

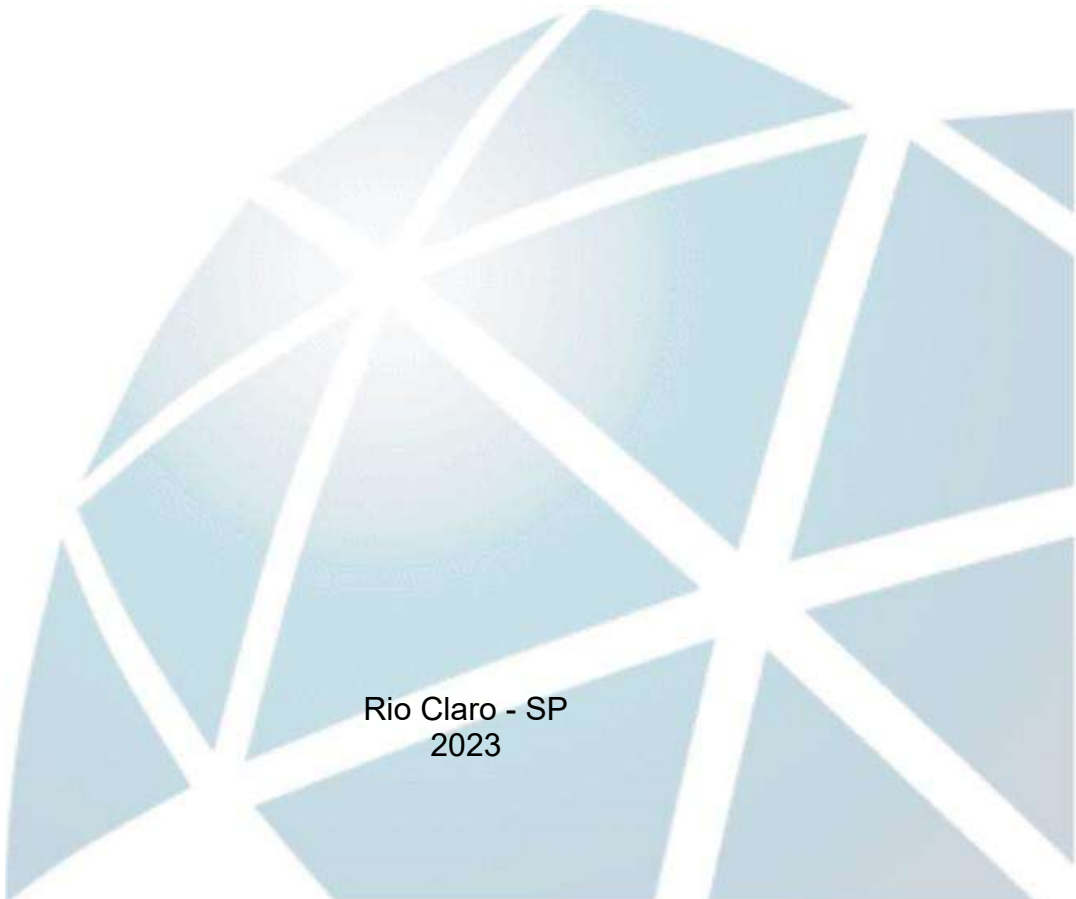
---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**AMANDA REIS FELIPE DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS  
ECOTOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA  
AMETRINA EM MICROALGAS UTILIZANDO  
COLUNAS DE WINOGRADSKY**



Rio Claro - SP  
2023

AMANDA REIS FELIPE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA  
AMETRINA EM MICROALGAS UTILIZANDO COLUNAS DE  
WINOGRADSKY**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências –  
Câmpus de Rio Claro, da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
para obtenção do grau de Bacharela em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Rio Claro - SP  
2023

O48a Oliveira, Amanda Reis Felipe De  
Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do herbicida Ametrina em microalgas utilizando colunas de Winogradsky / Amanda Reis Felipe De Oliveira. -- Rio Claro, 2023  
36 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Testes microbiológicos. 2. Toxicologia ambiental. 3. Microalgas. 4. Ecologia microbiana. 5. Resíduos herbicidas. 1. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AMANDA REIS FELIPE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO  
HERBICIDA AMETRINA EM MICROALGAS UTILIZANDO COLUNAS  
DE WINOGRADSKY**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus  
de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de  
Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempo

Prof. Dr. Pedro Henrique Mainardi

Aprovado em: 31 de outubro de 2023



Assinatura do discente



Assinatura do(a) orientador(a)

*Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram ao meu lado nesta jornada desafiadora. À minha mãe, cujo apoio inabalável foi minha maior força. Aos colegas, professores e à instituição UNESP, que enriqueceram minha trajetória acadêmica.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo da graduação, me encontrei rodeada por pessoas incríveis que foram fundamentais para tornar possível a realização deste sonho. Este trabalho não teria sido concluído com sucesso sem a influência e apoio de todos vocês.

Primeiramente, à minha mãe, que foi minha âncora nos momentos mais turbulentos. Seu apoio incondicional, amor e sacrifício foram a luz que me guiou quando tudo parecia impossível. Essa conquista é, em grande parte, sua também, pois sei o quanto você investiu para que eu chegasse até aqui. Aos meus colegas de graduação, que compartilharam comigo não apenas os momentos em sala de aula, mas também as alegrias e desafios de explorar o vasto mundo do estudo dos seres vivos. Juntos, aprendemos, erramos, crescemos e cada experiência compartilhada enriqueceu meu percurso.

Agradeço também à instituição UNESP por proporcionar o ambiente acadêmico onde pude florescer intelectualmente e enfrentar os desafios que a vida acadêmica apresenta. Não posso deixar de destacar a contribuição inestimável do meu orientador, Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia que desde o início da graduação, não apenas me ensinou muitas técnicas essenciais, mas também proporcionou reflexões profundas sobre o meio acadêmico e científico e me ajudou a definir o tipo de contribuição que desejo produzir com meu trabalho.

Além disso, gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq por fornecer uma bolsa de Iniciação Científica que me permitiu estreitar os laços com a vida acadêmica no segundo ano do curso e começar a entender como ocorre a produção do conhecimento científico. Esta experiência foi fundamental para o meu crescimento profissional.

Neste momento crucial da minha vida, não posso deixar de mencionar que este trabalho é um tributo à importância de defender o conhecimento científico. Por fim, a todos os amigos e familiares que estiveram ao meu lado, obrigado por seu apoio, paciência e compreensão. Esta conquista é nossa, e é a prova do poder do amor, coragem e determinação. Obrigada a todos vocês.

*"Na minúscula grandeza dos microorganismos reside a complexidade e a vitalidade que sustentam a teia da vida."*

**Lynn Margulis e Dorian Sagan, 1995**

## RESUMO

Neste trabalho, foi conduzido um ensaio para avaliar o impacto do herbicida Ametrina na comunidade de microalgas presentes em um afluente de Ribeirão Claro. Para isso, utilizaram-se colunas de Winogradsky contendo diferentes concentrações do herbicida, sendo posteriormente analisados parâmetros químicos e biológicos, como o valor de pH, condutividade elétrica, contagem, identificação e quantificação da biomassa das microalgas por meio da Clorofila a. Os resultados obtidos revelaram diferenças significativas nos aspectos químicos e biológicos das colunas expostas ao herbicida. Notavelmente, observou-se uma predominância notória de *Anabaena sp.*, um gênero de cianofíceas conhecido por incluir espécies produtoras de cianotoxinas. A utilização do índice de biodiversidade de Shannon revelou que a presença da Ametrina está associada a uma diminuição na biodiversidade das microalgas. Essa observação pode ser explicada por mecanismos adaptativos do grupo, como a presença de heterocistos, nitrogenases e doadores de prótons alternativos, como o sulfeto de hidrogênio, em ambientes com baixa concentração de oxigênio. Este estudo mostrou ser de extrema relevância para a saúde ambiental, enfatizando a necessidade de compreender os impactos ambientais de substâncias químicas nos ecossistemas aquáticos, destacando importância de adotar práticas de conservação e manejo que levem em consideração esses efeitos sobre a biodiversidade microbiana.

**Palavras-chave:** Ametrina; *Anabaena*; Ecotoxicologia; cianofíceas.

## ABSTRACT

An assay was conducted to assess the impact of the herbicide Ametryn on the microalgae community present in Ribeirão Claro. For this purpose, Winogradsky columns containing different concentrations of the herbicide were utilized, followed by the analysis of chemical and biological parameters such as pH, conductivity, quantity, identification, and microalgae biomass through Chlorophyll a. The obtained results revealed significant differences in both chemical and biological aspects of the columns exposed to the herbicide. Remarkably, a notable predominance of *Anabaena* sp., a genus of cyanobacteria known to include species producing cyanotoxins, was observed. The study of this behavior is crucially relevant to environmental health. The utilization of the Shannon Biodiversity Index unveiled that the presence of Ametryn is associated with a decrease in microalgae biodiversity. This observation can be explained by adaptive mechanisms within the group, such as the presence of heterocysts, nitrogenases, and alternative proton donors like hydrogen sulfide, in low oxygen concentration environments. This study underscores the importance of comprehending the environmental impacts of chemical substances in aquatic ecosystems, emphasizing the need for conservation and management practices that consider these effects on microbial biodiversity..

**Keywords:** Ametryn; *Anabaena*; Ecotoxicology.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Breve histórico da agricultura moderna intensiva e seu impacto ambiental.....	10
1.2	Agrotóxicos em Ascensão: O Brasil e o Desafio Regulatório.....	11
1.3	Herbicida Ametrina, impacto ambiental e comercialização dessa substância.....	11
1.4	Coluna de Winogradsky: Uma Ferramenta para Estudar Impactos em Ecossistemas Aquáticos.....	14
1.5	Objetivos gerais da pesquisa.....	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1	Coleta das amostras de solo e água e montagem da coluna.....	16
2.2	Avaliação de fatores como valor de pH e condutividade da coluna ...	16
2.3	Identificação e contagem das microalgas em diferentes alturas na coluna de Winogradsky.....	17
2.4	Determinação de biomassa por clorofila-a.....	17
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
3.1	Coleta e montagem das colunas de Winogradsky.....	19
3.2	Avaliação de fatores como pH e condutividade.....	19
3.3	Identificação e contagem das microalgas em diferentes alturas na coluna de Winogradsky.....	22
3.4	Determinação de biomassa por clorofila-a.....	31
4	CONCLUSÕES.....	33
5	REFERÊNCIAS.....	35

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Breve histórico da agricultura moderna intensiva e seu impacto ambiental

O estilo de vida, cultura e escolhas que a sociedade humana opta para sobreviver nem sempre estão alinhadas com a preservação do bom funcionamento do meio ambiente, seus recursos naturais e até mesmo a saúde da própria espécie a longo prazo. E com o consumo desenfreado de tais elementos, a necessidade de repensar e remediar impactos advindos dessa realidade é cada vez mais presente. Com o discurso de resolver o desafio de eliminar o problema social da fome alimentando uma população que é cada vez mais crescente, a agricultura se uniu à indústria com o intuito de ampliar a capacidade produtiva. É necessário pontuar que o contexto político teve um impacto altamente relevante nesse processo, em que a utilização de agroquímicos durante a Guerra Fria, permitia ao advento das extensas monoculturas e assim se alinhava ao objetivo final de acúmulo de capital.

Esse processo de incluir práticas industriais no contexto da produção de alimentos foi chamado de “Revolução Verde” (DUTRA, 2022, GONÇALVES, 1998 apud OLIVEIRA, 2002). Com isso, os ecossistemas mudam e no lugar de ter uma grande diversidade de organismos que interagem entre si mantendo o equilíbrio ecossistêmico é substituído por monoculturas que eliminam grande parte desses fatores resultando no desequilíbrio. Estes ambientes que antes eram complexos, muito bem organizados e principalmente estáveis, com as modificações antrópicas se tornam simples e perdem sua estabilidade e diversidade. A problemática das monoculturas é que favorecem a reprodução desenfreada de animais sem seus predadores ou competidores de nicho e de plantas invasoras sem controle, tornando-se as famosas pragas. E para resolver esse problema, utilizam-se cada vez mais substâncias, gerando um ciclo de interdependência entre a produção de alimentos e a indústria de agroquímicos e resultando em poluição de recursos naturais como a água.

É importante pontuar que a origem dos agrotóxicos ocorre em um período anterior a isso, na Segunda Guerra Mundial eles surgem para controle de pragas, porém, é durante a Revolução Agrícola que sua produção e uso aumentam consideravelmente. De maneira geral, existem três tipos principais de agrotóxicos, sendo eles: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos) e herbicidas (controle de ervas daninhas) (PARRA-ARROYO, 2022 e ANDRADE, 1995).

## **1.2 Agrotóxicos em Ascensão: O Brasil e o Desafio Regulatório**

O uso de agroquímicos tornou-se altamente lucrativo e seguiu em crescente comercialização pelo mundo. Em 2010, a quantidade de agrotóxico comercializada triplicou desde 1990 e teve um crescimento um pouco mais desacelerado entre 2007 e 2018 (SABZEVARI, 2022).

A junção do fato do Brasil basear grande parte da sua economia na produção de grãos e com uma legislação muito mais permissiva ao uso de substâncias agroquímicas quando comparada à outros países faz o país ser um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (CAMPOS, 2021 e DUTRA,2022).

Mesmo neste contexto, ao invés do fortalecimento por meio de projetos de leis para órgãos regulatórios, os últimos anos foram marcados por uma tentativa de diminuir suas ferramentas, como por exemplo, o fato do Projeto de Lei (PL) 6.299/2002 que ainda está em processo de análise e votação no Congresso Nacional propondo modificações à legislação em vigor e abrindo a possibilidade de aprovação de produtos altamente perigosos sem o amparo de órgãos regulatórios ambientais e toxicológicos como o IBAMA e o órgão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CAMPOS,2021). Desta maneira, é importante ressaltar a relevância da manutenção e ampliação dos estudos ecotoxicológicos, dos quais avaliam os efeitos dessas substâncias nos ecossistemas e na saúde ambiental como um todo.

## **1.3 Herbicida Ametrina, impacto ambiental e comercialização dessa substância**

Este trabalho teve como foco o herbicida Ametrina e seu impacto na comunidade de microalgas. A Ametrina pertence ao grupo químico da triazina, com fórmula molecular  $C_9H_{17}N_5S$  (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-2, 4,6-triazina). O grupo triazina compreende o maior número de herbicidas, representando 30% da produção mundial. São utilizados no controle pré e pós-emergentes no controle de ervas daninhas. A Ametrina é utilizada na produção de cana de açúcar, milho, café, banana e etc. É um produto altamente tóxico, inibindo a capacidade fotossintética das ervas daninhas, mas também causando prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana. Muito persistente, tem sido encontrado seus resíduos por muito tempo em águas subterrâneas (IGNJATOVIC et al., 1993 apud CABRAL et al., 2003).

De acordo com o Boletim Anual de Comercialização de Ingredientes Ativos por Unidade da Federação disponibilizado pelo IBAMA (2022), a comercialização de Ametrina no Estado de São Paulo no ano de 2021 correspondeu à 1.892,51 toneladas, número equivalente à 53% de comercialização em todo território Brasileiro. Enquanto que em 2012 o número era de quase 3.000 toneladas, equivalente à 63% de toda Ametrina comercializada no Brasil.

Com base nos dados contidos na Figura 1 é possível observar que a comercialização de Ametrina no Brasil é bastante impactada pela comercialização dessa substância em São Paulo e que a relação entre a porcentagem de Ametrina no estado de São Paulo e outros ingredientes ativos registrados é maior quando comparada essa relação no restante do país. Demonstrando grande impacto nessa região e desta forma um importante objeto de estudo para a área de ecotoxicologia. (IBAMA, 2022)

A expressiva diminuição da quantidade de Ametrina utilizada entre os anos de 2012 e 2021 pode estar relacionada ao aumento expressivo de outros ingredientes ativos registrados, que em 2012 era de 83 compostos enquanto que em 2021 aumentou para 313 substâncias registradas. Demonstrando a necessidade do aumento de pesquisas na área de ecotoxicologia para suprir toda essa demanda de informações que triplicou ao longo desses anos. (IBAMA,2022)

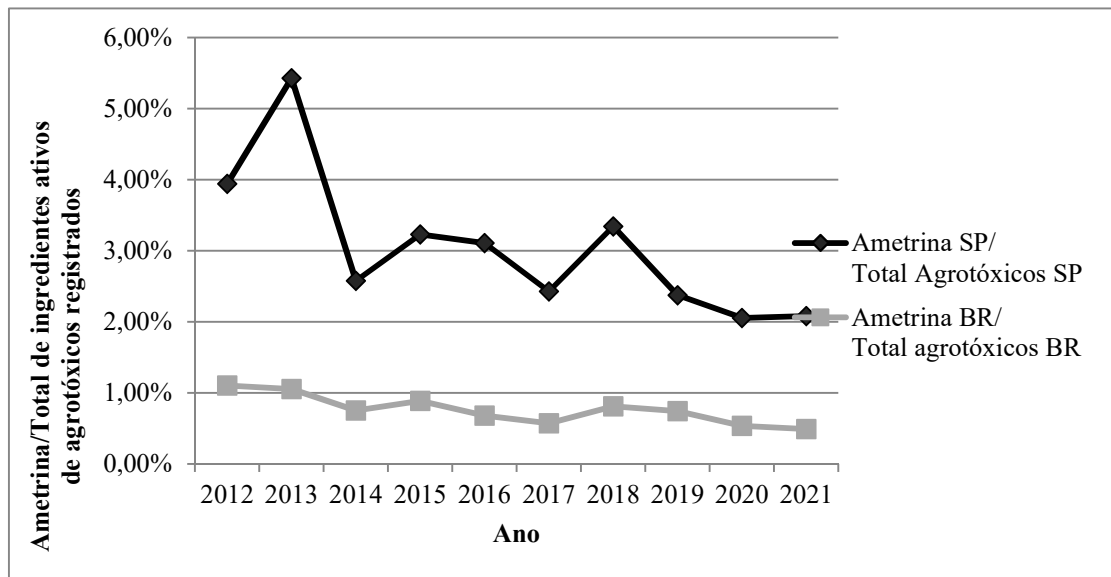
Ao observar dados ecotoxicológicos disponíveis em uma Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos da Ametrina (AMETRINA ALTA 500 SC, 2018), verifica-se que é considerada uma substância muito tóxica para ambientes aquáticos, em que já apresenta toxicidade em estudos anteriores tanto para algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), quanto para crustáceos (*Daphnia magna*) e peixes (*Danio rerio*). Neste mesmo documento, há a informação de que a ametrina se apresenta moderadamente persistente e que sua principal rota de degradação seja pelo metabolismo aeróbio no solo, tendo uma meia vida de 9,6 e 38 dias, entretanto, apresenta uma resistência maior a hidrólise com meia vida de 368 dias. (U.S. EPA, 2005).

**Tabela 1.** Boletins de Comercialização de agrotóxicos e afins: Histórico de vendas Comercialização de Ametrina entre os anos de 2012 e 2021

ANO	Ametrina comercializada em SP (Toneladas)	Ametrina comercializada em BR (Toneladas)	% Ametrina SP/ Ametrina BR	Nº de ingredientes ativos de agrotóxicos registrados	Total de Ingredientes Ativos Registrados comercializados em SP (Toneladas)	Total de Ingredientes Ativos Registrados comercializados em BR (Toneladas)	Ametrina SP/ Total de Agrotóxicos SP	Ametrina BR/ Total de agrotóxicos BR
2012	2944,03	4705,76	63%	83	74687,16	425778,99	3,94%	1,11%
2013	3626,99	4705,13	77%	85	66810,49	445863,40	5,43%	1,06%
2014	1.556,09	2.278,98	68%	76	60387,36	302456,67	2,58%	0,75%
2015	2324,35	3172,43	73%	78	71985,87	357948,65	3,23%	0,89%
2016	2028,36	3312,88	61%	80	65236,00	487177,53	3,11%	0,68%
2017	1666,33	2795,23	60%	88	68639,09	487590,86	2,43%	0,57%
2018	2448,77	4077,25	60%	88	73264,23	501693,07	3,34%	0,81%
2019	1964,26	4175,54	47%	89	82788,84	563458,19	2,37%	0,74%
2020	1827,34	3664,75	50%	309	88954,49	685745,68	2,05%	0,53%
2021	1892,51	3547,00	53%	313	90918,16	719507,44	2,08%	0,49%

Fonte: IBAMA (2012 à 2021).

**Figura 1.** Relação entre a comercialização de Ametrina e outros Ingredientes ativos no estado de São Paulo e em todo território Brasileiro



Fonte: Dados do boletim de comercialização de agrotóxicos (IBAMA,2022)

Os herbicidas que são utilizados no solo, de um modo geral, têm grande risco de se direcionarem aos lençóis freáticos, tendendo a ocorrer devido ao fluxo superficial. Desse modo, a probabilidade de que ocorra um desequilíbrio nesse ecossistema é grande. Isso pode acontecer apenas pelas características do solo tratado e pode aumentar devido às propriedades presentes nestes herbicidas. Além disso, com uma maior aplicação do produto em época de ocorrência de chuvas, essa probabilidade de contaminação tende a ser maior (ARMAS et al., 2007).

#### 1.4 Coluna de Winogradsky: Uma Ferramenta para Estudar Impactos em Ecossistemas Aquáticos

Uma técnica muito utilizada para análise de contaminação de ecossistemas aquáticos é a coluna de Winogradsky. Criada pelo microbiologista Sergei Winogradsky em 1880, é um microcosmo que permite observar o crescimento e a função de diferentes grupos de micro-organismos (GOMES et al., 2011). Nessa coluna são colocadas amostras de solo e de água do ambiente no qual se pretende analisar, ela é exposta à luz solar ou mesmo artificial. De acordo com as condições ambientais surgem estratificações desses grupos de micro-organismos. A vantagem dessa

técnica é que ela tem a capacidade de imitar um ambiente aquático (GAMAZO et al., 2005).

Apesar da coluna de Winogradsky poder ser utilizada para analisar os mais diversos tipos de microrganismos, o foco deste trabalho foi em avaliar a influência de diferentes concentrações de Ametrina nas populações fotossintetizantes de microalgas, para isso, o teste de determinação de clorofila a foi realizado. A clorofila a é responsável pelo processo de fotossíntese em algas e cianobactérias. Esse teste mede a quantidade de biomassa, indicando o crescimento das algas e cianobactérias (fitoplâncton). Importante para o estudo de avaliação de impacto de contaminantes. Sendo assim, levando em conta que as microalgas são essenciais para a manutenção da vida aquática, servindo tanto de alimento na base da cadeia alimentar, quanto de fornecedora de oxigênio para o meio, um grupo de organismos de grande relevância ecológica (CETESB, 2014).

### **1.5 Objetivos gerais da pesquisa**

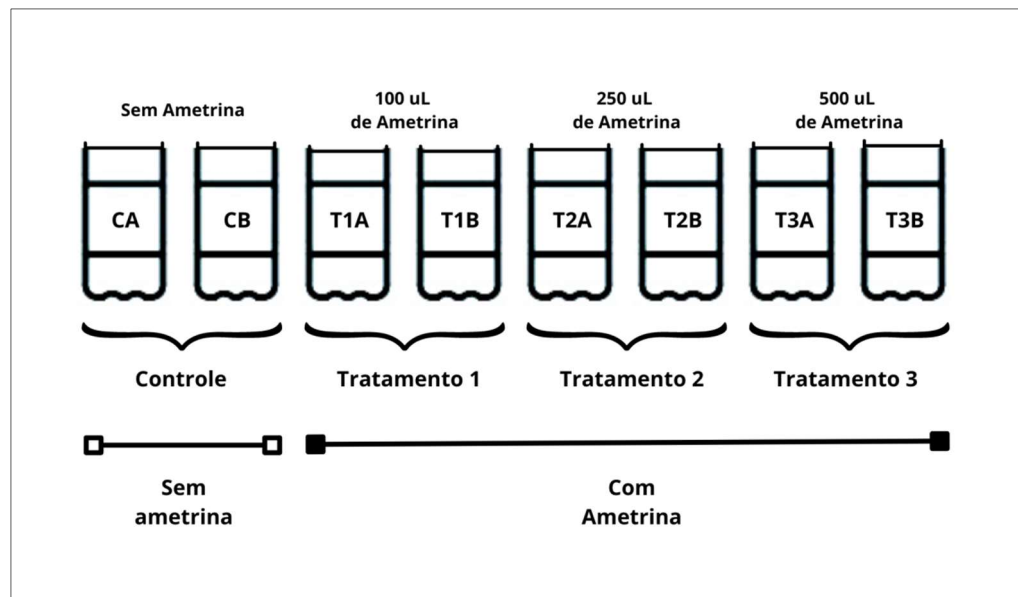
Neste contexto, o estudo tem como objetivos avaliar o impacto do herbicida Ametrina na comunidade de microalgas em um afluente de Ribeirão Claro. Isso incluiu a análise dos efeitos da substância nos parâmetros químicos e biológicos, como pH, condutividade e biomassa das microalgas, bem como a identificação de mudanças na composição da comunidade. O estudo buscou investigar mecanismos adaptativos das microalgas em resposta à presença do herbicida, destacando a importância de considerar os impactos de substâncias químicas em ecossistemas aquáticos para a conservação da biodiversidade microbiana e a saúde ambiental.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta das amostras de solo e água e montagem da coluna

A coleta do solo e da 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 utilizando recipientes plásticos para o solo e para água. A montagem das colunas se iniciou com o auxílio de uma balança semi-analítica (SHIMADZU), em que o solo e posteriormente os reagentes foram pesados para cada coluna (8 colunas ao todo): 500 g de sedimento, 4,5 g de sulfato de sódio, 0,2 g de carbonato de sódio, 0,2 g de fosfato de potássio, 0,5 g de sulfato de amônia, 0,5 g de papel picado (fonte de carbono). Utilizando um pipetador automático, cada coluna foi contaminada com as seguintes quantidades de ametrina:

**Figura 2.** Esquema experimental de montagem das colunas



Fonte: Autoria própria.

### 2.2 Avaliação de fatores como pH e condutividade da coluna

Para medição do pH, com o auxílio das soluções padrões ácida e básica verificou-se se o pHmetro está devidamente calibrado, caso estivesse, se iniciam as análises de cada amostra sempre higienizando o aparelho com água destilada entre a análise de uma amostra e outra e no final da utilização. Para verificação da calibração do condutímetro utilizou-se a solução padrão de 10 mS/cm.

Posteriormente se iniciaram as análises de cada amostra sempre higienizando o condutivímetro com água destilada entre a análise de uma amostra e outra e no final da utilização do aparelho.

### **2.3 Identificação e contagem das microalgas em diferentes alturas na coluna de Winogradsky**

Com o auxílio da pipeta, coletou-se material do fundo, da parte central e do topo da coluna para a montagem da lâmina. Utilizando o microscópio de luz Olympus CX41 e do Guia identificação de algas “Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil” (BICUDO & MENEZES, 2004) a identificação e listagem dos gêneros foi realizada.

Para contagem das microalgas coletou-se material do fundo, da parte central e topo da coluna com o auxílio de uma pipeta para montagem da câmara de Neubauer Knittel glaser. Utilizando o microscópio de luz Olympus CX41, realizou-se a contagem de células e se aplica a seguinte equação:

$$\text{n}^\circ \text{ total de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes}} * \text{diluição} * 10^4$$

### **2.4 Determinação de biomassa por clorofila-a**

Primeiramente, filtrou-se 10 mL da coluna com o auxílio do filtro e da membrana de ester de celulose em um béquer. Após a filtração, dobrou-se a membrana ao máximo e a colocou nos frascos de vidros envoltos por papel alumínio. Em cada frasco se coloca 10 mL de etanol 90%. Para o procedimento de banho-maria (que é realizado na capela), ligou-se o aparelho entre 60°C e 65°C e monitorou-se a temperatura com o auxílio de um termômetro esperando atingir a temperatura de 75° C. Nessa temperatura, colocou-se cada frasco de vidro em um béquer para inseri-los no aparelho por 5 minutos.

O gelo foi colocado em béquer e após o período de 5 minutos no banho-maria, realizou-se o choque térmico, colocando os frascos de vidro no béquer com gelo por 5 minutos. Após esse procedimento, foram colocados na geladeira por 24 h. O conteúdo líquido dos frascos de vidro foi passado para tubos de ensaio com tampa e

fazer a leitura no espectrofotômetro em dois comprimentos de onda (665 e 750 nm), lembrando-se de medir o branco primeiramente. Subsequentemente, foi colocada 1 gota de HCl em cada tubo e feita novamente as leituras nos dois comprimentos de onda e colocar os valores na seguinte equação:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g. L}^{-1}) = \frac{(E_b - E_a) \cdot (R/R - 1) \cdot K \cdot v}{V \cdot L}$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Coleta e montagem das colunas de Winogradsky

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 2). A água do ribeirão é considerada como de boa qualidade, atendendo aos requisitos de um ambiente saudável, o que é importante para o bom andamento do experimento.

A montagem das colunas foi realizada logo após a coleta e posteriormente foram colocadas em um local fechado que recebe uma boa quantidade de luz solar, fundamental para o desenvolvimento das algas e andamento do experimento.

**Figura 3.** Resultado final da montagem das colunas



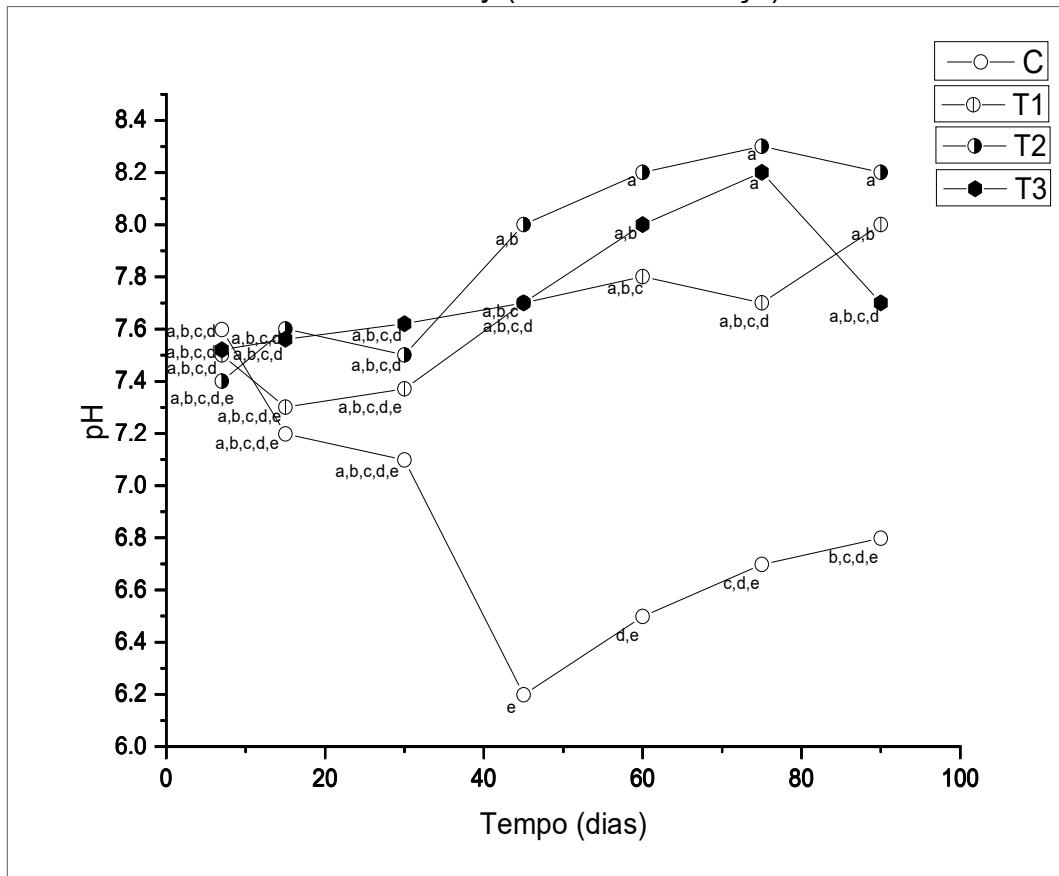
Fonte: Autoria própria.

#### 3.2 Avaliação de fatores como pH e condutividade

##### 3.2.1 Valor de pH

A média do valor de pH durante todo experimento encontrou-se próximo do valor 7,5 como pode ser observado na Figura 4. Isto denota pouca variação do pH no crescimento das algas na coluna de Winogradsky.

**Figura 4.** Valores do pH através do tempo (dias). Em que C corresponde ao controle, T1 ao tratamento 1, T2 ao tratamento 2, T3 ao tratamento 3. Médias que não apresentavam a mesma letra eram significativamente diferentes mediante ao teste de Tukey (95% de confiança).



Fonte: Autoria própria.

Um padrão interessante que pôde ser observado na variação de pH durante o tempo é que o comportamento entre as colunas de controle e as colunas com Ametrina teve um perfil quase inversamente proporcional, em que nos primeiros 30 dias todas as colunas se mantiveram com uma variação de pH baixas entre si, variando entre pH 7 e pH 7,6, após esse período ocorre a diferenciação entre as colunas contendo Ametrina e as colunas que não continham, em que as primeiras aumentam pra até 8,3 e o segundo grupo (sem Ametrina) diminui até 6,2.

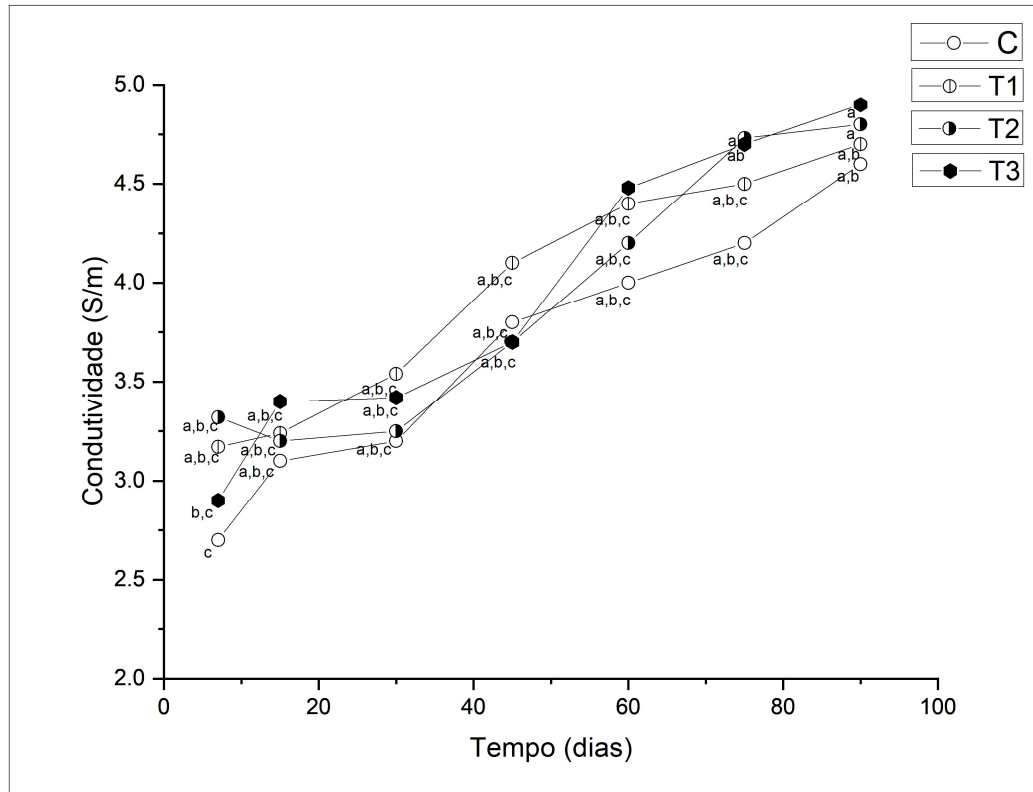
O motivo pelo qual o pH das colunas com o contaminante aumentou ao longo do tempo pôde estar relacionado com as atividades enzimáticas das nitrogenases e das hidrogenases presentes em alguns grupos de microalgas. Levando em conta que a Ametrina é um herbicida que age comprometendo a transferência de elétrons no fotossistema II dos organismos autótrofos no geral, causando colapso enzimático e produzindo muitas vezes radicais tóxicos de oxigênio a medida que o oxigênio

disponível é consumido e se torna escasso, acreditou-se que o metabolismo das cianobactérias que possuem nitrogenases é beneficiado em detrimento das outras microalgas e em consequência, o  $H_2$  resultante do metabolismo dessa enzima é consumido pelas hidrogenases, aumentando os níveis de  $H^+$  que são consumidos pelas nitrogenases realizando o consumo constante das quantidades de  $H^+$  e com isso o aumento de pH.

### 3.2.2 *Condutividade elétrica*

Na Figura 5, a condutividade elétrica aumentou com o passar do tempo. Isto pode ser explicado devido ao crescimento de algas e outros organismos fotossintetizantes de forma que a matéria orgânica aumentou e sua decomposição produz mais íons, assim a condutividade tem a tendência em aumentar os valores com o passar do tempo. É possível observar também que as colunas com maior concentração do contaminante possuem maior condutividade.

**Figura 5.** Valores da condutividade elétrica em função do tempo (dias). Em que C corresponde ao controle, T1 ao tratamento 1, T2 ao tratamento 2, T3 ao tratamento 3. A e B representam as duplicatas. Letras diferentes nos gráficos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) usando o Teste de Tukey



Fonte: Autoria própria.

### 3.3 Identificação e contagem das microalgas em diferentes alturas na coluna de Winogradsky

Os gêneros de microalgas foram identificadas utilizando o Microscópio de luz Olympus CX41 e o Guia de identificação de algas “Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil” (BICUDO & MENEZES, 2004).

**Tabela 2.** Espécies de microalgas encontradas nas diferentes zonas das colunas: Topo/Zona Aeróbia (T), Meio (M) e Fundo/Zona anaeróbia de acordo com cada tratamento. C- controle, 1- tratamento1, 2- tratamento, 3- tratamento 3. A e B referem-se às duplicatas.

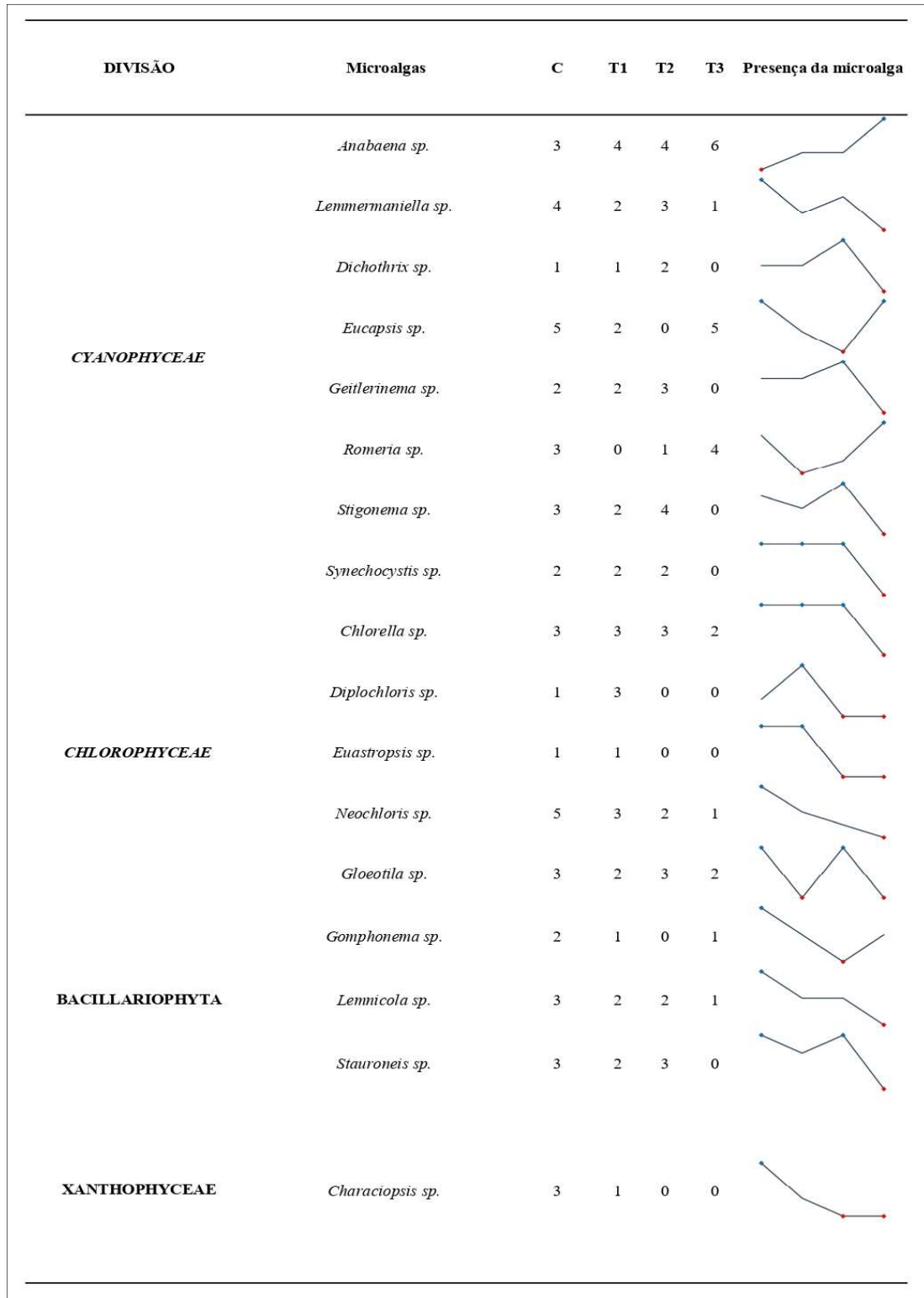
DIVISÃO	Microalgas	Colunas																										
		CA			CB			T1A			T1B			T2A			T2B			T3A			T3B					
		T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F			
CYANOPHYCEAE	<i>Anabaena sp.</i>	X	X		X			X			X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	<i>Lemmermaniella sp.</i>	X	X		X	X	X	X						X	X	X				X								
	<i>Dichothrix sp.</i>				X						X			X			X											
	<i>Eucapsis sp.</i>	X	X	X	X	X		X			X									X			X	X	X	X	X	X
	<i>Geitlerinema sp.</i>		X		X						X	X		X	X		X	X										
	<i>Romeria sp.</i>		X		X	X								X						X	X	X				X		
	<i>Stigonema sp.</i>	X			X	X		X						X	X		X	X		X	X							
	<i>Synechocystis sp.</i>	X			X						X	X		X			X											
CHLOROPHYCEAE	<i>Chlorella sp.</i>	X			X	X		X	X		X	X		X	X		X			X						X		
	<i>Diplochlorella sp.</i>	X						X			X	X																
	<i>Euastropsis sp.</i>				X									X														
	<i>Neochloris sp.</i>	X	X	X	X	X		X			X	X		X			X			X			X					
	<i>Gloeotila sp.</i>				X	X		X	X		X	X		X	X					X			X	X				
BACILLARIOPHYTA	<i>Gomphonema sp.</i>		X		X			X																		X		
	<i>Lemnicola sp.</i>				X	X		X	X		X	X		X	X								X					
	<i>Stauroneis sp.</i>	X	X		X			X	X		X	X		X	X					X								
XANTHOPHYCEAE	<i>Characiopsis sp.</i>				X	X	X				X																	

Fonte: Autoria própria.

A partir da Tabela 2, organizou-se os dados de cada espécie na Figura 6 pontuando a presença de 0 a 6, em que 0 corresponde a nenhuma presença no Topo/Zona Aeróbia (t), no Meio (M) e no fundo/Zona Anaeróbica em nenhuma das duplicatas de cada tratamento e 6 significa que apareceu em todas as três zonas de ambas as duplicatas de cada tratamento.

Ao analisar os dados da Tabela 2, foi possível observar que a grande maioria dos gêneros teve queda no seu desenvolvimento conforme o aumento da presença do herbicida, porém, três populações tiveram um resultado oposto, em que foram encontradas em maior número com o aumento das concentrações de ametrina, sendo elas a *Anabaena sp.*, *Eucapsis sp.* e *Romeria sp.* Esse grupo de espécies que tiveram um aumento em seu número com o aumento da ametrina, delimitamos como Ametrina + (Ametrina Positivas) e o grupo oposto com a maioria das espécies e que teve sua população diminuída com ametrina chamamos de Ametrina – (Ametrina negativas).

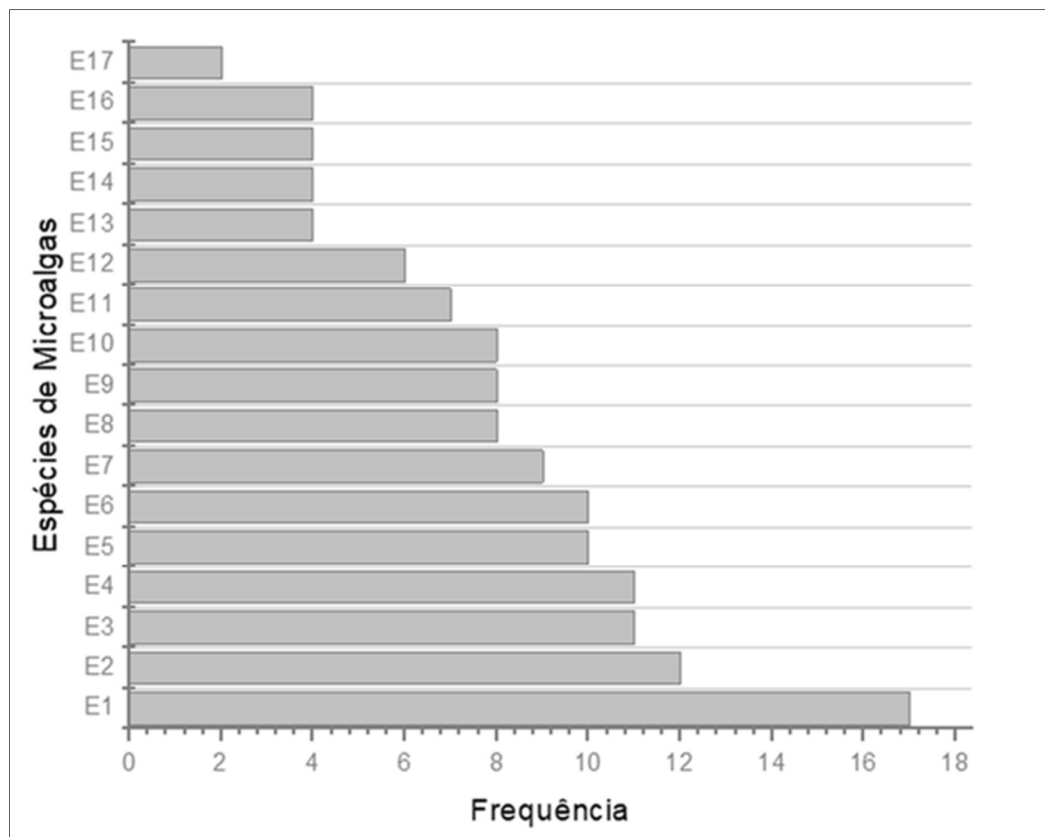
**Figura 6.** Índice de presença de microalgas de 0 a 6, em que 0 corresponde a nenhuma presença no Topo/Zona Aeróbia (t), no Meio (M) e no fundo/Zona Anaeróbica em nenhuma das duplicatas de cada tratamento e 6 significa que apareceu em todas as três zonas de ambas as duplicatas de cada tratamento.



Fonte: Autoria própria.

A frequência dos gêneros encontrados está representada no gráfico a seguir na Figura 7. O gráfico foi criado com base no número de vezes em que a espécie foi marcada na tabela 2.

**Figura 7.** Frequência de espécies de microalgas nas colunas de Winogradsky. A frequência é determinada pelo número de vezes em que a alga é encontrada na coluna, calculada através da Tabela 1, acima. Em que E1: *Anabaena sp.* E2: *Eucapsis sp.* E3: *Chlorella sp.* E4: *Neochloris sp.* E5: *Lemmermaniella sp.* E6: *Gloeotila sp.* E7: *Stigonema sp.* E8: *Romeria sp.* E9: *Lemnicola sp.* E10: *Stauroneis sp.* E11: *Geitlerinema sp.* E12: *Synechocystis sp.* E13: *Dichothrix sp.* E14: *Diplochloris sp.* E15: *Gomphonema sp.* E16: *Characiopsis sp.* E17: *Euastropsis sp.*



Fonte: Autoria própria.

Os dados da Tabela 2 e da Figura 7, localizados acima, mostram que algumas microalgas se desenvolveram com maior frequência que outras, sendo que as mais resistentes são as encontradas em grandes quantidades mesmo com a presença do herbicida ametrina. A que mais se destacou foi a *Anabaena sp.*, mostrando-se muito resistente sendo identificada em grandes quantidades de ametrina, como no caso do

tratamento 3, que apresenta 500 µL do produto. Esse gênero faz parte da família *Nostocaceae* e apresenta espécies de água doce e são frequentemente encontradas no plâncton ou perifiton, formam florações em lagos, represas e possuem toxinas, que em excesso se tornam causadoras de desequilíbrio ecológico e grandes problemas de saúde pública. Essas substâncias produzidas pelo gênero *Anabaena* são as principais e mais comuns cianotoxinas causadoras de intoxicações hepáticas, podendo resultar até mesmo em morte.

*Microalgas ametrina positivas (ametrina+)*

**Tabela 3.** Características taxonômicas, morfológicas e fisiológicas das espécies que predominaram em presença (Ametrina positivas) nas colunas com maior quantidade de ametrina (T3).

Filo	Ordem	Gênero	Adaptações presentes no grupo	Presença de microalgas em Ametrina na maior concentração (0 à 6)
	Nostocales	Anabaena	Com Heterocisto Com acineto Com cianotoxinas	6
Cyanobacteria	Chroococcales	Eucapsis	Sem heterocisto Sem acineto Com Mucilagem Com aerótopos	5
	Nodosilineales	Romeria	Sem heterocisto Sem acineto Com mucilagem	4

Fonte: Autoria própria.

A predominância de *Anabaena sp* nas colunas com maior quantidade de ametrina pode estar relacionada a liberação de cianotoxinas como Beta-N-metilamino-L –alanina na competição interespecífica das cianobactérias com e sem heterocisto (ZHANG, 2023). Em ambientes com alta presença de nitrogênio, como as colunas com ametrina, ambos os grupos de cianobactérias competem por espaço e nutrientes liberando esses aleloquímicos tóxicos que impedem o crescimento populacional uma da outra. Porém, com o aumento de matéria orgânica presente, o oxigênio disponível diminui e o grupo fixador de nitrogênio mantém vantagem adaptativa e prevalece em presença no local.

Esses fenômenos ecológicos e bioquímicos em conjunto com a diminuição de disponibilidade de oxigênio devido a interferência da ametrina no fotossistema II pôde explicar a predominância de *Anabaena sp.* nas colunas contendo ametrina.

A microalga *Eucapsis sp*, uma cianofícea pertencente à família Microcystaceae, foi outra frequente no ensaio. Este gênero caracteriza-se por ser colonial, sendo as colônias organizadas de forma cúbica, possuem um envelope mucilaginoso incolor e são bastante homogêneas e podem ser encontrada no metafiton de águas continentais, no Brasil.

Os espécimes de *Romeria sp.* são isolados e uma de suas características marcantes é o filamento curto, geralmente formado por uma a oito células e este gênero é habitante típico do plâncton de corpos d'água oligo a mesotróficos.

#### *Microalgas ametrina negativas (ametrina-)*

A *Chlorella sp.* é um grupo de microalgas pertencentes à família Chlorophyceae. Os representantes deste gênero habitam principalmente o plâncton de sistemas de águas paradas ou quase, dos tipos lagos e reservatórios, mas também podem ser coletados do solo, de ambientes subaéreos e do interior de protozoários ciliados. *Neochloris sp.*, pertencente à família Palmellaceae, são algas unicelulares, isoladas, dificilmente são avistadas em grupos, células periféricas, de parede celular evidente, a espécie é resistente à corpos d'água eutrofizados. *Lemmermaniella sp.* é colonial e planctônica. A forma esférica da colônia e a disposição das células abaixo da superfície do envelope mucilaginoso são as características distintivas deste grupo.

O gênero *Gloeotila* possui filamentos solitários, encontra-se flutuando na região litorânea de ambientes lênticos. Espécies do gênero *Stigonema* são encontradas em ambientes preferencialmente aquáticos, mas também nos aerofíticos. As espécies de água doce podem habitar rios e riachos, bem como lagos, lagoas, represas e similares em quase todas as regiões climáticas globais. A *Lemnicola sp.* e a *Stauroneis sp.* pertencem a família Bacillariophyceae e são células solitárias, apresentando valvas, podendo ser lineares a elípticas. (BICUDO & MENEZES, 2004).

**Tabela 4.** Riqueza de espécies ametrina+ (espécies que cresceram em presença de ametrina em comparação ao Controle) e de espécies ametrina- (ou seja, que diminuíram a sua presença com o aumento de concentração de ametrina). E a diferença de ambos os grupos de algas.

	Ametrina+	Ametrina -	Diferença
T1	7	10	3
T2	8	9	1
T3	3	14	11

Fonte: Autoria própria.

#### 4.3.2 Contagem de células de microalgas

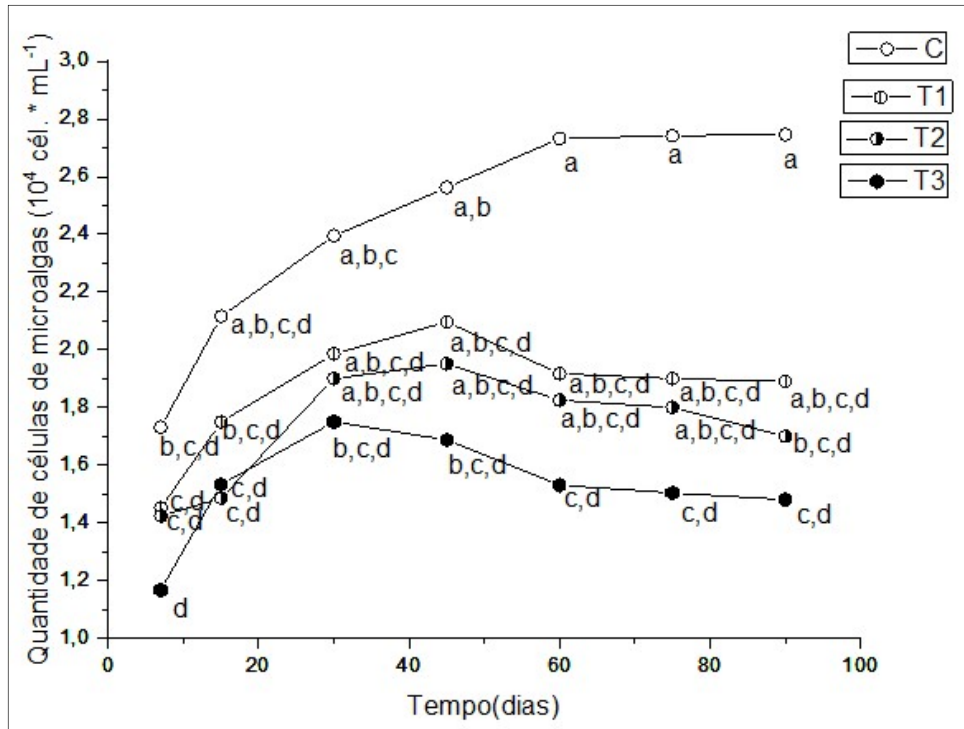
A quantidade de células de microalgas encontradas nas colunas de Winogradsky, é quantificada através da seguinte equação:

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

O resultado do número de células de microalgas encontrado através do cálculo anterior está representado na figura 8.

**Figura 8.** 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. Letras diferentes nos gráficos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) usando o Teste de Tukey.



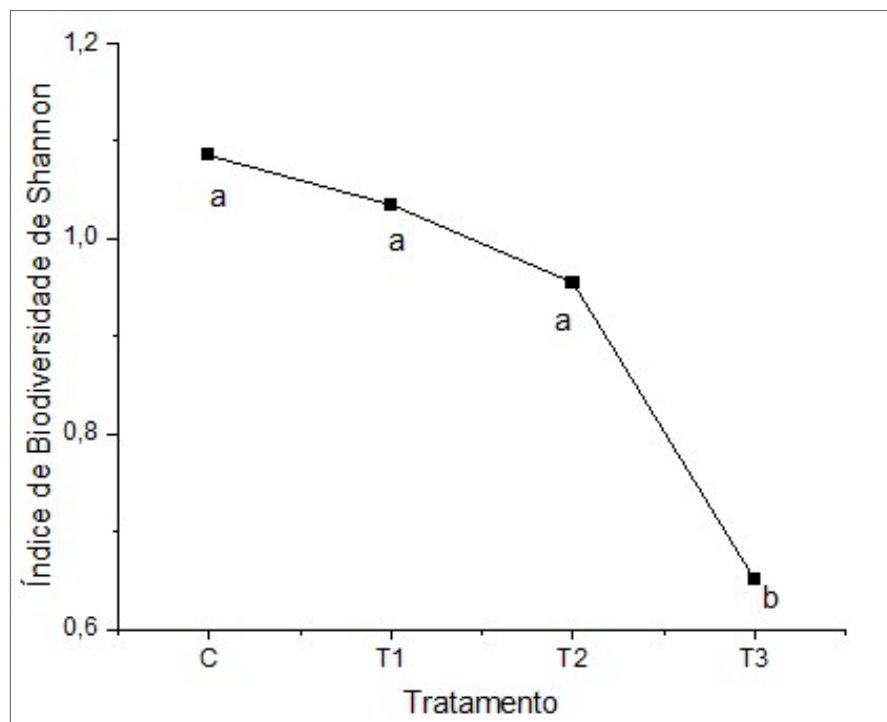
Fonte: Autoria própria.

Ao realizar um teste de normalidade de Shapiro-Wilk, encontrou-se que o primeiro valor de quantidade de células medido referente ao sétimo dia após a montagem das colunas T3(A e B) foi caracterizado como um outlier, ou seja, é um valor que é significativamente diferente dos outros valores na amostra. Ele pode ter sido causado por erros de medição, erros de entrada de dados ou simplesmente representar um valor extremo verdadeiro na população. Dessa forma, para melhor interpretar os dados sem sofrer distorções relevantes foi proposto utilizar métodos robustos que sejam menos sensíveis a valores extremos. Neste caso, optou-se por realizar a média truncada referente aos valores do dia 15 ao dia 90 e excluindo dessa forma da análise o outlier que poderia distorcer os resultados. Através dos dados apresentados na Figura 8, pode-se observar que a quantidade de células de microalgas é em certa medida inversamente proporcional à presença de ametrina, ou seja, quanto maior a quantidade dessa substância, menor o número de células.

### Índice de diversidade de Shannon

Ao calcular o índice em cada uma das colunas, nota-se que a diversidade diminui com o aumento da concentração de ametrina e o Tratamento 3 (T3) se diferenciou bastante estatisticamente quando aplicado o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), tendo como predominância poucas espécies (*Anabaena sp.*, *Eucapsis sp.* e *Romeria sp.*), como demonstrado na Figura 9.

**Figura 9.** Índice de Biodiversidade de Shannon entre as colunas após 90 dias de teste. (C) corresponde ao tratamento controle, (T1) corresponde ao tratamento 1, (T2) corresponde ao tratamento 2, (T3) corresponde ao tratamento 3. Letras diferentes nos gráficos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) usando o Teste de Tukey.



Fonte: Autoria própria.

### 3.4 Determinação de biomassa por clorofila-a

Após três meses de desenvolvimento da coluna de Winogradsky, os seguintes resultados foram observados na Tabela 5 em relação à quantidade de clorofila

presente em cada tratamento. Uma diferença significativa pode ser observada na quantidade de clorofila presente nas colunas de controle em comparação com as colunas com maior concentração do contaminante Ametrina (Tratamento 3). Isso pode indicar o impacto dessa substância nas comunidades de microalgas presentes neste ensaio ao longo do tempo.

**Tabela 5.** Quantidade de clorofila por litro em cada tratamento. Em que os valores do Controle, Tratamento 1, Tratamento 2 e Tratamento 3 correspondem às médias das duplicatas A e B de cada um.

Coluna	Quantidade de clorofila ( $\mu\text{g}^*\text{L}^{-1}$ )	
	1ª Análise	2ª Análise
Controle (A e B)	0, 538	0,33
Tratamento 1 (A e B)	0	0
Tratamento 2 (A e B)	0	0
Tratamento 3 (A e B)	0,005	0

Fonte: Autoria própria.

## 4 CONCLUSÕES

O experimento da coluna de Winogradsky foi realizado para analisar a interferência do herbicida ametrina na evolução de um ecossistema aquático. Os resultados obtidos demonstraram que essa substância causou modificações na constituição da biota aquática que, neste caso, é constituída por microalgas, a base da cadeia alimentar e que constitui importante papel na produção de oxigênio terrestre e desta maneira, estes organismos atuaram como bons candidatos a bioindicadores para avaliação do impacto desta substância neste microcosmo.

O teste de contagem de células de microalgas mostrou ter tido interferência da Ametrina, em que houve diminuição das mesmas com o aumento da presença deste herbicida. A ametrina também mostrou alterar a composição das microalgas do meio, apresentando diferentes espécies e a frequência das mesmas em cada tratamento.

É importante ressaltar, que provavelmente, o crescimento das algas não foi tão expressivo por conta da coloração esverdeada do recipiente utilizado para montagem das colunas, o que pode ter diminuído a quantidade de luz solar que esses microrganismos recebiam. Outro fator que pôde ter influenciado e beneficiado organismos que possuem metabolismo anaeróbio (facultativo ou obrigatório) foi a utilização de papel filme para cobrir as colunas e evitar evaporação da água e contaminação de substâncias externas. Entretanto é recomendado analisar outros microrganismos presentes (como bactérias e fungos) e também da análise contínua de biomassa desde o início da construção das colunas.

Com isso, pôde-se chegar à conclusão através desse estudo, que o herbicida ametrina pode possuir ação inibidora dependendo da concentração no desenvolvimento da maioria das espécies de algas encontradas nas colunas. Algumas espécies se adaptaram e inclusive tiveram um aumento de suas populações na presença de microalgas. O fenômeno observado foi, possivelmente, devido a suas características morfológicas e fisiológicas desses organismos, como a presença de heterocisto e atividade enzimática de nitrogenases e hidrogenases. Levando em conta que a ametrina é um herbicida que age comprometendo a transferência de elétrons no fotossistema II dos organismos autótrofos no geral, causando colapso enzimático e produzindo muitas vezes radicais tóxicos de oxigênio à medida que o oxigênio disponível é consumido e se torna escasso, o metabolismo das cianobactérias que possuem nitrogenases é beneficiado em detrimento das outras microalgas e em

consequência, o  $H_2$  resultante do metabolismo dessa enzima é consumido pelas hidrogenases, aumentando os níveis de  $H^+$  que são consumidos pelas nitrogenases realizando o consumo constante das quantidades de  $H^+$  e com isso o aumento de pH.

A predominância dessas espécies, em especial da *Anabaena sp.* é um ponto a ser considerado no manejo do descarte e utilização desse agroquímico, pois como foi discutido, esse gênero de cianobactérias que teve crescimento positivo com o aumento da Ametrina é bastante conhecido por produzir substâncias altamente tóxicas para humanos e outros animais aquáticos e terrestres. Sobretudo, recomenda-se considerar a importância de manter políticas de acompanhamento através dos relatórios de qualidade de água a presença tanto deste agrotóxico quanto das neurotoxinas produzidas por esses microrganismos nos setores públicos e privados.

## 5 REFERÊNCIAS

AMETRINA ALTA 500 SC. Ficha de informação de segurança de produto químico – FISPQ. Ametrina Alta 500 SC. Disponível em: <<https://www.altadefensivos.com.br/wp-content/uploads/2019/09/Ametrina-ALTA-500-SC-FISPQ.pdf>> Acesso em 19 de janeiro de 2023.

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.

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.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

IBAMA. Boletim de Comercialização de agrotóxicos e afins: Histórico de vendas 2012 a 2021. Brasília: DIQUA/CGASQ. Brasília: Ibama, 2022.

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.

CAMPOS, A. L. de, IGNÁCIO, Á. R. A., OLIVEIRA Junior, E. S., & Lázaro, W. L. (2021). O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. **Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente**, 14(1), e007934. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n1e007934>

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

DUTRA, Rodrigo Marciel Soares; SOUZA, Murilo Mendonça Oliveira de. Brazilian Savanna, green revolution and the evolution of pesticides consumption. **Sociedade & Natureza**, v. 29, p. 473-488, 2022.

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

GOMES, A. Utilização da Coluna de Winogradsky para a demonstração do efeito dos metais pesados na micro-biota 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.

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

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.

MARGULIS, L.; SAGAN, D. *Microcosmos: Four billion years of microbial evolution*. Univ of California Press, 1995.

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 03 March 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 10 March 2023

NORRIS, R.H. & THOMS, M.S. What is a River Health. Cooperative research centre for fresh water ecology, university of Canberra, ACT 2601, Canberra, Australia. *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.

PARRA-ARROYO, Lizeth et al. Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. ***Science of The Total Environment***, v. 807, p. 151879, 2022.

SABZEVARI, Shiva; HOFMAN, Jakub. A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils. *Science of The Total Environment*, v. 812, p. 152344, 2022.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Ametryn. Washington, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Ametryn. Washington, D.C., United States of America, 2005.

ZHANG, Y. et al. Harmful cyanobacteria-diatom/dinoflagellate blooms and their cyanotoxins in freshwaters: a nonnegligible chronic health and ecological hazard. ***Water Research***, p. 119807, 2023.