
ECOLOGIA

ANA CAROLINA DOS SANTOS

**ANÁLISE DA TOXICIDADE DE ÁGUA DE
RIO CONTAMINADA COM HERBICIDA
AMETRINA UTILIZANDO COLUNAS DE
WINOGRADSKY E MICROALGAS COMO
BIOINDICADORAS**

Ana Carolina dos Santos

ANÁLISE DA TOXICIDADE DE ÁGUA DE RIO CONTAMINADA COM
HERBICIDA AMETRINA UTILIZANDO COLUNAS DE WINOGRADSKY
E MICROALGAS COMO BIOINDICADORAS

Orientador: Ederio Dino Bidoia

Co-orientador: Ana Paula Justiniano Régo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
ecóloga.

Rio Claro
2016

574.5263 Santos, Ana Carolina dos
S237a Análise da toxicidade de água de rio contaminada com
 herbicida ametrina utilizando colunas de Winogradsky e
 microalgas como bioindicadoras / Ana Carolina dos Santos. -
 Rio Claro, 2016
 50 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia
Coorientadora: Ana Paula Justiniano Régo

1. Ecologia aquática. 2. Ametrina. 3. Microalgas. 4.
Coluna de Winogradsky. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Não há pessoas no mundo pelas quais eu gostaria de agradecer mais do que a minha família, principalmente aos meus pais por todo o apoio de todos esses anos. Tanto carinho, amor e cuidados, tanta preocupação e por tudo que fizeram por mim (o possível e o impossível). A chance que me deram de continuar meus estudos, toda a ajuda. Saibam que só cheguei até aqui por causa de vocês.

Ao meu irmão por todos os momentos, mas também por todas as risadas e apoio. Você é muito especial para mim.

Tio Zé e tia Dalva, meus tios e padrinhos, agradeço vocês por todo apoio e por vocês estarem sempre presentes. Tia Joana, minha tia querida, por sempre me ensinar sobre esforço e dedicação e por todos os momentos.

Todos vocês foram muito importantes para meu crescimento pessoal e isso com certeza refletirá no meu crescimento profissional.

Agradeço ao professor Ederio pela paciência e oportunidade de realizar os projetos de pesquisa em seu laboratório, Ana Paula, pela dedicação, paciência, apoio e conselhos e correções, a todos do Laboratório Multidisciplinar pelas pequenas ajudas, principalmente em encontrar vidrarias. Aos técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, da Unesp.

Aos funcionários e professores da Unesp, pois, sem eles a graduação não teria sido realidade.

A toda a Eco 012. Eu agradeço todos os momentos que passamos juntos, todo aprendizado e crescimento pessoal e profissional. Todos os campos, cafés, festas, tudo com vocês foi especial. Vocês são incríveis.

A pessoas especiais do curso de ecologia que conheci. “Dedico à ecologia”

Um agradecimento especial aos amigos que se tornaram uma família. Chico, Vag, Caxis, Briza, Maori, Spyro, Lulis, Gabi, Matias, Luan, Gema, vocês me ensinaram muito e continuam me ensinando, cada um com suas qualidades e...peculiaridades (tentando mostrar que essa palavra pode representar coisas boas). Amo muito vocês.

A todas as pessoas que colaboraram para a minha formação, agradeço.

"Nunca duvide da capacidade de um pequeno grupo de dedicados cidadãos para mudar rumos do planeta. Na verdade, eles são a única esperança para que isso possa ocorrer".

Margaret Mead

RESUMO

Ametrina é um herbicida muito utilizado para combate de ervas daninhas em produção de cana-de-açúcar, milho, café, entre outros, persistente e tóxico, capaz de atingir lençóis freáticos e ser carregado até os rios. Capaz de inibir fotossíntese, podendo prejudicar o desenvolvimento de algas. O objetivo do estudo foi analisar um ecossistema aquático contaminado com herbicida ametrina. Para tanto, foram coletados água e sedimento do Ribeirão Claro (afluente do Rio Corumbataí) na Estação de Tratamento 1 (ETA 1) do DAAE da cidade de Rio Claro- SP para Preparar 8 colunas de Winogradsky, para monitoramento de algas. Os ensaios continham quatro volumes do herbicida, na concentração $3,75 \text{ g.L}^{-1}$ (0 μL , 100 μL , 250 μL e 500 μL de ametrina), em duplicata (ensaios A e B). As algas foram identificadas por microscopia de luz, as células de algas contadas semanalmente, através da câmara de Neubauer. Para fitotoxicidade, utilizou-se 20 sementes de *Lactuca sativa*/placa, contendo papel de filtro esterilizado e umedecido com 3 mL de água proveniente das colunas, as placas foram incubadas por 120 horas à 20°C, foi medido o crescimento radicular das sementes. Foram feitas leituras de condutividades e pHs de alíquotas semanais das colunas. A biomassa algal foi quantificada pela determinação de *clorofila a*, por espectrofotometria. Houve alteração nas espécies encontradas nas colunas com diferentes volumes de ametrina, além de diminuição do número de células de algas, alterações no pH e condutividade, além de apresentar fitotoxicidade para sementes de alface e diminuição da biomassa. O herbicida ametrina apresenta toxicidade para as microalgas.

Palavras-chave: Ametrina, microalgas, coluna de Winogradsky.

ABSTRACT

Ametryne is a herbicide widely used for combating weeds in production of sugar cane, corn, coffee , among others , persistent, toxic, capable of reaching groundwater and be carried into the rivers. Capable of inhibiting photosynthesis, which may disturb the growth of algae. The objective of the study was to analyze an aquatic ecosystem contaminated with herbicide ametryne. Therefore, were collected water and sediment of Ribeirão Claro (tributary of the Rio Corumbataí) in Treatment Plant 1 (ETA 1) DAAE the city of Rio Claro- SP to prepare 8 Winogradsky columns for monitoring algae. The tests contained four volumes of the herbicide, at concentrations 3.75 g.L^{-1} (0 uL, 100 uL, 250 uL , and 500 uL of ametryne) in duplicate (trials A and B) .The algae were identified by light microscopy , the cells of algae counted weekly by Neubauer chamber. For phytotoxicity was used 20 seeds of *Lactuca*/ plate containing sterile and moistened paper filter with 3 mL of water from the column , the plates were incubated for 120 hours at 20° C was measured root growth of the seeds. Conductivity and pHs readings were taken after weekly of the columns. The algal biomass was quantified by determining the *chlorophyll a* by spectrophotometer. There was alteration in the species found in columns with different volumes of ametryne, besides decrease in the number of algae cells, changes in pH and conductivity, besides presenting phytotoxicity to seeds of lettuce and reduced biomass. The herbicidal toxicity presents ametryne microalgae.

Key words: Ametryne, microalgae, Winogradsky.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Agricultura.....	8
1.2 Agroquímicos.....	9
1.3 Ametrina.....	10
1.4 Contaminação aquática por herbicida	11
1.5 Coluna de Winogradsky.....	12
1.6 Microalgas	13
1.7 Biorremediação	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Coleta	18
3.2 Coluna de Winogradsky.....	18
3.3 Identificação de microalgas.....	20
3.4 Contagem de células de microalgas.....	20
3.5 Condutividade e pH.....	21
3.6 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i>	21
3.7 Determinação de <i>clorofila a</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Aspecto da coluna de Winogradsky	24
4.2 Identificação de microalgas	25
4.3 Contagem de células de microalgas.....	32
4.4 Condutividade e pH.....	35
4.5 Ensaio de fitotoxicidade com sementes de <i>L. sativa</i>	39
4.6 Determinação de <i>clorofila a</i>	42
5 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agricultura

O homem aprendeu sobre a natureza e aprimora seus conhecimentos sobre ela cada vez mais, do mesmo modo, o uso dos recursos naturais, pelo ser humano, também aumenta. A agricultura é o meio através do qual o ser humano garante sua sobrevivência. Porém, a agricultura tem se modificado cada vez mais, através de novas tecnologias que orientam a agricultura a uma enorme produtividade (SILVA et al., 2005).

As transformações advêm do grande incentivo em se utilizar insumos agrícolas e maquinários para produção agropecuária, aumentando e enriquecendo o setor agroindustrial (MENASCHE, MARQUES & ZANETTI, 2008). Essa produção comercial que se utiliza de inovações tecnológicas vem ao encontro com a necessidade de alimentar milhões de pessoas que constituem a população mundial (SILVA, et al., 2005).

Ao longo dos anos, a necessidade de produtividade fez com que a mão de obra do agricultor fosse substituída por máquinas, já que as mesmas garantem mais produtos em menos tempo. Quando o homem começou a cultivar e descobrir novas técnicas agrícolas que garantiam a produtividade, se iniciou a “Revolução Agrícola” (GONÇALVES, 1998 apud OLIVEIRA & THOMAZ JÚNIOR, 2002), a partir daí ecossistemas, antes muito complexos em interações, em seu estado natural, se tornam simples e perdem as suas inúmeras interações, tendo perda de diversidade, isso é comum, principalmente quando se fala de agricultura em larga escala (OLIVEIRA & THOMAZ JÚNIOR, 2002).

Com a Revolução Industrial, no século XX, ocorreu o que se chama Revolução Verde. Tal revolução, no Brasil, foi marcada pelo cultivo agrícola mais rentável, o que facilitou a consolidação da monocultura no país (SILVA & MARTINS, 2010).

O homem passa utilizar-se da monocultura, que consiste na presença de uma única cultura em campo. Entende-se que essa prática agrícola, independente da espécie cultivada, não é sustentável, pensando a médio e longo prazo. Pois, a

monocultura gera um desequilíbrio nas condições físicas, químicas e biológicas do solo, o que pode levar até mesmo a uma perda de produtividade. Esses desequilíbrios que ocorrem, são agravados com o mal preparo do solo antes de receber o cultivo, com o uso abusivo e inadequado de equipamentos que aumentam a agressão do solo, levando à desagregação, compactação e erosão, além de diminuir matéria orgânica e os nutrientes, o que leva à ocorrência de doenças na agricultura (ZANLORENSI, 2008).

A pouca competição, que a monocultura traz, acaba por favorecer a reprodução de predadores e de plantas de maneira desenfreada. Esses predadores podem se tornar superpopulações e passam a serem chamados de pragas, pelo setor agrícola (ANDRADE, 1995).

Como os agricultores que utilizam a monocultura como prática, acabam se deparando com problemas de esgotamento de solo e aparecimento de pragas, os mesmos passam a se beneficiar do desenvolvimento da química a partir do século XVI e novas técnicas de agricultura. A química agrícola se torna importante para a resolução desses problemas (SILVA & MARTINS, 2010).

1.2 Agroquímicos

A adoção de agroquímicos se dá como resposta aos problemas que ocorrem pela substituição de uma vegetação natural por monoculturas (SILVA & MARTINS, 2010).

Para combater essas pragas agrícolas, na Segunda Guerra Mundial, surgem os agrotóxicos atuais. São conhecidos, três tipos principais de agrotóxicos, são eles: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos) e herbicidas (controle de ervas daninhas), embora existam outros inúmeros tipos (ANDRADE, 1995).

Agroquímicos são definidos pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7.802/1989, em seu artigo 1º, inciso IV, como sendo:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e

industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Os agrotóxicos são empregados para preservar a cultura, protegendo-a de seres vivos considerados nocivos para a mesma. Porém, muitos são os problemas gerados pelo uso excessivo desses produtos. Os agrotóxicos podem apresentar riscos, tanto para os ecossistemas, quanto para a saúde humana. Atualmente, esses produtos têm sido altamente comercializados, e aplicados. A quantidade comercializada tem subido muito nos últimos anos devido ao agravamento das condições do solo (SILVA & MARTINS, 2010).

1.3 Ametrina

Ametrina (Figura 01) é um herbicida que pertence ao grupo químico das triazinas. Cujas fórmula molecular é $C_9H_{17}N_5S$ (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-2,4,6-triazina). O grupo triazina compreende o maior número de herbicidas, representam cerca de 30% da produção mundial (CABRAL et al., 2003).

Triazinas possuem um anel heterocíclico com 6 átomos, onde carbonos e nitrogênios são simétricos e os grupos substituintes nas posições 2, 4 e 6 são o que diferenciam entre as fórmulas vendidas. São utilizados nos controles pré e pós-emergentes no combate a ervas daninhas (CABRAL et al., 2003).

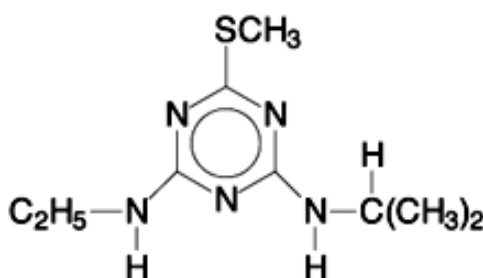
A ametrina é um herbicida seletivo, utilizado para controle de ervas daninhas na produção de cana de açúcar, milho, café, abacaxi, citrus, banana, entre outros. É um produto altamente tóxico, capaz de inibir a fotossíntese dessas plantas (CABRAL, et al., 2003). Por conta da ampla atuação da ametrina em diferentes espécies de ervas daninhas, é um dos herbicidas mais utilizados. A degradação do herbicida se dá por micro-organismos e pelo processo de fotólise (ANDRADE, 2008), embora as propriedades físicas e químicas da molécula do herbicida conferem-lhe uma grande resistência (COSTA, MONTEIRO & TORNISIELO, 2000).

A molécula possui certa estabilidade e uma meia vida de 20 a 100 dias. Também possui alta mobilidade e resistência em água e no solo (CABRAL, et al., 2003). Sendo que para o solo, conhecidamente, apresenta uma resistência de até 6

meses (PRATA et al., 2001), especialmente em solos com grande teor de argila e de matéria orgânica. No caso do Brasil, a persistência nos solos é entendida como alta ou média, dependendo do tipo de solo e da adição de substrato orgânico (COSTA, MONTEIRO & TORNISIELO, 2000). Metabólitos da molécula do herbicida podem ser encontrados em água subterrâneas, mesmo longos períodos após sua aplicação no solo (CABRAL et al., 2003).

Sabidamente, esse produto pode causar prejuízos ao meio ambiente, contaminando o solo e corpos d'água. Por ser muito persistente, encontram-se resíduos da ametrina por um longo período de tempo em águas subterrâneas (IGNJATOVIC et al., 1993 apud CABRAL et al., 2003).

Figura 01: Fórmula molecular do herbicida ametrina



Fonte: CABRAL et al., 2003.

1.4 Contaminação aquática por herbicida

Quando ocorre a adição de uma ou mais substâncias estranhas para o sistema, como é o caso da adição de ametrina no solo e/ou ecossistemas aquáticos, essas substâncias são chamadas de xenobióticos. Os xenobióticos são fontes poluidoras, capazes de prejudicar a saúde de ecossistemas.

Segundo Norris & Thoms (1999), ecossistemas aquáticos de um modo geral, para serem considerados saudáveis, tem que se analisar uma série de fatores químicos e físicos e a presença e ausência de atividades industriais no entorno e etc. A gravidade da poluição dependem também da habilidade que o sistema tem de se regenerar (CALLISTO; GOULART & MORETTI, 2001). Muito estudos estão

sendo feitos para analisar a saúde dos ecossistemas aquáticos, pós adição de xenobióticos.

Muitos xenobióticos podem alterar propriedades físicas e químicas de um ecossistema, bem como alterar direta ou indiretamente a biota aquática. Para poder observar essas mudanças são medidos fatores como: condutividade, pH, testes de toxicidade, identificação e quantificação de organismos, considerados bioindicadores e etc. (ARMAS et al., 2007).

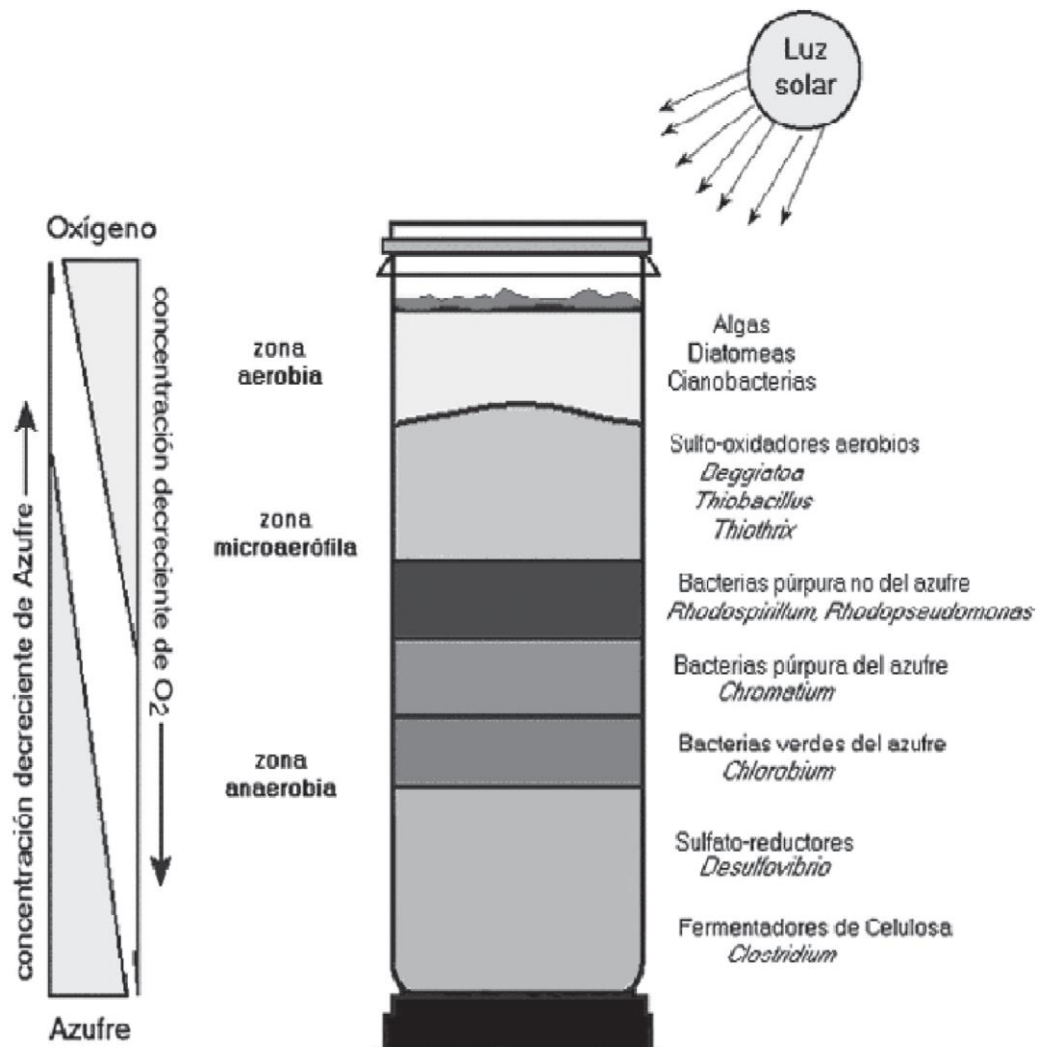
Ecossistemas têm sido alvos de poluição por aditivos agrícolas, que são utilizados o solo, como fertilizantes e agroquímicos. Os herbicidas que são utilizados no solo, de um modo geral, tem grande risco de se direcionarem aos lençóis freáticos, isso tende a ocorrer devido ao fluxo superficial. Dependendo das características do solo, como a porosidade, por exemplo, a infiltração pode ocorrer com maior ou menor facilidade. Além disso, com uma maior aplicação do produto em épocas de ocorrência de chuvas, essa probabilidade de contaminação tende a ser maior (ARMAS et al., 2007).

1.5 Coluna de Winogradsky

Uma técnica muito utilizada em estudos de poluição aquática é a coluna de Winogradsky (Figura 02). A coluna de Winogradsky foi criada pelo microbiologista Sergei Winogradsky, em 1880. A coluna tem capacidade de imitar um ambiente aquático (GAMAZO; LÓPEZ-GOÑI & DÍAZ, 2005). Esse microcosmo permite observar o crescimento e a função de diferentes grupos de micro-organismos. Nessa coluna são colocadas amostras de solo e de água do ambiente ao qual se pretende analisar. A coluna é exposta à luz solar ou mesmo à luz artificial. De acordo com as condições ambientais surgem estratificações desses grupos de micro-organismos (GOMES & OSÓRIO, 2011).

Sendo assim, a coluna de Winogradsky é um excelente meio de se monitorar o desenvolvimento de um ecossistema aquático e uma técnica que pode ser utilizada amplamente para estudos ambientais, como os de contaminação aquática.

Figura 02: Coluna de Winogradsky.

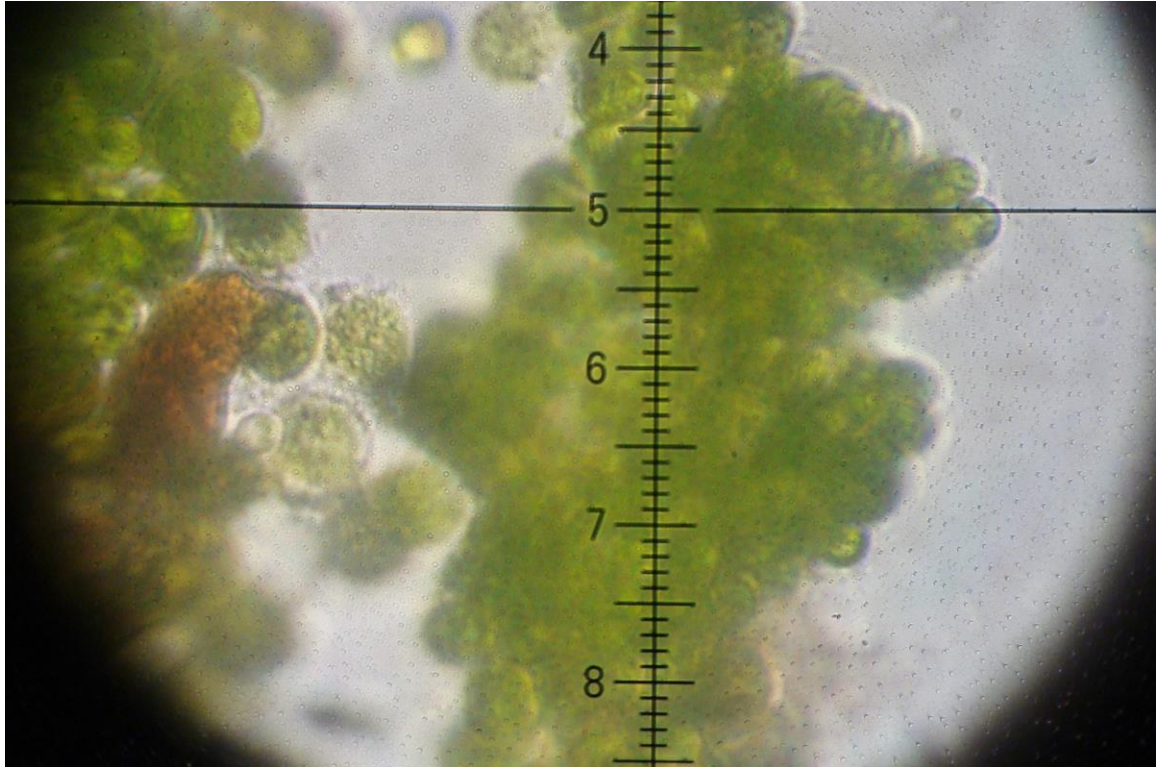


Fonte: GOMES & OSÓRIO, 2011.

1.6 Microalgas

Algas (Figura 03) são organismos de características muito heterogêneas, podendo ser macroscópicas ou microscópicas, em sua forma microscópica são chamadas de microalgas (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2001). Como é um grupo muito heterogêneo, as algas estão presentes em três reinos conhecidos, sendo eles: *Plantae*, *Metazoa* e *Bacteria* (BICUDO & MENEZES, 2004, p.1).

Figura 03: Microalgas vistas sobre microscopia de luz.



Fonte: do autor.

Microalgas são geralmente unicelulares, e em alguns casos formam colônias. São organismos autotróficos, produtores primários, responsáveis pela produção de oxigênio em ecossistemas aquáticos, marinhos e de água doce (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2001), como são muito abundantes em diferentes regiões, são responsáveis por fixar a maior parte do carbono do planeta e geram, através da fotossíntese, a maior parte do oxigênio da atmosfera (FRANKLIN et al., 2000). Além de servirem como alimento para demais organismos aquáticos, sabe-se que um déficit no crescimento das algas seria capaz de causar um grande desequilíbrio ecológico (FALKOWSKI & RAVEN, 1997).

O crescimento de populações de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos do meio (FALKOWSKI & RAVEN, 1997). Biologicamente, o crescimento das mesmas ocorre de acordo com as taxas metabólicas das espécies encontradas e até mesmo pode sofrer influências de

outros organismos. Em relação aos fatores físicos e químicos, estes estão relacionados às condições ambientais de luminosidade, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975; RICHMOND, 2004).

Sendo assim, microalgas são organismos muito importantes para estudos de toxicidade aquática, tendo um importante papel como bioindicadoras de contaminação. Pois, alterações quantitativas e qualitativas na comunidade de microalgas são intimamente relacionadas às alterações na qualidade da água (LIMBERGER, 2011). Quando as algas são expostas a qualquer efeito adverso, esse efeito se refletirá em organismos de níveis tróficos superiores, isso afeta diretamente a qualidade desses ambientes aquáticos. Há uma relação entre menor diversidade de algas e microalgas e aumento da poluição, assim como é conhecida a capacidade de algumas algas em retirar elementos químicos do ambiente na qual se inserem, sendo importante ferramenta na recuperação de ecossistemas degradados (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). Desse modo, microalgas se tornam um grupo importante no estudo da contaminação aquática pelo herbicida ametrina.

1.7 Biorremediação

Alguns organismos possuem metabolismos com capacidade de agir como agentes modificadores e decompositores de agentes contaminantes presentes no ambiente. Esses agentes biológicos, que contem essa capacidade, são usados no processo de biorremediação. A biorremediação possui estratégias distintas para descontaminação de ambientes, uma delas está relacionada a utilização de agentes que são naturais do ambiente em que a técnica será utilizada (agentes autóctones), sem adições externas, esse processo se chama biorremediação natural, passíveis em ecossistemas aquáticos ou mesmo terrestres. Outra abordagem conta com o auxílio de agentes estimulantes, como adição de nutrientes para estimular o aumento dos agentes biológicos responsáveis pela biorremediação, essa estratégia é chamada bioestimulação. Outra estratégia é o bioaumento, com a inoculação de micro-organismos. O produto final do processo de biorremediação é o gás carbônico e a água, isso significa que o processo de remediação foi total, atingindo o objetivo de descontaminação (MARIANO, 2006).

Biorremediação pode ser feita *in situ* ou *ex situ*. Quando a técnica é aplicada no próprio local onde houve contaminação, é denominado *in situ*, contrariamente, quando se opta pela biorremediação *ex situ*, a remediação não ocorre no local de contaminação, desse modo, se torna mais fácil, controlar algumas variáveis ambientais, que podem alterar o processo de biorremediação (PIMENTA, 2012).

Muitos organismos podem ser utilizados para o processo de biorremediação, podendo esse processo ser realizado por bactérias, fungos, plantas, etc. Algas são amplamente utilizadas nesse processo, principalmente quando se trata de contaminação aquática. Para tanto, a ficorremediação é uma técnica de baixo custo e de fácil aplicação para esse ambiente contaminado, já que se utiliza, na maioria das vezes das algas já existentes no local. Na ficorremediação, macroalgas e microalgas são utilizadas para transformar compostos nocivos ao ambiente, em compostos menos ou nada nocivos (PIMENTA, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo geral a utilização da coluna de Winogradsky para a identificação das algas e a determinação de biomassa por *clorofila a*, para a análise da toxicidade de um ecossistema aquático contaminado com herbicida ametrina.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- I. Avaliar a evolução da coluna de Winogradsky contendo água contaminada com herbicida ametrina;
- II. Realizar a identificação e a contagem das microalgas em diferentes alturas na coluna de Winogradsky, através de microscopia de luz;
- III. Realizar a determinação de biomassa por *clorofila a*;
- III. Avaliar a condutividade e o pH na coluna;
- IV. Verificar a ecotoxicidade do herbicida ametrina na coluna de Winogradsky utilizando sementes de *Lactuca sativa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta

A coleta de sedimento e água foi realizada no Ribeirão Claro (afluente do Rio Corumbataí) na Estação de Tratamento 1 (ETA 1) do DAAE da cidade de Rio Claro-SP. Cujas coordenadas geográficas são: -22.409811 (S) -47.540542 (W) (Figura 04). A água do ribeirão é considerada como de boa qualidade, atendendo aos requisitos de um ambiente saudável, o que é importante para a veracidade do experimento.

Figura 04: Ribeirão Claro (afluente do Rio Corumbataí) na Estação de Tratamento 1 (ETA 1) do DAAE da cidade de Rio Claro- SP.



Fonte: do autor.

3.2 Coluna de Winogradsky

Foram realizados testes com a coluna de Winogradsky, baseado na metodologia de LOSS et al. (2003). No qual, para cada coluna foram utilizadas 100,000 g de sedimento do Ribeirão Claro, 4,500 g de Na_2SO_4 , 0,200 g de Na_2CO_3 , 0,200 g de K_2HPO_4 , 0,500 g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0,500 g de fonte de carbono (filtro de papel desfiado) pesados com uma balança semi-analítica BL220H e 1000 mL de água

também do Ribeirão Claro. Para cada coluna foi adicionado uma quantidade específica do herbicida ametrina, na concentração de 3,75 g L⁻¹ (a concentração foi escolhida de acordo com as aplicações em campo). Foram montadas 8 colunas de Winogradsky para cada ensaio, foram dois ensaios, no total, com quatro quantidades de ametrina (0 µl, 100 µL, 250 µL e 500 µL de ametrina), em duplicata (ensaios A e B). Esse teste foi realizado com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento do ambiente com adição de ametrina, nesse experimento as colunas receberam os seguintes tratamentos representados na Tabela 1. O primeiro ensaio foi realizado no período de janeiro a abril, enquanto que o segundo ensaio foi realizado de maio a julho.

Tabela 1- Volumes do herbicida ametrina, na concentração 3,75 g L⁻¹, para cada tratamento da coluna de Winogradsky para os dois ensaios.

TRATAMENTO	VOLUME DE AMETRINA (µL)
Controle A (CA)	0
Controle B (CB)	0
Tratamento 1A (1A)	100
Tratamento 1B (1B)	100
Tratamento 2A (2A)	250
Tratamento 2B (2B)	250
Tratamento 3A (3A)	500
Tratamento 3B (3B)	500

Fonte: do autor

A partir dessas quantidades foram realizados testes com as colunas de Winogradsky, sendo eles a identificação das espécies de microalgas, a contagem do número de células de microalgas, foram medidos os valores de condutividade e pH nas colunas, os ensaios de fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* e a determinação da *clorofila a*.

3.3 Identificação de microalgas

Semanalmente, foi realizada a identificação das espécies de algas existentes na coluna de Winogradsky. Essa identificação foi feita com o auxílio de um microscópio de luz Olympus CX41 e do guia de identificação de algas “*Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil*” (BICUDO & MENEZES, 2004). Cujas finalidade do teste foi analisar a evolução das espécies de algas na coluna, assim pode-se observar alterações ocasionadas pelo herbicida ametrina.

Foi quantificada a frequência de algumas algas mais encontradas nas colunas de Winogradsky, essa frequência é dada pela quantidade de vezes que a espécie de alga é avistada na coluna, em todas as leituras.

3.4 Contagem de células de microalgas

A contagem de células de algas presentes na coluna de Winogradsky foi feita com o auxílio da câmara de Neubauer Knittel gläser e de um microscópio de luz Olympus CX41. Essa contagem serve como uma estimativa sobre o número de células de microalgas total existentes no meio analisado, sendo demonstrado por:

nº de células/ mL. Essa quantificação demonstra se o herbicida ametrina tem capacidade para reduzir o número de células de microalgas.

A quantidade de células de microalgas encontradas na coluna de Winogradsky, é estimada pelo seguinte cálculo, demonstrado na equação 1, a seguir.

$$n^{\circ} \text{ de células /mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad (1)$$

3.5 Condutividade e pH

A condutividade expressa a capacidade da água em conduzir corrente elétrica. Essa capacidade é dependente da temperatura e dos íons presentes na água. O valor mostra a quantidade de sais existentes na coluna d'água. Esse valor representa a mudança de composição da água, bem como, a concentração mineral. A condutividade está muito relacionada com as características geoquímicas da bacia de drenagem e com características climáticas (ARAÚJO, COSTA & CHELLAPPA, 2000). Quanto maior for a quantidade de íons dissolvidos na água, maior será o valor da condutividade, expressa em mS cm^{-1} . Sendo assim, pode ser usada como medida indireta para indicar poluentes (LAUERMANN, 2007). Essa medida foi feita com o auxílio de um condutímetro Tecnonon CA150.

O pH é uma das variáveis ambientais mais importantes. O pH pode ser visto como um fator limitante para organismos, mas também é modificado por organismos através do metabolismo dos mesmos. Sendo uma resposta às alterações químicas e biológicas do meio. O pH expressa a atividade do íon hidrogênio (WAGNER JÚNIOR, 2007), determinando se o ambiente apresenta maior acidez ou um caráter mais básico. Para medida de pH foi utilizado o auxílio de um pHmetro da Denver Instrument UB-5.

3.6 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Os ensaios de toxicidade com sementes de *L. sativa* são ensaios de toxicidade aguda, pois se trata de um ensaio feito com exposição direta por 120h, tendo assim uma prova estatística dessa toxicidade. A partir desse teste, podemos avaliar efeitos fitotóxicos de uma substância ou uma mistura de várias substâncias durante a germinação de sementes, já que no período de germinação e no início do desenvolvimento da planta, os processos fisiológicos envolvidos são muito numerosos, então, a sensibilidade da planta nesse período é alta. Quando a semente entra em contato com condições externas adversas é possível detectar substâncias tóxicas, mesmo em baixa concentração. O ensaio de toxicidade com semente de alface é importante para detectar toxicidades de compostos puros ou

não em águas superficiais, subterrâneas, de consumo humano e águas residuais, domésticas ou industriais. Esse teste de toxicidade traz dados de efeitos de contaminantes em vegetais que se desenvolvem próximo à margem de corpos d'água. Além que *L. sativa*, é uma espécie importante para a horticultura, sendo também uma espécie de rápido crescimento, gerando dados em poucos dias (CASTILLO, 2004).

Foram realizados ensaios de fitotoxicidade com a semente *L. sativa* (alface), com a fração líquida das colunas de Winogradsky, a fim de avaliar a germinação e o alongamento da raiz, baseando-se na metodologia de CASTILLO (2004). Os experimentos foram realizados em triplicata e constituídos de controle positivo com o sulfato de zinco (ZnSO_4) como substância tóxica de referência e o controle negativo utilizando-se água desionizada. Foram utilizadas 3 placas com papel filtro para cada tratamento e controles. Para cada placa foram utilizadas 20 sementes de *L. sativa*, sem aditivos, e foram adicionados 3 mL de cada amostra da coluna de Winogradsky. Feito isso, as placas foram incubadas por 120 horas à 20°C.

Para a quantificação da inibição radicular das sementes de *L. sativa*, foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \text{ de IR} = \frac{[M(A) - M(TX)]}{M(A)} \quad (2)$$

Onde % de IR corresponde à porcentagem de inibição de crescimento radicular, M(A) é a média do comprimento das raízes do controle (A), M(TX) é a média do comprimento das raízes dos tratamentos X, onde X pode ser C, T1, T2 ou T3.

3.7 Determinação de *clorofila a*

Clorofila é um pigmento importante para a realização de funções metabólicas em plantas, algas e algumas bactérias, funções como captura de luz solar, produção de oxigênio e açúcares, pela fotossíntese. Dentre as clorofilas, está a *clorofila a*, normalmente é utilizada como indicadora da biomassa do fitoplâncton, considerada

a mais recorrente, indicando o crescimento de algas e cianobactérias em razão do enriquecimento por nutrientes (MAESTRIN et al., 2009).

Para a realização desse experimento, foram filtradas 10 mL das amostras da coluna de Winogradsky, em filtro Whatman GF/F, 47 mm diâmetro e 0,6 µm de tamanho de poro. O filtro foi dobrado e guardado em vidro âmbar envolto com papel alumínio para evitar luminosidade, que possa degradar a amostra. Foram adicionados 10 mL de etanol 90% no vidro âmbar contendo o filtro. O etanol 90% foi preparado adicionando-se 5 mL de água desionizada em 90 mL de etanol 95%. O vidro âmbar com o filtro foi colocado por 5 min em banho maria quando a água atingiu a temperatura de 78° C. Após o banho maria, o vidro âmbar foi colocado em gelo por 5 min. O vidro âmbar foi deixado em geladeira por 24 horas. Após as 24 horas, foram feitas as leituras da extração em etanol em espectrofotômetro UV-visível Hach Odissey 2500 no comprimento de onda 665 nm e 750 nm. Após a leitura, foi adicionado 1 gota de HCl e foi feita a releitura nos dois comprimentos de onda. O branco utilizado foi a solução etanol 90%. O teste da *clorofila a* foi baseado em CETESB (2014).

A equação (3) que quantifica a biomassa de algas na coluna de Winogradsky está representada a seguir, dada em µg.L⁻¹:

$$Clorofila\ a\ (\mu g.L^{-1}) = \frac{(Eb - Ea) \cdot (R/R - 1) \cdot K \cdot v}{V \cdot L} \quad (3)$$

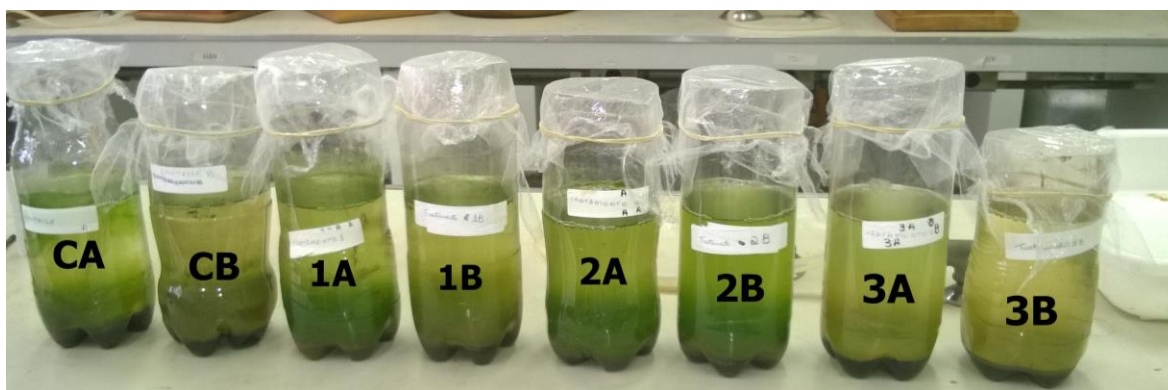
Onde, *Eb* corresponde à absorbância do extrato à 665 nm antes da acidificação, menos a absorbância a 750 nm. *Ea* corresponde à absorbância do extrato à 665 nm depois da acidificação, menos a absorbância a 750 nm, *R* é igual 1,72 (razão de rendimento da *clorofila a* não acidificada, *R-1* é igual a 2,39, *K* é o coeficiente de absorção da *clorofila a* igual à 11, 49 (para o etanol), *v* é o volume do solvente utilizado (etanol) em mL (10 mL), *V* é o volume da água filtrada (em litros) e *L* é o comprimento da cubeta em cm (1cm). Segundo CETESB (2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspecto da coluna de Winogradsky

Na figura 05, a seguir, estão representadas as colunas de Winogradsky, após os três meses de incubação das mesmas.

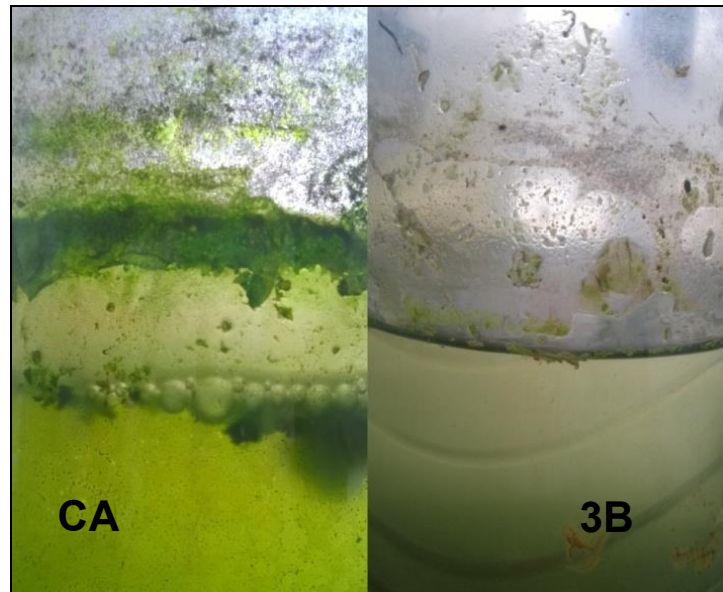
Figura 05: Representação das colunas de Winogradsky após os três meses de incubação.



Fonte: do autor.

Na figura 05, acima estão representadas as colunas de Winogradsky, nota-se que o aspecto da coluna já após os três meses expostas a luminosidade natural, apresenta coloração esverdeada, esse verde que pode ser notado nas colunas é por conta das algas presentes no microcosmo. Com o passar do tempo, as algas se aglomeram e se aderem à parede da coluna de Winogradsky. As colunas 3A e 3B apresentam uma coloração menos intensa que as demais, o que estaria relacionado com a queda no número de células de algas, por conta do grande volume do herbicida, correspondente à 500 μ L do herbicida. A Figura 06, a seguir é uma comparação próxima das colunas controle (CA) e de tratamento 3 (3B).

Figura 06: Comparação entre as colunas Controle A e Tratamento 3B.



Fonte: do autor

Na Figura 06, pode-se comparar as colunas Controle A e Tratamento 3B, a coluna controle não contém o herbicida ametrina, desse modo, apresenta uma coloração mais esverdeada, representando as algas fotossintetizantes. A coluna tratamento 3B, contendo 500 μL apresenta uma coloração mais clara, não muito verde. O que pode representar que essa coluna contém menos células de algas, representando ação tóxica do herbicida ametrina.

4.2 Identificação de microalgas

As algas foram identificadas através de microscopia de luz, em nível de espécie, para cada tratamento, em diferentes regiões da coluna, para o primeiro ensaio, as espécies estão representadas na Tabela 2, a seguir, enquanto que o segundo ensaio está representado na Tabela 3, a seguir.

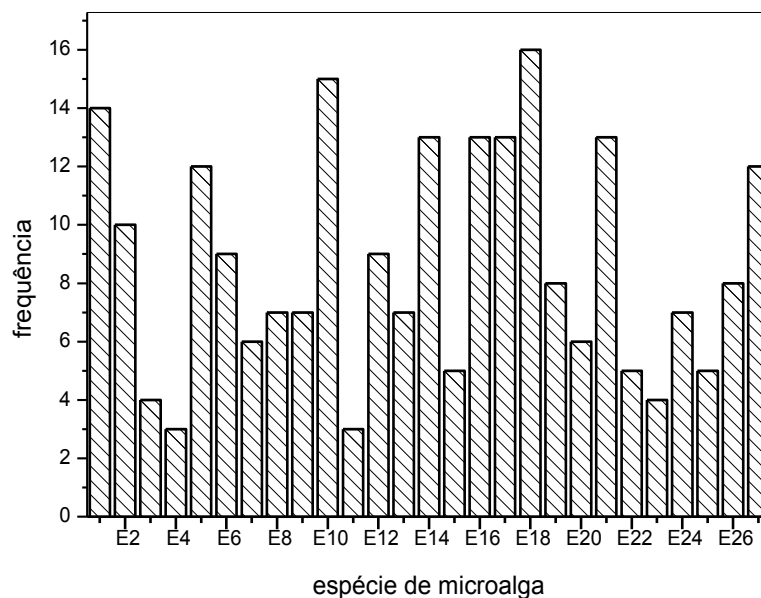
Tabela 2- Espécies de algas encontradas em diferentes locais da coluna de Winogradsky (T- topo, M- meio e F- fim), de acordo com cada tratamento. C- controle, 1- tratamento1, 2- tratamento, 3- tratamento 3. A e B representam as duplicatas, para o primeiro ensaio.

Coluna	CA			CB			1 ^a			1B			2A			2B			3A			3B		
Espécies de algas	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F
<i>Anabaena circucinalis</i>		X	X	X	X	X				X	X	X				X	X	X		X		X		X
<i>Arthrosfera jenerii</i>			X	X	X	X		X	X		X	X		X		X								
<i>Calothrix fusca</i>								X		X				X		X								
<i>Characiopsis longipis</i>								X			X	X												
<i>Chlorella vulgaris</i>			X	X	X	X				X	X		X	X	X	X	X		X					
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	X	X		X	X	X		X	X	X	X													
<i>Dichothrix willei</i>						X			X						X	X	X	X						
<i>Diplochloris hortobgyi,</i>		X			X					X	X				X			X	X					
<i>Euastropsis richteri</i>													X		X		X	X			X		X	X
<i>Eucapsis densa</i>	X	X	X		X	X		X	X	X	X		X			X	X		X			X		X
<i>Gleitlerinema splendium</i>													X			X	X							
<i>Gloeotila pelagica</i>					X			X				X			X				X	X		X	X	X
<i>Gomphonema parvillum</i>		X	X	X	X	X	X	X																
<i>Hydrocoleum heterotrichum</i>	X		X			X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X						
<i>Juraneyella javorkae</i>		X					X					X			X				X					
<i>Lemnicola hungarica</i>	X	X	X			X	X	X	X				X		X	X	X	X	X					
<i>Neochloris pseudoestigmatica</i>		X	X	X	X	X					X	X	X	X	X				X	X	X			
<i>Palmella arantia</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X					
<i>Petalonema alatum</i>											X	X	X		X	X	X		X		X			
<i>Pleurocapsa fusca</i>				X	X		X	X				X			X									
<i>Pseudanabaena moliniiformes</i>	X		X	X			X	X	X				X	X	X			X		X		X	X	
<i>Raphidonema nivele</i>		X		X	X		X	X																
<i>Romeria gracilis</i>					X		X	X	X															
<i>Stauroneis phoenicenteron</i>				X	X	X			X			X			X			X						
<i>Stichosephon mangle</i>			X			X			X				X				X							
<i>Stigonema hormoides</i>											X		X	X	X	X	X	X	X					
<i>Synechocystis aquatilis</i>	X	X		X		X		X		X					X		X	X			X		X	

Fonte: do autor

Para o primeiro ensaio, segundo a Tabela 2, foram encontradas diferentes espécies de algas. A frequência das algas encontradas está representada no gráfico a seguir (Figura 07). Esse gráfico foi criado com base no número de vezes em que a espécie é marcada na Tabela 2.

Figura 07: Frequência das algas encontradas na coluna de Winogradsky. A frequência é determinada pelo número de vezes em que a alga é encontrada na coluna, calculada através da Tabela 2, acima. E1: *Anabaena circucinalis*. E2: *Arthrosfera jenerii*. E3: *Calothrix fusca*. E4: *Characiopsis longipis*. E5: *Chlorella vulgaris*. E6: *Cylindrospermopsis raciborskii*. E7: *Dichothrix willei*. E8: *Diplochloris hortobgyi*. E9: *Euastropsis richteri*. E10: *Eucapsis densa*. E11: *Gleitlerinema splendidum*. E12: *Gloetila pelágica*. E13: *Gomphonema parviliun*. E14: *Hydrocoleum heterotrichum*. E15: *Juraneyella javorkae*. E16: *Lemnicola hungarica*. E17: *Neochiloris pseudoestigmatica*. E18: *Palmella arantia*. E19: *Petalonema alatum*. E20: *Pleurocapsa fusca*. E21: *Pseudanabaena moliniformes*. E22: *Raphidonema nivele*. E23: *Romeria gracilis*. E24: *Stauroneis phoenicentheron*. E25: *Stichosephon mangle*. E26: *Stigonema hormoides*. E27: *Synechocystis aquatilis*.



Fonte: do autor

A Figura 07 será discutida adiante.

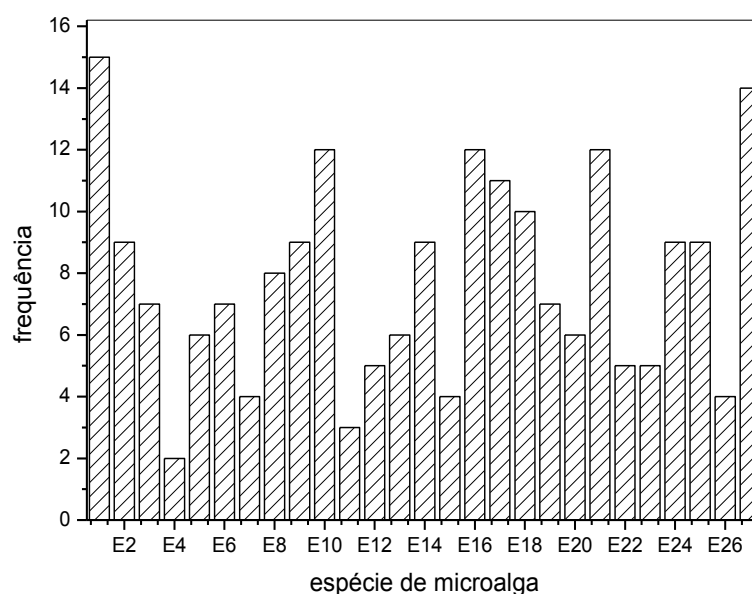
Tabela 3- Espécies de algas encontradas em diferentes locais da coluna de Winogradsky (topo, meio e fim), de acordo com cada tratamento. C- controle, 1- tratamento1, 2- tratamento, 3- tratamento 3. A e B representam as duplicatas, para o segundo ensaio.

Coluna	CA			CB			1A			1B			2 ^a			2B			3 ^a			3B		
Espécies de algas	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F
<i>Anabaena circucinalis</i>	X	X	X	X		X		X		X	X	X	X			X	X	X	X	X				
<i>Arthrospira jenerii</i>				X	X			X	X		X			X	X	X								
<i>Calothrix fusca</i>				X		X		X		X		X		X		X								
<i>Characiopsis longipis</i>		X									X													
<i>Chlorella vulgaris</i>			X	X	X	X							X	X										
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	X	X		X				X		X					X			X						
<i>Diclothrix willei</i>						X						X			X		X							
<i>Diplochlois hortobgyi</i>		X			X				X	X	X				X			X	X					
<i>Euastropsis richteri</i>						X		X					X		X		X	X			X		X	X
<i>Eucapsis densa</i>	X	X	X		X	X		X		X								X		X	X	X	X	X
<i>Gleitlerinema splendium</i>													X			X	X							
<i>Gloetila pelagica</i>					X													X	X			X		X
<i>Gomphonema parvillum</i>		X		X		X				X				X			X							
<i>Hydrocoleum heterotrichum</i>			X				X			X		X		X		X				X		X	X	
<i>Juraneyella javorkae</i>		X					X					X			X									
<i>Lemnicola hungarica</i>	X	X	X			X	X	X	X				X		X	X	X	X						
<i>Neochloris pseudoestigmatica</i>		X	X	X		X					X		X	X	X		X			X	X			
<i>Palmella arantia</i>	X		X		X		X		X		X	X				X	X	X						
<i>Petalonema a alatum</i>											X	X	X		X	X	X				X			
<i>Pleurocapsa fusca</i>				X	X		X	X				X			X									
<i>Pseudanabaena moliniiformes</i>	X	X	X	X				X		X				X	X			X		X		X	X	
<i>Raphidonema nivele</i>																			X	X	X	X		X
<i>Romeria gracilis</i>													X							X	X	X		X
<i>Stauroneis phoenicenteron</i>		X		X	X	X		X	X			X			X			X						
<i>Stichosephon mangle</i>			X			X			X				X		X		X			X		X		X
<i>Stigonema hormoides</i>													X		X		X	X						
<i>Synechocystis aquatilis</i>			X	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X		X				

Fonte: do autor

Para o segundo ensaio, segundo a Tabela 3, foram encontradas diferentes espécies de algas. A frequência das algas encontradas está representada no gráfico a seguir (Figura 08). Esse gráfico foi criado com base no número de vezes em que a espécie é marcada na Tabela 3.

Figura 08: Frequência das algas encontradas na coluna de Winogradsky. A frequência é determinada pelo número de vezes em que a alga é encontrada na coluna, calculada através da Tabela 3, acima. E1: *Anabaena circucinalis*. E2: *Arthrosfera jenerii*. E3: *Calothrix fusca*. E4: *Characiopsis longipis*. E5: *Chlorella vulgaris*. E6: *Cylindrospermopsis raciborskii*. E7: *Dichothrix willei*. E8: *Diplochlois hortobgyi*. E9: *Euastropsis richteri*. E10: *Eucapsis densa*. E11: *Gleitlerinema splendidum*. E12: *Gloetila pelágica*. E13: *Gomphonema parvillum*. E14: *Hydrocoleum heterotrichum*. E15: *Juraneyella javorkae*. E16: *Lemnicola hungarica*. E17: *Neochiloris pseudoestigmatica*. E18: *Palmella arantia*. E19: *Petalonema alatum*. E20: *Pleurocapsa fusca*. E21: *Pseudanabaena moliniformes*. E22: *Raphidonema nivele*. E23: *Romeria gracilis*. E24: *Stauroneis phoenicenteron*. E25: *Stichosephon mangle*. E26: *Stigonema hormoides*. E27: *Synechocystis aquatilis*.



Fonte: do autor

De acordo com as Tabelas 2 e 3 e com as Figuras 07 e 08 acima, algumas algas foram mais abundantes que outras, observado pelos gráficos de frequência ou mais resistentes, sendo essas encontradas em grandes volumes de herbicida ametrina.

Uma alga frequente e que apresentou certa resistência, sendo avistada em grandes quantidades de ametrina, como no caso do tratamento 3, que apresenta 500 µL do herbicida ametrina, foi a *Anabaena circucinalis*, essa alga pertencente à

família Nostocaceae, e ao gênero *Anabaena*, esse gênero apresenta espécies de água doce e são frequentemente encontradas no plâncton ou perifíton, formam florações em lagos, represas e possuem toxinas, que em excesso se tornam causadoras de desequilíbrio ecológico e problemas de saúde pública (BICUDO & MENEZES, 2004).

Eucapsis densa foi uma espécie também vista em abundância. Alga pertencente a família Microcystaceae. O gênero *Eucapsis*, é colonial, as colônias são de forma cúbica, possuem um envelope mucilaginoso incolor, são bastante homogêneas. *E. densa* é encontrada no metafiton de águas continentais, no Brasil. Essa espécie foi encontrada em diferentes volumes do herbicida (BICUDO & MENEZES, 2004).

Gloeotila pelágica, pertencente à família Ulotrichaceae. O gênero *Gloeotila* possui filamentos solitários, encontra-se flutuando na região litorânea de ambientes lênticos, espécie encontrada em grandes volumes do herbicida (BICUDO & MENEZES, 2004).

Hydrocoleum heterotrichum, pertencente à família Phormidiaceae foi bastante abundante, mas não foi vista quando se tem a maior quantidade de ametrina (500 µL), porém, avistado em (100 e 250 µL), esse gênero *Hydrocoleum* estão geralmente arranjados e raramente isolado, com bainha espessa, podendo apresentar tricomas. Foi encontrada em diferentes volumes do herbicida (BICUDO & MENEZES, 2004).

Lemnicola hungarica, pertencente a família Bacillariophyceae, pertencente ao gênero *Lemnicola*, são células solitárias, apresentando valvas, podendo ser de lineares a elípticas. Vista em diferentes volumes do herbicida (BICUDO & MENEZES, 2004).

Neochloris pseudoestigmatica, pertencentes à família Palmellaceae, são algas unicelulares, isolados, dificilmente são avistados em grupos, células periféricas, de parede celular evidente, a espécie é resistente à corpos d'água eutrofizados. A espécie foi vista em diferentes volumes do herbicida (BICUDO & MENEZES, 2004).

Palmella arantia, também pertencente à família Palmellaceae, são indivíduos coloniais, podem ser vistas isoladas, em pares ou grupos de quatro, no interior da mucilagem, que o gênero contém, são encontradas em solo úmido, onde se

mostram com massas gelatinosas e coloração esverdeada, podendo ser vista a olho nú. Encontrada em diferentes volumes de ametrina (BICUDO & MENEZES, 2004).

Petalonema alatum, pertencente à família Microchaetaceae, esse gênero possui uma bainha de mucilagem bem evidente e ampla, possui tricomas, foi vista em grandes concentrações de ametrina. A espécie foi encontrada em colunas com volumes intermediários do herbicida ametrina, 100 e 250 μL (BICUDO & MENEZES, 2004).

Pseudanabaena moliniformes, pertencente à família Pseudanabaenaceae, o gênero possui tricomas, cresce em locais úmidos, em ambientes aquáticos, no plâncton, podem viver na mucilagem de outras cianobactérias, como as do gênero *Microcystis*. Espécie encontrada em diferentes volumes de ametrina, na coluna de Winogradsky (BICUDO & MENEZES, 2004).

Synechocystis aquatilis, muito abundante, pertence a família Cyanophyceae, é unicelular e ocorre principalmente no plâncton, contem mucilagem, bastante encontrado em diferentes volumes do herbicida (BICUDO & MENEZES, 2004).

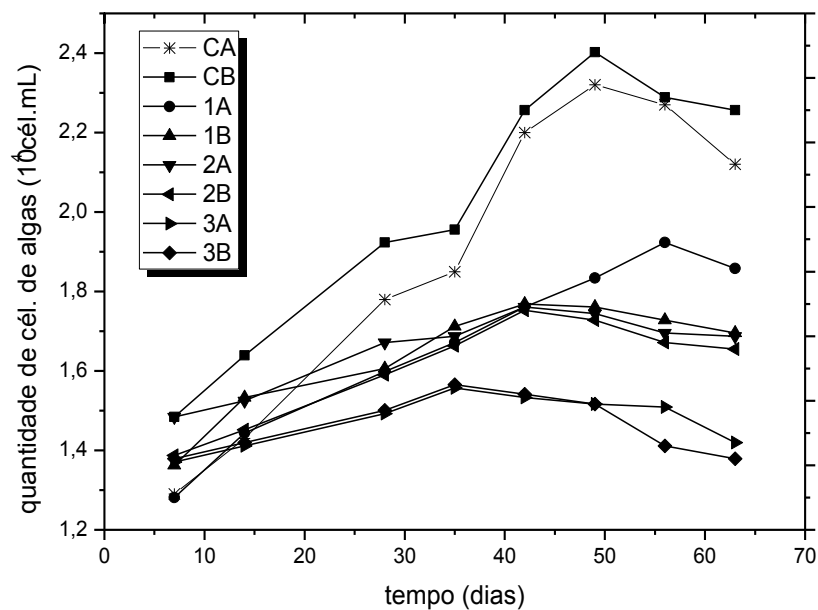
Muitas essas espécies de algas mais abundantes, são mais resistentes ao herbicida, pois são encontradas em coluna de Winogradsky que continham grandes volumes de ametrina, como 100, 250 e até mesmo 500 μL , muito embora para esse último volume, não foi possível encontrar muitas espécies, entende-se então que ametrina atrapalha o crescimento e desenvolvimento de algas, bem como as espécies mais sensíveis a poluição.

Muitas dessas algas encontradas abundantemente, que foram descritas acima, possuem tricomas, podem possuir paredes espessas, ou vivem em colônias ou associadas a outras espécies, tem mucilagem ou já foram encontradas em condições extremas, como eutrofização, algumas também, principalmente cianobactérias, possuem e liberam toxinas. Algumas adaptações celulares nas algas podem ser importantes para a sobrevivência das mesmas às condições ambientais de estresse, como é o caso do microcosmo analisado, contaminado com herbicida ametrina (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

4.3 Contagem de células de microalgas

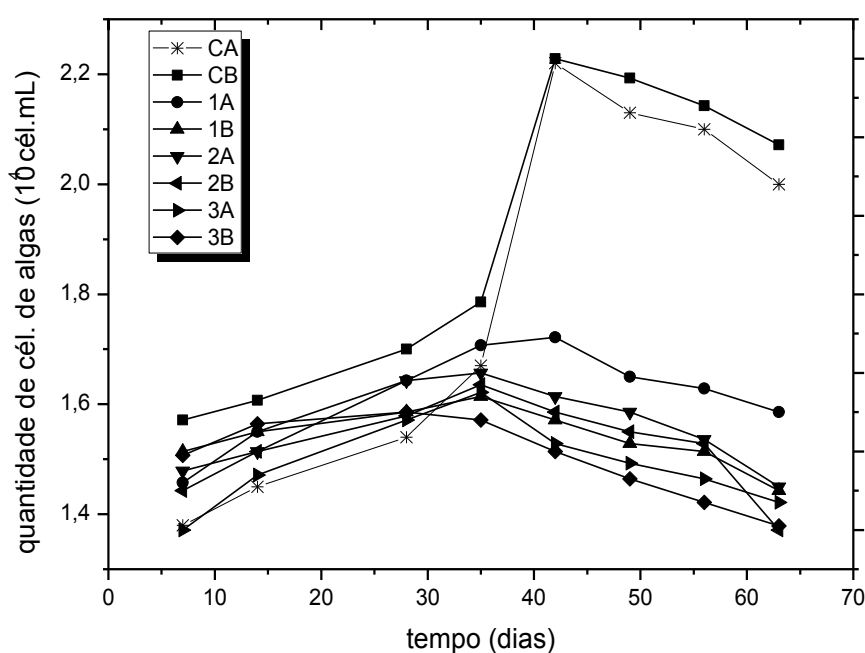
O número de células de microalgas encontrado está demonstrado nos gráficos a seguir, para ambos os ensaios. Sendo Figura 09, o número de células encontrado no primeiro ensaio da coluna de Winogradsky, enquanto a Figura 10, o número de células para o segundo ensaio. A quantidade de células é obtida a partir da equação (1) citada na seção 3.4.

Figura 09: Quantidade de células de algas encontradas nas colunas de Winogradsky para cada tratamento em função do tempo. Tempo (dias) corresponde aos dias pós montagem das colunas de Winogradsky. (C) corresponde ao tratamento controle, (1) corresponde ao tratamento 1, (2) corresponde ao tratamento 2, (3) corresponde ao tratamento 3. Sendo A e B, as duplicatas, para o primeiro ensaio.



Fonte: do autor

Figura 10: Quantidade de células de algas encontradas nas colunas de Winogradsky para cada tratamento em função do tempo. Tempo (dias) corresponde aos dias pós montagem das colunas de Winogradsky. (C) corresponde ao tratamento controle, (1) corresponde ao tratamento 1, (2) corresponde ao tratamento 2, (3) corresponde ao tratamento 3. Sendo A e B, as duplicatas, para o segundo ensaio.



Fonte: do autor

A coluna de Winogradsky, no momento da montagem recebe nutrientes, provenientes de reagentes químicos que são adicionados, para que sirva como alimento para organismos, como as algas, principalmente, que utilizam nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio e os metaboliza. O aumento desses nutrientes favorece o aparecimento e desenvolvimento das algas, o que explica o aumento do número de células na coluna de Winogradsky.

Esse processo, ocorrido na coluna, assemelha-se ao processo de eutrofização que ocorre em lagos, por exemplo, observando que a coluna imita esse ambiente, uma vez que não há corrente, sendo um corpo lântico, a única movimentação que ocorre é com a retirada de alíquotas da água da coluna para análise, o que gera pouco impacto.

A eutrofização, iniciada pelo aumento de nutrientes, gera o aumento das algas e conseqüentemente, essas algas levam ao esgotamento desses nutrientes, além do mais, o aumento de algumas cianobactérias, como *Anabaena* sp., e

Chlorella sp. possuem toxinas, que podem levar a morte de alguns organismos, bem como outras espécies de algas, sensíveis à essas citotoxinas (FIGUEIRÊDO et al., 2007).

A adição da ametrina, também gerou impacto significativo no desenvolvimento das algas, observado nas Figuras 07 e 08, acima, pois as colunas de Winogradsky que continham ametrina tiveram um aumento de células menor em relação a coluna controle. A queda no número de espécies nessas colunas se deve também a queda da quantidade de nutrientes, mas também pode ser entendida como ação do herbicida, inibindo a capacidade de fotossíntese das algas, assim como ocorre com as ervas daninhas (IGNJATOVIC et al., 1993 apud CABRAL et al., 2003).

A redução que apresentada nas colunas estão representadas pelas Tabelas 4 e 5, a seguir, considerando o número de células no final da coluna, ou seja, por volta dos 70 dias.

Tabela 4- Porcentagem de redução de células de algas em relação à coluna controle para o primeiro ensaio. (A) representa as colunas (CA, 1A, 2A, 3A) e (B) representa as colunas (CB, 1B, 2B, 3B). (MÉDIA) representa a média das colunas A e B. (%) é a porcentagem de células de algas em cada tratamento em relação ao controle. (REDUÇÃO (%)) é a porcentagem de redução de células em relação ao tratamento controle.

Trat.	A	B	Média	(%)	Redução (%)
Controle	2,2	2,3	2,25	100	0
Trat. 1	1,8	1,6	1,70	75,5	24,5
Trat. 2	1,6	1,5	1,55	68,9	31,1
Trat.3	1,2	1,2	1,20	53,3	46,7

Fonte: do autor

Tabela 5- Porcentagem de redução de células de algas em relação à coluna controle para o segundo ensaio. (A) representa as colunas (CA, 1A, 2A, 3A) e (B) representa as colunas (CB, 1B, 2B, 3B). (MÉDIA) representa a média das colunas A e B. (%) é a porcentagem de células de algas em cada tratamento em relação ao controle. (REDUÇÃO (%)) é a porcentagem de redução de células em relação ao tratamento controle.

Trat.	A	B	Média	(%)	Redução (%)
Controle	2	2,2	2,10	100	0
Trat. 1	1,5	1,3	1,40	66,7	33,3
Trat. 2	1,3	1,2	1,25	59,5	40,5
Trat.3	1,3	1,0	1,15	55,0	42,9

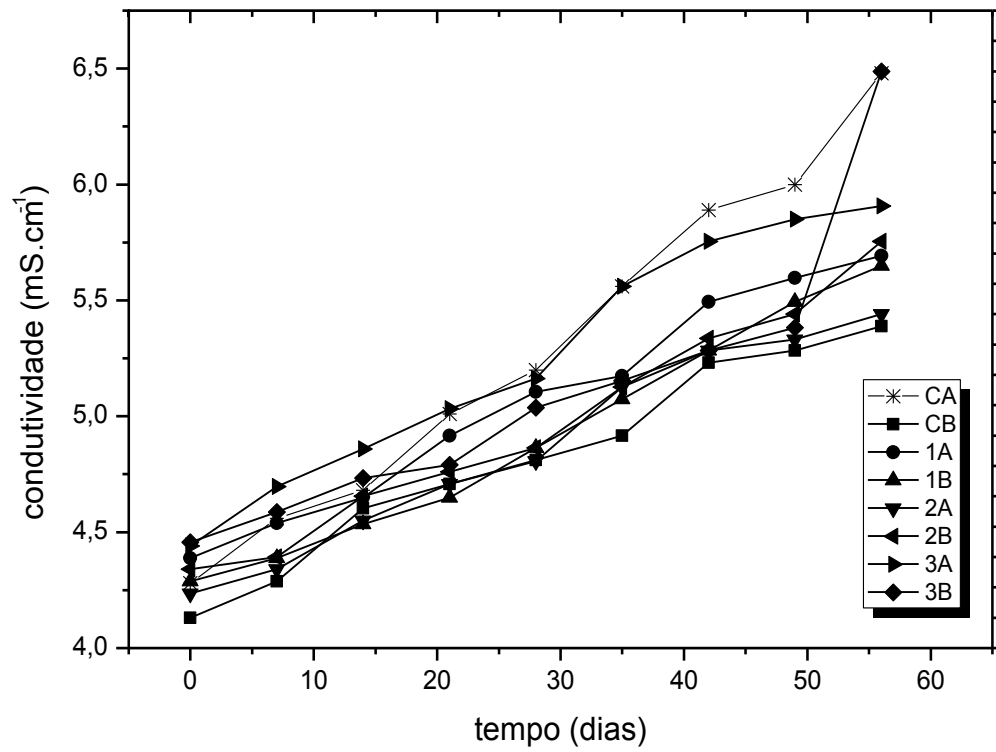
Fonte: do autor

Assim, podemos verificar que a redução na quantidade de células do tratamento 3 fica entre 40 e 50%, mostrando que ametrina tem um potencial tóxico.

4.4 Condutividade e pH

Os valores de condutividade e pH foram analisados ao longo da evolução da coluna, de acordo com cada tratamento e para ambos os ensaios. Os gráficos são representados a seguir, nas Figuras 11, 12, 13 e 14. Figura 11 corresponde à variação de condutividade nas colunas de Winogradsky, do primeiro ensaio, enquanto a Figura 12 representa a condutividade no segundo ensaio. As Figuras 13 e 14, representam o pH nas colunas do primeiro e segundo ensaio, respectivamente.

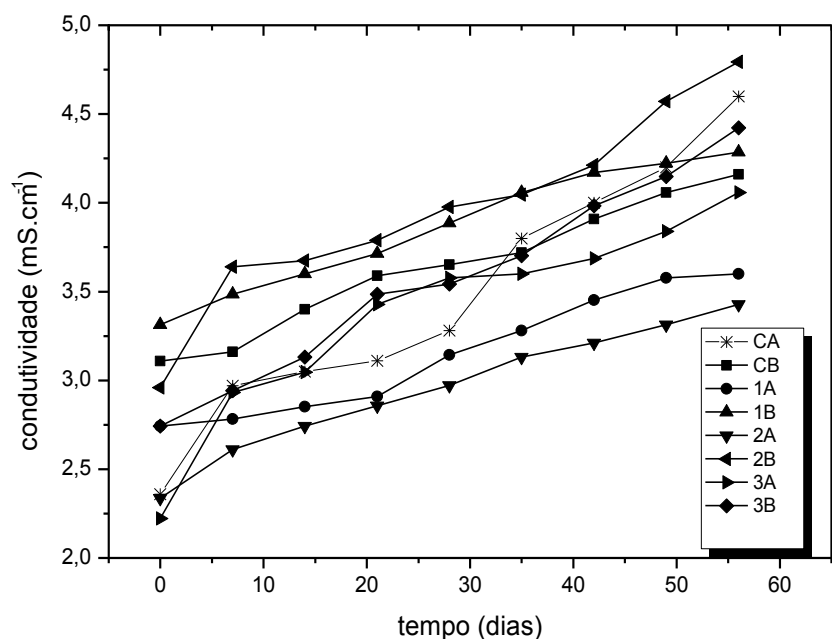
Figura 11: Condutividade medida ao longo do tempo. (C) corresponde ao tratamento controle. (1) corresponde ao tratamento 1. (2) corresponde ao tratamento 2. (3) corresponde ao tratamento 3. A e B são as duplicatas, para o primeiro ensaio de coluna de Winogradsky.



Fonte: do autor

A Figura 11 será discutida na página seguinte.

Figura 12: Condutividade medida ao longo do tempo. (C) corresponde ao tratamento controle. (1) corresponde ao tratamento 1. (2) corresponde ao tratamento 2. (3) corresponde ao tratamento 3. A e B são as duplicatas, para o segundo ensaio de coluna de Winogradsky.



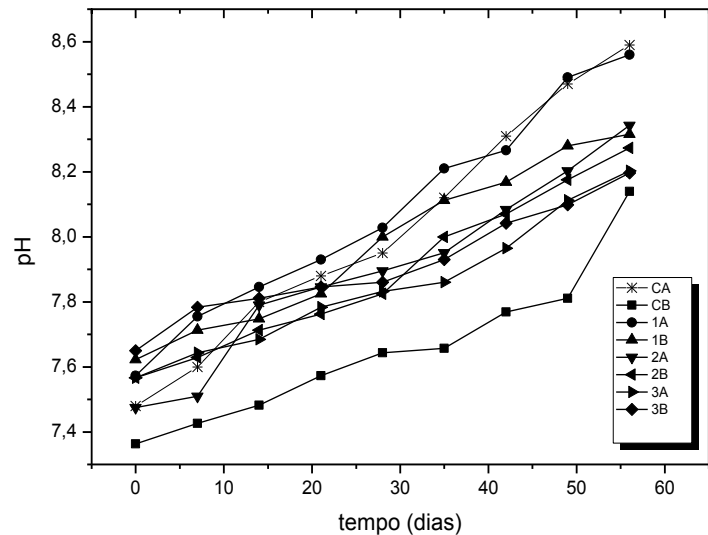
Fonte: do autor

A condutividade teve aumento, ao longo do desenvolvimento da coluna de Winogradsky. Isso deve ser devido pelo aumento dos nutrientes nitrogênio e fósforo, nutrientes que foram adicionados no momento da montagem das colunas, como descrito na seção 3.2 já que os íons nitrato, fosfato e cálcio contribuem para o aumento da condutividade, esses íons contribuem para a modificação da qualidade da água, sendo que o aumento dos mesmos, leva a um processo de eutrofização (VALENTE, PADILHA & SILVA, 1997).

A condutividade também está relacionada às atividades de organismos presentes nas colunas e tende a aumentar, pois significa um maior aumento de íons decorrente das atividades das células dos micro-organismos. Os valores de condutividade encontrados nas colunas foram entre Mín: 0,2 mS.cm⁻¹, Máx: 6,5 mS.cm⁻¹. Em ambos os ensaios as condutividades aumentaram. A condutividade aumenta ao longo do tempo, apresentando um possível aumento na atividade metabólica dos organismos. Também a degradação de organismos, como as próprias algas podem ocasionar um aumento na quantidade de íons na coluna

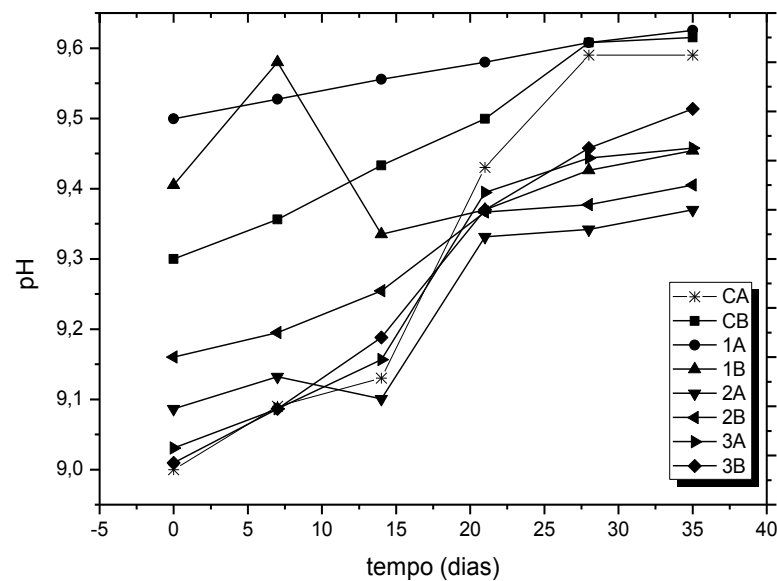
d'água, levando ao aumento da condutividade elétrica (HENRY et al., 2005 apud DAVANSO & HENRY, 2006).

Figura 13: O pH medido ao longo do tempo. (C) corresponde ao tratamento controle, (1) corresponde ao tratamento 1, (2) corresponde ao tratamento 2, (3) corresponde ao tratamento 3. Sendo A e B, as duplicatas. Para o primeiro ensaio com colunas de Winogradsky.



Fonte: do autor

Figura 14: O pH medido ao longo do tempo. (C) corresponde ao tratamento controle, (1) corresponde ao tratamento 1, (2) corresponde ao tratamento 2, (3) corresponde ao tratamento 3. Sendo A e B, as duplicatas. Para o segundo ensaio com colunas de Winogradsky.



Fonte: do autor

O pH é alterado na coluna, como sendo a medida de acidez da água, essa é alterada pelo consumo de gás carbônico (CO_2) é consumido pela fotossíntese de algas eutrofização (VALENTE, PADILHA & SILVA, 1997).

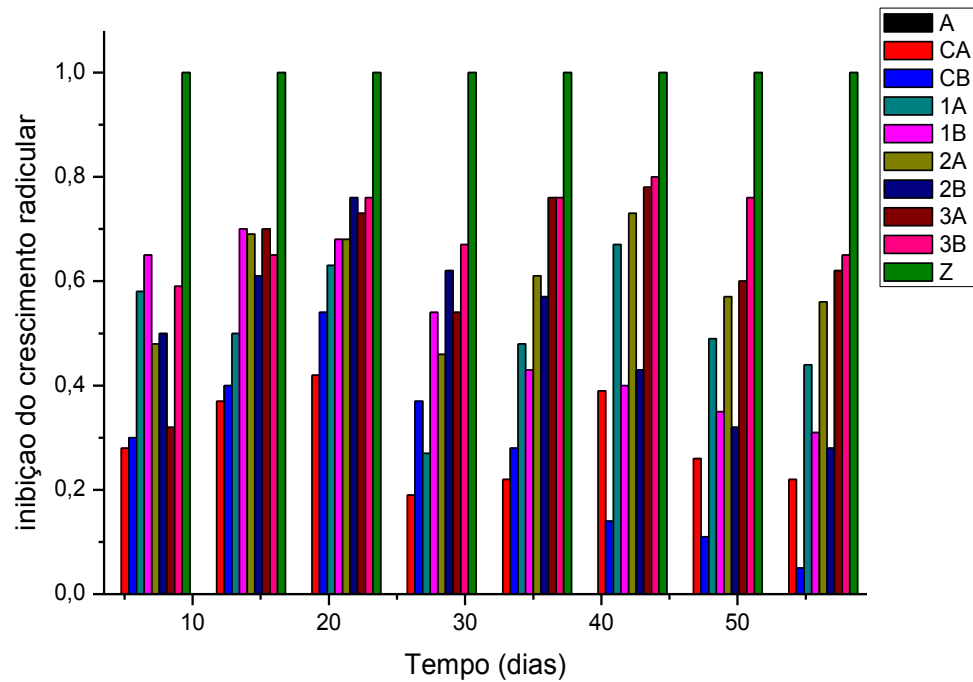
O pH é um dos principais parâmetros de qualidade de água. Sem fatores excepcionais, o pH em águas naturais fica em torno de 6,5 e 8,5. Valores de pH em torno de 6 a 9 é considerado aceitável e não prejudicial para os organismos, porém valores que fiquem muito abaixo ou acima dessa faixa podem ser letais para alguns organismos. O aumento do pH na faixa acima de 8 intensifica a eutrofização, pela liberação de fosfatos, que enriquecem a água com nutrientes (VIEIRA, 2011).

A presença de algas, principalmente quando em alta quantidade, ao consumirem o dióxido de carbono, para realização da fotossíntese, promovem a dissociação do bicarbonato em OH^- e CO_2 , o que favorece o aumento do pH (CASTRO, 2001).

4.5 Ensaio de fitotoxicidade com sementes de *L. sativa*

Os resultados de toxicidade utilizando sementes de *L. sativa* estão representados nas Figuras 15 e 16, a seguir. O cálculo de inibição radicular segue a equação (2), da seção 3.6.

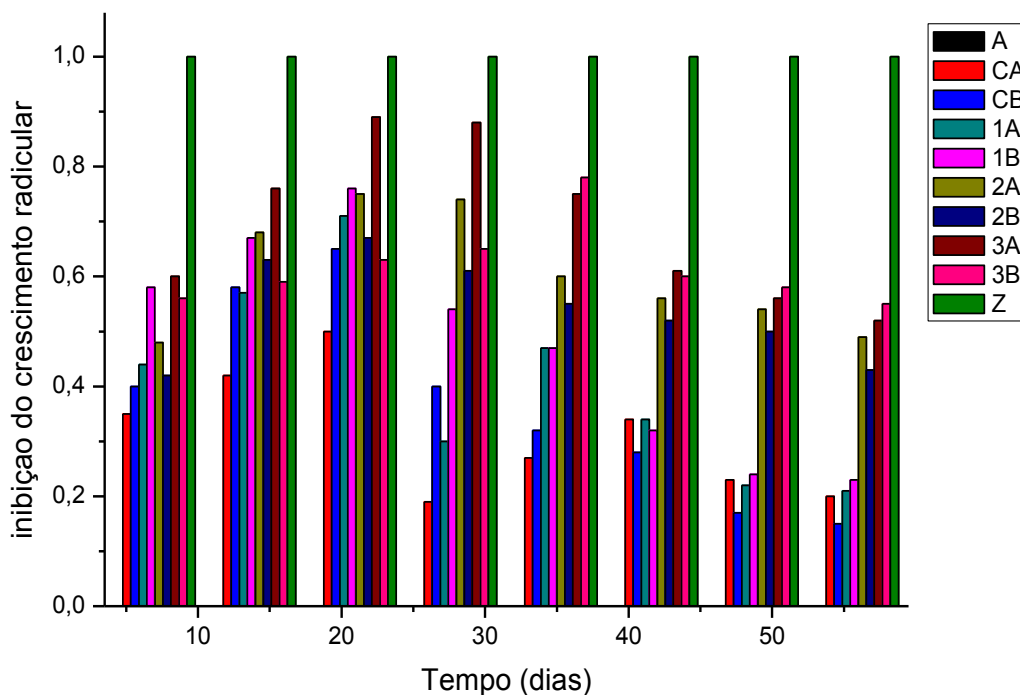
Figura 15: Porcentagem de inibição de crescimento radicular de sementes de *L. sativa* em função do tempo. Tempo (dias) representa os dias testados após a montagem da coluna de Winogradsky. (A) corresponde ao controle negativo, com água destilada, (C) corresponde ao tratamento controle, sem ametrina, (1) corresponde ao tratamento 1, (2) corresponde ao tratamento 2, (3) corresponde ao tratamento 3 e (Z) controle positivo, com sulfato de zinco. Sendo A e B, as duplicatas, para o primeiro ensaio.



Fonte: do autor

A Figura 15 será discutida na página seguinte.

Figura 16: Porcentagem de inibição de crescimento radicular de sementes de *L. sativa* em função do tempo. Tempo (dias) representa os dias testados após a montagem da coluna de Winogradsky. (A) corresponde ao controle negativo, com água destilada, (C) corresponde ao tratamento controle, sem ametrina, (1) corresponde ao tratamento 1, (2) corresponde ao tratamento 2, (3) corresponde ao tratamento 3 e (Z) controle positivo, com sulfato de zinco. Sendo A e B, as duplicatas, para o segundo ensaio.



Fonte: do autor

Como (A) apresenta o controle negativo, no qual, foi utilizada água desionizada, não há porcentagem de inibição do mesmo. Porém, podemos notar que o controle negativo (Z), sulfato de zinco, como agente tóxico conhecido, apresenta em todas as leituras inibição de 1 ou 100%. A Tabela 6, a seguir representa as médias de inibição para cada tratamento e para ambos os ensaios.

Tabela 6- Médias de inibição de crescimento radicular para cada tratamento, para o primeiro e segundo ensaio.

Ensaio de fitotoxicidade (média da % de inibição radicular)								
Tratamento	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Primeiro ensaio	29,4	21,4	50,8	54,7	58,8	51,1	65,8	70,5
Segundo ensaio	31,3	36,9	40,8	47,6	60,5	54,3	69,6	61,8

Fonte: do autor

De acordo com a porcentagem de inibição radicular das sementes de *L. sativa*, representadas na Tabela 6, acima, podemos notar que a exposição das sementes à água proveniente das colunas de Winogradsky contaminadas com o herbicida ametrina foi maior em relação às colunas controle (CA e CB) em todos os ensaios realizados.

Todas as colunas contaminadas com o herbicida apresentaram uma grande porcentagem de inibição, sendo que as colunas com maior volume do herbicida, que corresponde a 500 µL, apresentaram inibições entre 61,8 e 70,5, sendo assim, a água contaminada com o herbicida apresenta toxicidade alta para as sementes de alface.

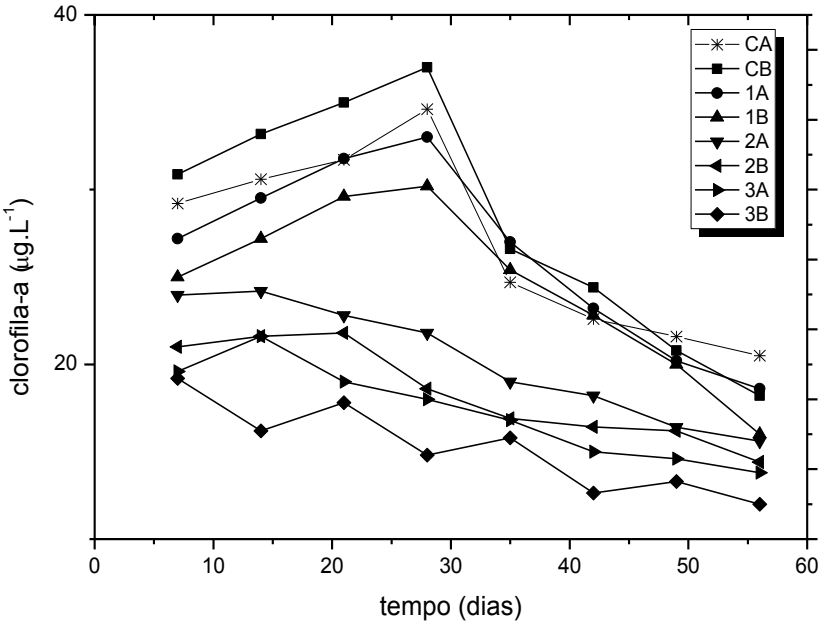
A evolução da toxicidade parece seguir um padrão, sendo menor no início, bastante acentuada no meio do teste e decai no fim, por volta dos 40 dias. Isso pode ser explicado pelos nutrientes que diminuem na coluna d'água, nutrientes como fósforo e nitrogênio. Um fato muito importante que deve ser notado é que houve uma queda na inibição do crescimento radicular das sementes em todos os tratamentos, a partir de cerca de 40 dias de leitura, isso pode ser um indicio de que a ametrina, perdeu um pouco de sua toxicidade, sugerindo degradação do herbicida ao longo do tempo, isso pode estar relacionado à atividade das microalgas mais resistentes ao herbicida, agindo na degradação da ametrina. Essa tendência não é tão evidente nas colunas dos tratamentos 2A e 3A, para o primeiro ensaio, sendo que para o segundo em 2A e 2B.

4.6 Determinação de *clorofila a*

A evolução da biomassa das algas, determinadas através da *clorofila a* está representado nas Figuras 17 e 18, a seguir.

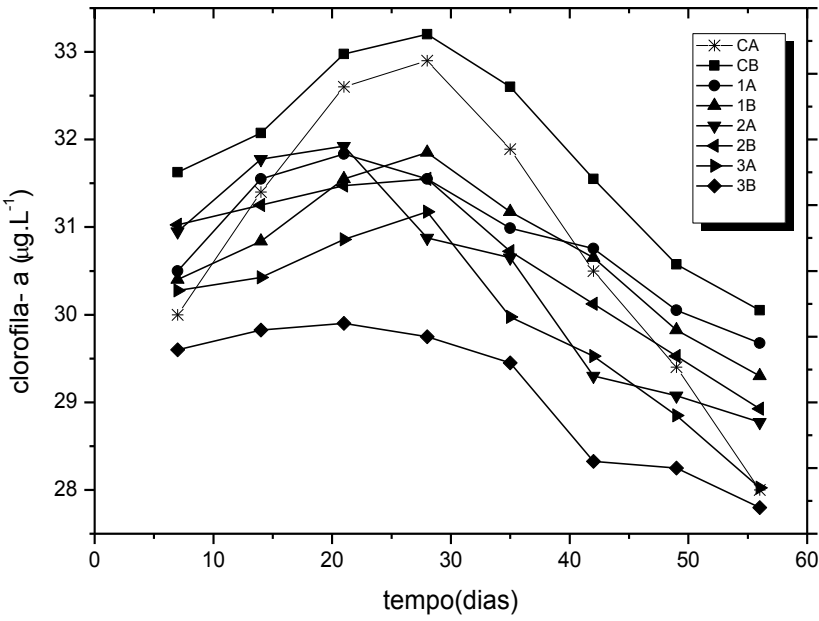
Os valores estão relacionados à equação (3) apresentada na seção 3.7.

Figura 17: Determinação da clorofila a, em $\mu\text{g. L}^{-1}$ para os tratamentos C,1, 2 e 3. Sendo A e B, as duplicatas, para o primeiro ensaio.



Fonte: do autor

Figura 18: Determinação da clorofila a, em $\mu\text{g. L}^{-1}$ para os tratamentos C,1, 2 e 3. Sendo A e B, as duplicatas, para o segundo ensaio.



Fonte: do autor

A medida de determinação de *clorofila a*, com resultados nas Figuras 17 e 18, demonstra a quantidade de biomassa de algas na coluna de Winogradsky. A quantidade do pigmento aumenta no início do desenvolvimento da coluna de Winogradsky, esse é o período em que os nutrientes adicionados à coluna ainda estão em alta quantidade, sendo assim, ainda há o aumento de biomassa, caracterizando o aumento das algas na coluna. Por volta dos 30 dias, a coluna apresenta um decréscimo, sendo detectadas menores quantidades de clorofila. Isso pode se dever ao declínio dos nutrientes com o passar do tempo, com o consumo dos mesmos pelas algas (VERCELLINO & BICUDO, 2006).

Sá-Júnior & Sipaúba-Tavares, 1997, relacionam em seu estudo, o aumento da concentração de fósforo e do nitrogênio com o aumento da *clorofila a*. Porém, esse processo pode ter sido acentuado pela ação do herbicida ametrina, nas colunas, diminuindo a ação das algas, na coluna.

As Tabelas 7e 8, a seguir mostra a porcentagem de redução da biomassa, nas colunas de Winogradsky.

Tabela 7- Representa a porcentagem de redução de biomassa nas colunas de Winogradsky em relação à coluna controle. (MÉDIA) é a média entre os tratamentos (A e B), (%) é a porcentagem correspondente à média entre A e B e ((%) REDUÇÃO) representa a porcentagem de redução da *clorofila a*, em relação ao controle. Para o primeiro ensaio.

Tratamento	Média	(%)	redução (%)
Controle	26	100	0
Tratamento 1	23,3	89,6	10,4
Tratamento 2	20,6	79,4	20,6
Tratamento 3	19,1	73,6	26,4

Fonte: do autor

Tabela 8- Representa a porcentagem de redução de biomassa nas colunas de Winogradsky em relação à coluna controle. (MÉDIA) é a média entre os tratamentos (A e B), (%) é a porcentagem correspondente à média entre A e B e ((%) REDUÇÃO) representa a porcentagem de redução da *clorofila a*, em relação ao controle. Para o segundo ensaio.

Tratamento	Média	(%)	redução (%)
Controle	30,3	100	0
Tratamento 1	28,4	93,7	6,3
Tratamento 2	28	92,4	7,6
Tratamento 3	26,7	88,1	11,9

Fonte: do autor

É possível notar uma diminuição da quantidade de clorofila em relação ao tratamento controle. Para o primeiro tratamento, a quantidade máxima de nutrientes encontrada é de cerca de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo a quantidade máxima de biomassa encontrada nas colunas. Para o segundo, também houve uma diminuição, porém, a redução foi menor do que o primeiro ensaio, como pode ser vista na Tabela 7, acima.

5 CONCLUSÃO

O microcosmo, a coluna de Winograsky foi realizada para demonstrar a evolução de um ecossistema contaminado com o herbicida ametrina. Os resultados dos testes realizadas demonstraram alterações na biota aquática, sendo essa representada pelas microalgas, que são base da cadeia alimentar no ambiente aquático e que contem grande importância para a produção e permanência do oxigênio para o ecossistema, sendo então usadas como bioindicadoras para o estudo. O teste de identificação de algas apresentou alteração na composição das microalgas no meio, tendo sido identificadas diferenças nas espécies de algas em diferentes tratamentos e na frequência das mesmas. Ametrina também foi responsável pela queda na quantidade de células de microalgas nas colunas, apresentando toxicidade. No teste das sementes, foi possível notar que a inibição do crescimento radicular foi ampliada pela presença do herbicida. Os ensaios de *clorofila a* mostraram que a quantidade de algas clorofiladas diminui o longo do tempo, demonstrando toxicidade do herbicida.

Portanto, entende-se após esse estudo, que o herbicida ametrina tem ação inibidora no desenvolvimento de algas. O herbicida também pode ter influencia na seleção de espécies tolerantes no ecossistema, devido à alteração da comunidade de microalgas encontradas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.C. **Processo de oxidação avançada por radiação ionizante na degradação do herbicida Ametrina em embalagens de pead descartadas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ANDRADE, M. J. F. V. Economia do Meio Ambiente e Regulamentação: Análise da Legislação Brasileira Sobre Agrotóxicos. **Fundação Getúlio Vargas (FGV)**. p. 4-5, 1995.
- ARAÚJO, M.F.F.; COSTA, I.A.S. & CHELLAPPA, N.T. Comunidade fitoplanctônica e variáveis ambientais na lagoa de Extremoz, Natal-RN, Brasil. **Acta limnologica brasiliensia**, v.12, n.1, 127-140, 2000.
- ARMAS, E. D. et al. Diagnóstico Espaço-Temporal da Ocorrência de Herbicidas nas Águas Superficiais e Sedimentos do rio Corumbataí e Principais Afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.
- BICUDO, C. E. M & MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições**. 2a edição. São Carlos-SP: RIMa. 502p. 2004.
- BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 4 de janeiro de 2002.
- CABRAL, M. F. et al. Estudo do Comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Editora Unesp**. v. 28, n. 2, p. 41, 2003.
- CALLISTO, M.; GOULART, M. & MORETTI, M. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**. Minas Gerais, v. 6, n. 1, p. 71-82, 2001.
- CASTILLO, G.M. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarizacion, intercalibracion, resultados y aplicaciones**. Edição n. 1. México: IMTA. 2004.
- CASTRO, M. C. A. A. **Avaliação de um sistema australiano de lagoas no tratamento conjunto de esgoto sanitário e líquidos percolados gerados em aterro sanitário**. 2001. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CETESB. Determinação de Clorofila a e Feofitina a: método espectrofotométrico. **Norma técnica L5.306**- São Paulo, 2014.

COSTA, M.A.; MONTEIRO, R.T.R. & TORNISIELO, V.L. Degradação de ametrina em areia quartzosa com adição de solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.24, p. 43-48, 2000.

DAVANSO, R.C.S. & HENRY, R. A biodiversidade bentônica em lagoa marginal ao rio Paranapanema na zona de sua desembocadura, na represa de Jurumirim. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 347-357, 2006.

FALKOWSKI, P. G. & RAVEN, J. A. Aquatic photosynthesis. **Blackwell Science**. edição n.2. p. 375, 1997.

FIGUEIRÊDO, M.C.B. et al. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. **Revista Engenharia Sanitária**, v.12, n.4, p.399-409, 2007.

FRANKLIN, N.M. et al. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 275–289, 2000.

GAMAZO, C., LÓPEZ-GOÑI, I. & DÍAZ, R. **Manual Práctico de Microbiología**. edição n. 3, Masson, Barcelona, 2005.

GOMES, A. & OSÓRIO, L.S. Utilização da Coluna de Winogradsky para a demonstração do efeito dos metais pesados na microbiota oxidante de enxofre em ambientes aquáticos: Uma abordagem experimental. **Cadernos UniFOA**, edição n. 16, p. 22, 2011.

GONÇALVES, C.W. P. **Os (des)caminhos do Meio ambiente**. São Paulo: Contexto, 1998.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. & Chanley, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Plenum, New York, USA, p.29-60, 1975.

HENRY, R. et al. Relações hidrológicas entre lagoas marginais e o Rio Paranapanema na zona de sua desembocadura na Represa de Jurumirim. In: NOGUEIRA, M.G. et al. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Rima, p. 57-82, 2005.

IGNJATOVIC, L. M., MARKOVIC, D. A. & VESELINOVIC, D. S. **Electroanalysis**, n. 5, p. 529, 1993.

LAUERMAN, A. **Caracterização química dos efluentes gerados pelo aterro controlado de Santa Maria e retenção de chumbo e zinco por um argissolo da depressão central do Rio Grande do Sul**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.

LIMBERGER, S. **Microalgas perifíticas como bioindicadores na foz do Rio Ocoy: tributário do Lago de Itaipu** – PR. 2011. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2011.

LOSS, R. A. et al. Biohydrogen production by a mixed photoheterotrophic culture obtained from a Winogradsky column prepared from the sediment of a southern Brazilian lagoon. **Renewable Energy**. Santa Catarina: v. 50, p. 648–654, 2013.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. Tese de Doutorado. Instituto de Geociências.

MAESTRIN, A.P.J. et al. Extração e purificação de clorofila a, da alga spirulina maxima: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**. vol. 32, n. 6, 1670-1672, 2009.

MENASCHE, R.; MARQUES, F.C. & ZANETTI, C. Autoconsumo e segurança alimentar: a agricultura familiar a partir dos saberes e práticas da alimentação. **Revista de Nutrição**, v 21, p.145-158, 2008.

NORRIS, R. H. & THOMS, M. S. What is a River Health. Cooperative research centre for fresh water ecology, university of Canberra. **Freshwater biology**. v. 41, p. 197-209, 1999.

OLIVEIRA, A. M. S. & THOMAZ JÚNIOR, A. **A relação homem/natureza no modo de produção capitalista. revista pegada eletrônica** (online), Presidente Prudente, v. 3, n. especial, p. 123-130, 2002.

PIMENTA, S. F. P. **Comparação entre a biorremediação de água natural e água residual utilizando Chlorella vulgaris**. Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Biologia e Gestão da Qualidade da Água. 2012.

PRATA, F. et al. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. p. 906, 2001.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science**, Oxford, UK, p. 566. 2004.

SÁ-JUNIOR, W.H.R.D.E & SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Produtividade primária fito planctônica e variação de parâmetros limnológicos ao longo do dia, em tanques de cultivo planctônico da estação de hidrobiologia e piscicultura de furnas. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 9, p. 83-91, 1997.

SILVA, J.M. et al. Agrotóxico e trabalho: Uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. , n , p. 891-903, 2005.

SILVA, M.A.M.; MARTINS, R.C. A degradação social do trabalho e da natureza no contexto da monocultura canavieira paulista. *Sociologias*, v., n. 24, p. 196-240, 2010.

VALENTE, J. P. S., PADILHA, P. M., & SILVA, A. D. Contribuição da cidade de Botucatu-SP com nutrientes (fósforo e nitrogênio) na eutrofização da represa de Barra Bonita. **Eclética Química**, v. 22, p. 31-48, 1997.

VERCELLINO, I.S. & BICUDO, D.C. Sucessão da comunidade de algas perifíticas em reservatório oligotrófico tropical (São Paulo, Brasil): comparação entre período seco e chuvoso. **Revista Brasileira de Botânica**, V.29, n.3, p.363-377, 2006.

VIDOTTI, E.A. & ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, 139-145, 2004.

VIEIRA, M. R. **Os principais parâmetros monitorados pelas sondas multiparâmetros são: pH, condutividade, temperatura, turbidez, clorofila ou cianobactérias e oxigênio dissolvido**. 2011.

WAGNER JÚNIOR, A. et al., Efeito do pH da água de embebição e do trincamento das sementes de maracujazeiro amarelo na germinação e desenvolvimento inicial. **Ciência agrotecnológica**. Minas Gerais, v. 31, n. 4, p. 1014-1019, 2007.

ZANLORENSI, V.L. **Estimativa do custo da produção agrícola 2005/2006 da soja convencional através de conhecimentos científicos e empíricos, entrevistas e pesquisas em Boa Esperança e Guarapuava, realizadas nas empresas Agrária e Coamo**. 2008.