanto que o glifosato não apresentou correlação relevante para riqueza e densidade de perifíton, com a diversidade correlacionada positivamente. O cloreto, nitrato e sulfato formaram correlação inversa ao glifosato, enquanto que o fosfato não apresenta correlação representativa, assim como para *E. coli* e bactérias heterotróficas. Os ânions são decorrentes da dissociação da formulação comercial (glifosato e ingrediente inerte), por isso as correlações são inversas ou fracas em alguns casos. A correlação inversa com as densidades de fitoplâncton e perifíton evidenciam que o herbicida pode indiretamente favorecer o crescimento dessas comunidades devido ao incremento de nutrientes por meio da sua dissociação.

O efeito do glifosato pode ser atribuído desde a mudança na concentração de nutrientes até a mudança nas relações ecológicas entre esses organismos como competição por recursos ou predação por organismos eucariontes heterotróficos (HABERKORN *et al.*, 2008). Por isso, estudos que avaliem o efeito do glifosato em nível de comunidade, nas interações que ocorrem em cadeias alimentares, podem detectar os efeitos indiretos e diretos sobre os organismos não alvo (RELYEA, 2005).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito sobre os organismos não alvo avaliados neste estudo foram sutis, sem grande relevância ecológica. Evidenciou-se para as bactérias reduções sem significativa relação com o tratamento com herbicida devido à redução concomitante do experimento controle. O mesmo ocorreu para *E. coli*, o que sinaliza o baixo risco de elevação de patógenos ou redução da qualidade da água referente à microbiota em decorrência da utilização de glifosato para controle de macrófitas aquáticas. No entanto observou-se uma possível seleção de bactérias específicas, que se sobrepuseram às outras espécies por um curto período de tempo.

Para o fitoplâncton foi possível observar variação na abundância relativa das famílias, tendo havido uma alteração entre as porcentagens e famílias presentes no ambiente após o tratamento com herbicida, sem diferenças significativas relevantes para os dados de riqueza, densidade e diversidade. Já o perifíton, apesar de não significativo, teve uma elevação na densidade de organismos, além da alteração das abundâncias relativas das famílias. Pode ter havido um efeito na redução de reprodução de moluscos e peixes, que foi então recuperado com o passar do tempo da exposição ao herbicida.

A diferença encontrada na comunidade fitoplanctônica, perifítica e microbiológica, demonstra que o glifosato pode apresentar um efeito indireto na comunidade aquática que pode levar à uma reorganização da comunidade. Desta forma, o principal impacto está na alteração sutil das comunidades, com processos básicos de ciclagem de nutrientes, devido à dissociação do herbicida, com incremento de nutrientes e concomitante elevação de densidade de organismos planctônicos.

Essas alterações podem se tornar representativas com o uso recorrente do herbicida, podendo levar a alterações nos ecossistemas, com alteração das comunidades biológicas não alvo e resistência dos organismos alvo. No entanto, usos isolados e esporádicos parecem não levar a impactos significativos, sendo fundamental a percepção de que esses resultados foram em decorrência do uso do herbicida em uma área totalmente coberta por macrófitas, o que funciona como uma barreira que retém parte do princípio ativo e principalmente do surfactante presente na sua formulação, reduzindo o efeito tóxico da porção que atinge o corpo hídrico.

Desta forma, é possível o uso do glifosato em ambientes com crescimento descontrolado de macrófitas aquáticas flutuantes, em um curto prazo, em concentração controlada e controle no processo de aspersão, sem causar efeito significativo aos organismos não alvo avaliados nesse estudo.

REFERÊNCIAS

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. Tradução: Marco Tadeu Grassi. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844p.

BICUDO, C. E. de M.; FERRAGUT, C.; MASSAGARDI, M. R. Cryptophyceae population dynamics in an oligo-mesotrophic reservoir (Ninféias pond) in São Paulo, southeast Brazil. **Hoehnea** [online], v. 36, n. 1, 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução nº 467 de 16 de julho de 2015**. Dispõe sobre critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou contaminantes em corpos hídricos superficiais. 2015.

CROSSETTI, L. O.; BICUDO, C. E. M. Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, Brazil. **Hydrobiologia**, p. 541-571, 2005.

DELORENZO, M. E.; SCOTT, G. I.; ROSS, P. E. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endsulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial

food web. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 2824-2835, 1999.

FIORI, E. D.; PIZARRO, H.; AFONSO, M. dos S.; CATALDO, D. Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, p. 106-113, 2012.

FIORI, E.; PISTOCCHI, R. Skeletonema marinoi (Bacillariophyceae) sensitivity to herbicides and effects of temperature increase on cellular responses to terbuthylazine exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 112-120, 2014.

FORLANIA, G.; MANGIAGALLIA, A.; NIELSENA, E.; SUARDIB, C. M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 991-999, 1999.

HABERKORN, S. S.; BECKERB, B.; MARIEC, D.; HABERKORN, H.; COROLLERA L.; BROISEA, D. de la. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 232-241, 2008.

JANSSON, M.; BLOMQUIST, P.; JONSSON, A.; BERGSTRÖM, A. K. Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örträsket. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 7, p. 1552-1559, 1996.

LEVIS, N. A.; JOHNSON, J. R. Level of UV-B radiation influences the effects of glyphosate-based herbicide on the spotted salamander. **Ecotoxicology**, v. 24, p. 1073-1086, 2015.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LE-CREN, D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimation by counting. **Hydrobiologia**, v. 11, p. 143-170, 1958.

MASINI, M. R.; COLOMBO, S. de M.; MASINI, J. C. Influência do Glifosato no crescimento e fluorescência fotossintética das microalgas *Phaeodactylum tricorutum*

e *Tetraselmis gracilis*. In: 33ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. INSTITUTO DE QUÍMICA, 33., 2009. **Reunião** [...]. Universidade de São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2009.

PÉREZ, G. L.; TORREMORELL, A.; MUGNI, H.; RODRÍGUEZ, P.; VERA, M. S.; NASCIMENTO, M.; ALLENDE, L.; BUSTINGORRY, J.; ESCARAY, R.; FERRARO, M.; IZAGUIRRE, I.; PIZARRO, H.; BONETTO, C.; DONALD, P. M.; ZAGARESE, H. Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: A mesocosm study. **Ecological Applications**, v. 17, n. 8, p. 2310-2322, 2007.

PESCE, S.; BATHISSON, I.; BARDOT, C.; FAJON, C.; PORTELLI, C.; MONTUELLE, B.; BOHATIER, J. Reponse of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, p. 1905-1912, 2009.

PIZARRO, H.; FIORI, E. D.; SINISTRO, R.; RAMIREZ, M.; RODRIGUEZ, P.; VINO CUR, A.; CATALDO, D. Impact of multiple anthropogenic stressors on freshwater: how do glyphosate and the invasive mussel *Limnoperna fortunei* affect microbial communities and water quality. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 56-68, 2016.

RELYEA, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Phytoplankton: Ecology, Biodiversity and Conservation**. Cambridge University Press, 2006.

ROCHA, T. L.; SANTOS, A. P. R.; SOARES, C. M. A.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; MORAIS, S. M. T. S. Proteomic and histoathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 175-186, 2015.

SANTOS, S. C. **Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de pesticida glifosato em amostras ambientais**. 2012. 112f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2012.

SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; LOPES, F. M.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; TAVARES, G.; ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, p. 322-326, 2014.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater (SMEWW) 22. ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2012. 1v

SULLIVAN, D. S.; SULLIVAN, T. P.; BISALPUTRA, T. Effects of Roundup | Herbicide on Diatom Populations in the Aquatic Environment of a Coastal Forest. **Bull. Environm. Contain. Toxicol.** v. 26, p. 91-96, 1981.

TRINDADE, C. R. T.; PEREIRA, S. A.; ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes limnicos do campus carreiros - FURG, Rio Grande, RS. **Caderno de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 1-22, 2010.

UEHLINGER, V. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Arch. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 121-123, 1964.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton - methodik. **Mitteilungen Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie**, (1958), 9:1-38.

VERA, M. S.; FIOR, E. D.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUAREZ, A.; MOLINA, M. C. R.; TELL, G.; PIZARRO, H. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanoron freshwater microbial communities. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1805-1816, 2012.

VERA, M. S.; FIOR, E. D.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUAREZ, A.; MOLINA, M. C. R.; TELL, G.; PIZARRO, H. New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 710-721, 2010.

WANG, C.; LIN, X.; LI, L.; LIN, S. Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. **Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

WANG, S.; SEIWERT, B.; KASTNER, M.; MILTNER, A.; SCHAFFER, A.; REEMTSMA, T.; YANG, Q.; NOWAK, K. M. (Bio) degradation of glyphosate in water-sediment microcosms - A stable isotope co-labeling approach. **Water Research**, p. 91-100, 2016.

WEBER, C. I. Plankton. *In*: ENVIRONMENTAL Protection Agency Cincinnati (ed.). **Biological field and laboratory methods for measuring the quality surface water and effluents**. U.S.A.: National Environmental Research Center Office of Research and Development U. S., 1973. p. 1-17.

YUSOF, S.; ISMAIL, A.; ALIAS, M. S. Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. **Marine Pollution Bulletin**, p. 494-498, 2014.

Recebido em: 19/08/2017

Aceito em: 21/02/2019