
ECOLOGIA

NIELLY DE FREITAS LIMA

**CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTE AQUÁTICO PELO HERBICIDA
TEBUTIURON EM COLUNAS DE WINOGRADSKY:
CONSEQUÊNCIAS PARA A BIOTA**



Rio Claro
2021

NIELLY DE FREITAS LIMA

CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTE AQUÁTICO PELO HERBICIDA
TEBUTHIURON EM COLUNAS DE WINOGRADSKY: CONSEQUÊNCIAS
PARA A BIOTA

Orientador: Ederio Dino Bidóia

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 Bacharela em Ecologia.

Rio Claro
2021

L732c Lima, Nielly de Freitas
Contaminação de ambiente aquático pelo herbicida Tebutiurum em
colunas de Winogradsky: Consequências para a biota / Nielly de
Freitas Lima. -- Rio Claro, 2021
47 f. : il., tabs., fotos

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

1. Contaminação de ambiente aquático. 2. Toxicidade de herbicida.
3. Colunas de Winogradsky. 4. Herbicida Tebutiurum. I. 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.

AGRADECIMENTOS

Não há pessoas mais importantes para agradecer que meus pais e minha família, que me deixaram sair de casa para viver meu sonho a 345 km de distância: fazer graduação em Ecologia. Obrigada por todo o apoio e incentivo durante todos esses anos e por nunca saírem do meu lado mesmo que de longe, sempre me deram condições de continuar meus estudos e aguentaram comigo a saudade apertada.

Agradeço também ao meu orientador Edério pela paciência e pela oportunidade de realizar este projeto em seu laboratório, que me ajudou em todo desenvolvimento da escrita com muita sabedoria e atenção.

Obrigada a todos os colegas de laboratório que deixaram os dias de pesquisas mais divertidos, Graziela, Iuri e em especial ao Apraham que dedicou muito do seu tempo para me ensinar todos os métodos, técnicas e testes, ajudar a realiza-los, me acompanhando nos primeiros meses para que tudo desse certo e por sempre nos ajudar tirando nossas dúvidas quando precisávamos.

Agradeço aos meus professores de graduação que me fizeram crescer como profissional e como pessoa, aprendi muito mais do que as matérias com vocês.

Agradeço por toda a turma de ecologia 2017, com quem dividi tantos momentos. A todos meus veteranos, até mesmo de outros cursos, que me receberam e me ajudaram no início, e que viraram amigos muito especiais.

Agradeço a todos os grandes amigos que fiz durante esses quatro anos, em especial amigos da República Mansão e República Rawr, com quem aprendi como a vida é bem maior do que imaginamos, que me ajudaram a não desistir, e me proporcionaram tantos momentos, conversas e sentimentos maravilhosos a cada dia, vocês foram essenciais e estarão pra sempre em meu coração.

Agradeço também toda a equipe do Viva Container, com a qual trabalhei por mais de dois anos, Thais, Renato, Cainã, Ramon, Lucas, Stephanie, Andressa e todos que passaram por lá, vocês me acolheram nesta família e me ensinaram valores pra vida toda. Com vocês pude me desafiar a cada dia de trabalho, trabalhar minhas qualidades e meus defeitos. Sou muito feliz de ter feito parte da história de vocês, ter acompanhado o crescimento deste sonho e ter ganhado amizades tão puras e tão sinceras.

A todas as pessoas que colaboraram para minha formação, sou eternamente agradecida.

RESUMO

A utilização do herbicida Tebutiurum pode causar impactos negativos no meio ambiente, uma vez que, quando aplicado em plantações, não atinge somente a planta alvo, mas sim, outros setores do ambiente, como o ar, solo, corpos d'água e pode atingir águas subterrâneas poluindo-as e contaminando os organismos presentes, causando desequilíbrios no ecossistema. Este herbicida é muito utilizado no estado de São Paulo para culturas de cana-de-açúcar e atua inibindo o fotossistema II das plantas, este foi escolhido por apresentar alta mobilidade no solo, ser considerado perigoso ao meio ambiente e medianamente tóxico. O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação e análise da microbiota proveniente de um ecossistema aquático contaminado com herbicida Tebutiurum e determinação de biomassa por clorofila, através de colunas de Winogradsky por 60 dias. As colunas receberam seis tratamentos: 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm e a coluna controle sem adição do contaminante. Foram realizados testes de clorofila e demanda química de oxigênio (DQO) quinzenalmente e testes microbiológicos (Unidades Formadoras de Colônias), pH, condutividade e de fitotoxicidade semanalmente. A presença do Tebutiurum não impediu o crescimento dos organismos fotossintetizantes e da biomassa de clorofila a e b, porém influenciou no tempo de crescimento e na quantidade de clorofila encontrada. Quanto maior a concentração de Tebutiurum, maior foi a influência deste sobre os organismos presentes e/ou os processos realizados pelos mesmos e todos os parâmetros avaliados apresentaram algum grau de sensibilidade ao herbicida testado, com exceção do pH e Condutividade que não tiveram diferenças significativas em comparado a coluna controle.

Palavras Chaves: Herbicida; Tebutiurum; Colunas de Winogradsky; Toxicidade.

ABSTRACT

The use of the herbicide Tebutiuron can cause negative impacts on the environment, since when applied to plantations, it not only affects the target plant, but also other sectors of the environment, such as air, soil, water bodies and can reach waters polluting them and contaminating the organisms present, causing imbalances in the ecosystem. This herbicide is widely used in the state of São Paulo for sugarcane crops and acts by inhibiting plant photosystem II, it was chosen because it presents high mobility in the soil, is considered dangerous to the environment and moderately toxic. The present work had as general objective the evaluation and analysis of the microbiota from an aquatic ecosystem contaminated with Tebutiuron herbicide and determination of biomass by chlorophyll, through Winogradsky columns for 60 days. The columns received six treatments: 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm and the control column without adding the contaminant. Chlorophyll and chemical oxygen demand (COD) tests were performed biweekly and microbiological tests (Colony Forming Units), pH, conductivity and phytotoxicity tests weekly. The higher the concentration of Tebutiuron, the greater its influence on the organisms present and / or the processes carried out by them, and all parameters evaluated showed some degree of sensitivity to the tested herbicide, except for pH and conductivity, which did not have significant differences in compared to the control column.

Key words: Herbicide; Tebutiuron; Winogradsky columns; Toxicity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Agricultura.....	8
1.2 Agroquímicos e seus impactos.....	9
1.3 Herbicida Tebutiurum.....	11
1.4 Coluna de Winogradsky e técnicas de análises.....	11
1.5 Teste fitotóxico.....	12
 2 OBJETIVOS.....	 13
2.1 Objetivos gerais.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 13
3.1 Coleta de água.....	13
3.2 Local do experimento.....	14
3.3 Solução estoque de Tebutiurum.....	14
3.4 Coluna de Winogradsky.....	14
3.5 Análises físico-químicos.....	16
3.6 Análises microbiológicas.....	17
3.6.1 Preparo da água de diluição.....	17
3.6.2 Método de diluição de amostras.....	17
3.6.3 Preparo do meio de cultura Plate Count Agar.....	17
3.6.4 Inoculação, incubação e contagem.....	18
3.7 Testes analíticos.....	20
3.7.1 Demanda química de oxigênio (DQO).....	20
3.7.2 Preparo dos reagentes.....	21
3.7.3 Confeção da curva padrão e montagem da equação para análise de DQO.....	21
3.8 Testes de pigmentos fotossintéticos: Clorofila A e Clorofila B.....	23
3.9 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de Lactuca sativa.....	24
3.10 Análise de dados	26
 4 TRATAMENTO E DESCARTE DE RESÍDUOS DA PESQUISA.....	 27

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Resultados e discussão Coluna de Winogradsky.....	27
5.2 pH e Condutividade Elétrica.....	29
5.3 Teste microbiológico.....	32
5.4 Testes de pigmentos fotossintéticos.....	34
5.5 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	36
5.6 Testes de fitotoxicidade em Lactuca sativa.....	38
 6 CONCLUSÃO.....	 42
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agricultura

A exploração desenfreada da natureza pelo homem está tomando caminhos cada vez mais alarmantes. A má utilização dos recursos naturais e a falta de consciência sobre suas consequências mostram que a natureza ainda tem muito a perder.

A partir da Revolução Industrial e Revolução Verde o homem começou a se especializar em técnicas de cultivo de suas plantações, transformando e expandindo as práticas de agricultura, silvicultura, horticultura e monocultura, e novas tecnologias, as quais visam sempre a maior produtividade. (SILVA et al., 2005). Dentre as razões destas transformações, pode-se destacar o grande incentivo de utilização de insumos e maquinários na produção agropecuária que aumentavam o setor agroindustrial, e enriqueciam-no. (MENASCHE et al., 2008). A agricultura então, que antes se constituía somente como meio de vida dos agricultores e suas famílias, se tornou uma atividade destinada ao uso comercial e a necessidade de alimentar uma população mundial cada vez maior. (SILVA et al., 2005).

A alta necessidade de uma produção em massa para atender todo o mercado alimentício e toda a população, levou a criação e utilização de máquinas e ferramentas motorizadas que agilizassem e facilitassem o trabalho que os humanos não poderiam mais dar conta. E a necessidade de que os produtos fossem bonitos aos olhos do comprador e perfeitos para venda, levou a procura de alternativas que melhorassem a produção em todos os sentidos: rapidez, quantidade, tamanho, resistência, cor e sabor. (MAZOYER & ROUDART, 2008). Além do início da chegada de grandes problemas nas plantações como invasões de ervas daninhas, doenças e ataque de insetos, a qual se resultava na perda de aproximadamente de 50% de toda produção agrícola dos países, de acordo com pesquisas da FAO. (OCTAVIANO, 2010), não restando muitas alternativas a não ser a utilização de químicos.

Iniciou-se então, a grande utilização de insumos, agrotóxicos e de métodos de melhoramento genético de plantas, culturas de armazenamento em condições insatisfatórias. Essas práticas, mesmo sendo eficazes contra os problemas de uma produção, começaram a gerar problemas ambientais para o solo, plantas,

dispersores, efluentes etc., e pela pouca competitividade aumentou-se ainda mais a reprodução de plantas daninhas e de predadores, que tem a capacidade de se alastrar rapidamente no ambiente, se transformando em pragas e iniciando grandes problemas econômicos. (ANDRADE, 1995).

Em 1867, iniciou-se a utilização dos agrotóxicos atuais com a chegada do verde-paris (aceto arsenito de cobre), produto muito comercializado na época e aplicado em grande escala para o combate de pragas. A partir de então, outros produtos e compostos inorgânicos foram criados, assim como os compostos advindos de vegetais. Após a segunda guerra mundial foram descobertos os compostos organossintéticos que, por sua alta performance no controle de pragas e durabilidade, substituiu os inseticidas naturais e inorgânicos. (ANDRADE, 1995).

Hoje, os agrotóxicos conhecidos e utilizados na monocultura e outras atividades são, além dos inseticidas (controle de insetos), os fungicidas (controle de fungos) e os herbicidas (controle de ervas daninhas), que se tornaram muito importantes para a resolução de problemas na agricultura. (ANDRADE, 1995).

1.2 Agroquímicos e seus impactos

Agrotóxicos, herbicidas, praguicidas, pesticidas, biocidas e defensivos agrícolas são os nomes dados as substâncias químicas, sintéticas ou naturais, que ajudam a combater de algum modo as pragas, matando-as ou controlando-as. Ou em um sentido mais amplo: é tudo aquilo que mata, lesa, ataca ou transmite enfermidade às plantas, animais e ao homem. (ANDRADE, 1995).

Após a segunda guerra mundial houve a diversificação das atividades industriais que passaram a atuar no ramo dos pesticidas, a partir de compostos intermediários usados na produção de corantes, que impulsionaram a constituição e solidificação da indústria química. Na década de quarenta foram introduzidas inovações primárias, com a produção de organossintéticos que substituíram os produtos inorgânicos, levando ao final da antiga tecnologia de agroquímicos. (MARTINS, 2000).

Os produtos organossintéticos se destacaram pela sua persistência no meio ambiente e alta eficácia com as pragas, mas acabaram obtendo resultados

negativos para o meio, poluindo e resultando em desequilíbrios biológicos. (MARTINS, 2000).

Martins (2000) afirmou que alguns fenômenos são criados pelo próprio homem a partir da utilização dos agroquímicos, como: a capacidade de resistência das espécies ao mesmo após determinado tempo, através do processo de reprodução no qual os indivíduos mais aptos se adaptam e sobrevivem, deixando descendentes que são imunes ao composto; e a alta capacidade reprodutiva quando se está em baixo índice populacional, uma vez que os inimigos primários são eliminados, surge espaço para o desenvolvimento de espécies de ervas daninhas secundárias que se alastram rapidamente (MARTINS, 2000), sendo necessário uso de novos pesticidas ou herbicidas para essas novas espécies. O autor destacou:

“Trata-se de uma indústria peculiar. São os problemas gerados por ela própria, visualizados somente após o consumo de seus produtos pelos agricultores, que asseguram a manutenção de uma intensa atividade de P&D, ou seja, as inovações criaram problemas e outras novas são destinadas a superar os problemas gerados com a resistência dos seres vivos aos produtos lançados anteriormente (mais antigos), bem como, a apresentarem menos efeitos toxicológicos ao meio ambiente.”

Ao longo do tempo os compostos e produtos antigos foram sendo substituídos por outros cada vez mais seletivos e que trariam menor efeito residual para o meio ambiente. Assim como foram feitos os trabalhos com os primeiros herbicidas criados, continuamente aprimorados até obter resultados satisfatórios em questões de seletividade e letalidade. (MARTINS, 2000).

Os herbicidas são compostos que quando aplicados em áreas agrícolas, somente uma pequena porcentagem atinge a "planta alvo", e a outra parte acaba atingindo outros setores do ambiente tanto pela aplicação direta do produto, lavagem das folhagens pela água das chuvas, ou ainda pela decomposição de restos vegetais contendo o agroquímico. (SOUZA, 2007). Desta forma, se tornam um poluente para o solo e também para as águas subterrâneas, uma vez que resíduos do herbicida no solo podem chegar até lençóis freáticos e ser transportados por água das chuvas até rios e mares. (MARTINS, 2000).

O herbicida, juntamente com todos os pesticidas criados, que no início foram considerados como soluções, começaram também a apresentar problemas de saúde para pequenos mamíferos e para os trabalhadores que transportavam e inalavam estes produtos, contendo muitas vezes propriedades cancerígenas. Um exemplo é o DDT, o pesticida mais antigo conhecido, que após a realização de inúmeras pesquisas, constatou-se que afetava animais e humanos reduzindo a produção de leite materno, afetando o cérebro, causando defeitos nas transmissões de sinais pelos neurônios e suspendendo o sistema imunológico. (MARTINS, 2000).

1.3 Herbicida Tebutiuron

O Herbicida Tebutiuron, é um herbicida seletivo, de ação sistêmica, do grupo químico Ureia e Grupo C2, segundo a classificação internacional do HRAC (Comitê de Ação à Resistência de Herbicidas), este atua inibindo a fotossíntese no fotossistema II. (HRAC – BR, 2020).

É um herbicida recomendado e registrado no Brasil para o controle de plantas infestantes monocotiledôneas e dicotiledôneas, na cultura da cana-de-açúcar (cana-planta ou cana-soca), sendo aplicado diretamente no solo. (BULA COMBINE 500, 2019; SOUZA, 2007). Muito utilizado no estado de São Paulo.

Considerado perigoso para o meio ambiente e medianamente tóxico. É altamente tóxico para algas e tem alta mobilidade no solo, podendo atingir águas subterrâneas e outros ambientes aquáticos, além de ser um componente perigoso para a saúde humana em caso de má utilização de equipamentos, manuseio e inalação do produto. (BULA COMBINE 500, 2019). Deste modo, fazem-se necessários estudos acerca da degradação ou remoção de resíduos deste herbicida no ambiente aquático, visto seu potencial toxicológico para o meio.

1.4 Coluna de Winogradsky e técnicas de análises

Uma técnica muito utilizada em análises de contaminação de ecossistemas aquáticos é a coluna de Winogradsky. Técnica criada pelo microbiologista Sergei Winogradsky, em 1880. Trata-se de um microambiente ou microcosmo que tem a capacidade de imitar um ambiente aquático e permite observar o crescimento e as

funções de diferentes grupos de micro-organismos. (GOMES et al., 2011). Nas colunas montadas são colocadas amostras de água e de solo do ambiente no qual se pretende estudar, sendo expostas à luz solar ou mesmo artificial. De acordo com as condições ambientais, e a presença ou não de algum tratamento, surgem com o tempo certos grupos de micro-organismos, sendo bioindicadores do que está acontecendo naquele ambiente.

Outra técnica que pode ser utilizada quando se fala em poluição aquática, é o teste de determinação de clorofila a e b. A clorofila é um pigmento responsável pela fotossíntese nas plantas, algas e cianobactérias e por realizar funções metabólicas, como produção de oxigênio, açúcares e captação da luz solar. Dentre esse grupo, a *clorofila a* pode ser considerada o pigmento mais recorrente desta classe, representando 75% dos pigmentos verdes presentes nas plantas, normalmente utilizada como indicadora de biomassa do fitoplâncton, e de crescimento de algas e cianobactérias em razão do enriquecimento por nutrientes. (MAESTRIN, 2009). Já a *clorofila b* tem menor ocorrência e menor papel no processo da fotossíntese, sendo um pigmento acessório que ajuda a ampliar a faixa de luz utilizada pela fotossíntese. (RAVEN et al., 2007).

Esse teste mede a quantidade de biomassa, indicando o crescimento das algas e cianobactérias (fitoplâncton) nas matrizes aquosas, sendo importante para o estudo de avaliação de impacto de contaminantes. (MAESTRIN, 2009). Além dos testes para acompanhamento de variáveis físico-químicas e biológicas da água, com pH, condutividade elétrica, demanda química de oxigênio (DQO), e testes microbiológicos, que influem a qualidade da água.

1.5 Teste fitotóxico

O teste de fitotoxicidade é outra opção para se avaliar a toxicidade de um composto. São análises consideradas de curto prazo, economicamente viável e avaliam os efeitos de toxicidade aguda. Neste teste as sementes são plantadas ou germinadas em solo ou em água, recebendo o tratamento desejado e, após o período de incubação, são acompanhadas a germinação, ou não, na presença do poluente. Esse procedimento é amplamente utilizado como uma ferramenta no

monitoramento ambiental, principalmente durante processos de remediação. (ALMUTAIRI et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente projeto teve como objetivo geral a avaliação e análise da microbiota proveniente de um ecossistema aquático contaminado com herbicida Tebutiuron e determinação de biomassa por clorofila-a.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a biota da coluna de Winogradsky de água contaminada com herbicida Tebutiuron;
- II. Realizar a determinação de biomassa por clorofila-a e b;
- III. Avaliar fatores como pH, condutividade, DQO, e Unidades formadoras de colônias (UFCs) na coluna;
- IV. Verificar a fitotoxicidade do herbicida Tebutiuron na coluna de Winogradsky utilizando sementes de *Lactuca sativa*.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta de água

A coleta de água e sedimento foi realizada no tanque paisagístico localizado na universidade UNESP de Rio Claro, contendo vegetação tanto alta como rasteira, alguns pequenos vertebrados, microrganismos e matéria orgânica em decomposição. Sua água é reabastecida por chuva em sua maior parte e não tem contato com poluentes. Representando então, um ambiente semelhante a de um lago, foi escolhido para ser usado no experimento, uma vez que, sua água seja

considerada como de boa qualidade, atendendo aos requisitos de um ambiente saudável, o que é importante para a veracidade do experimento.

3.2 Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp – Rio Claro.

3.3 Solução estoque de Tebutiurum

O Tebutiurum por ser um químico forte e com pouca facilidade de dissolução em água, foi diluído previamente em água, criando uma solução estoque (KAUR, et al., 2018). A solução foi feita adicionando 1g de Combine em 1 litro de água, onde desse 1g, somente 0,5g são de Tebutiurum em sua composição.

3.4 Coluna de Winogradsky

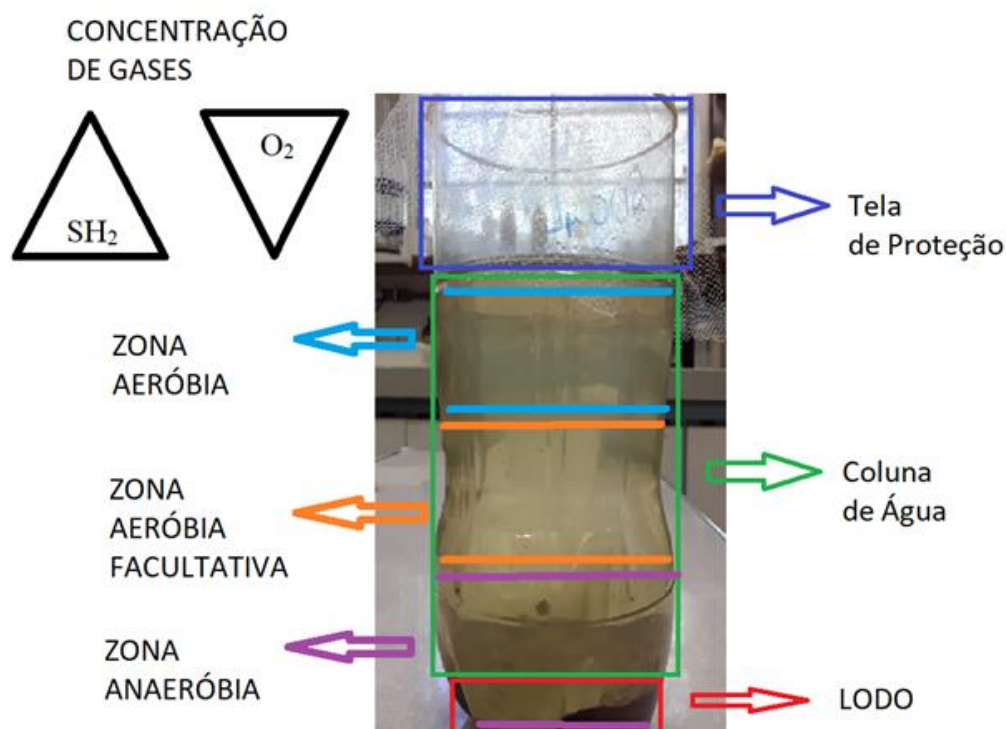
A coluna foi composta por uma camada de sedimento do tanque juntamente com a água coletada, sendo adicionados em garrafas plásticas de 2L, previamente cortadas e limpas. A altura da coluna permite o aparecimento de um gradiente de oxigênio, existindo uma zona aeróbica nas porções mais superficiais e uma zona anaeróbica nas porções basais (Figura 1). Sendo possível distinguir e notar a presença de alguns grupos de bactérias e microrganismos fotossintetizantes passado algum tempo depois da montagem. (GOMES et al., 2011).

As colunas foram expostas à luz solar afim de favorecer o crescimento de populações de organismos fotossintetizantes, e o sedimento foi enriquecido com sulfatos, sulfetos e carbono orgânico permitindo o desenvolvimento de seres autotróficos e fotoautotróficos como exemplo as bactérias do enxofre anaeróbicas. (GRANT et al., 1989). A extremidade superior da garrafa será coberta por uma tela de proteção, para evitar a entrada de pequenos invertebrados.

Os testes da coluna de Winogradsky foram realizados baseando-se na metodologia de Loss (2003). Para cada coluna foram utilizadas 100 g de sedimento

do tanque da UNESP, 4,5 g de Na_2SO_4 , 0,2 g de Na_2CO_3 , 0,2 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de celulose em pó, fonte de carbono e 1000 mL de água coletada no mesmo tanque.

Figura 1: Esquema de coluna de Winogradsky



Fonte: APRAHAM, 2020.

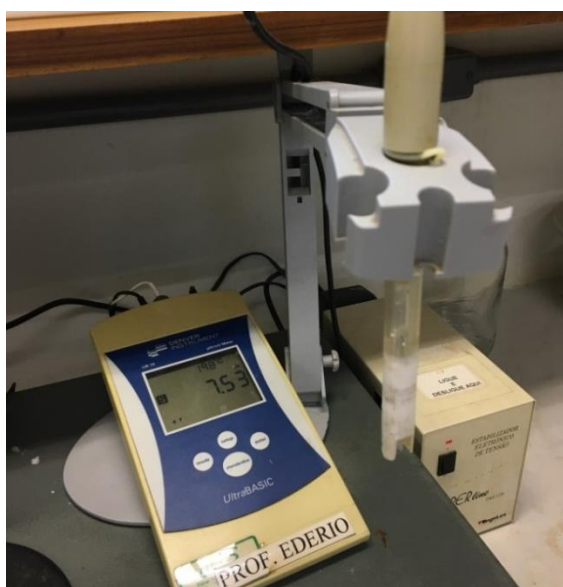
Com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento do ambiente com a presença do herbicida Tebutiuron, nesse experimento as colunas receberam os seguintes tratamentos:

- Controle (C): sem adição do herbicida Tebutiuron;
- Tratamento 1: 100 μL do herbicida Tebutiuron;
- Tratamento 2: 250 μL do herbicida Tebutiuron;
- Tratamento 3: 500 μL do herbicida Tebutiuron;
- Tratamento 4: 1000 μL do herbicida Tebutiuron;
- Tratamento 5: 1500 μL do herbicida Tebutiuron.

3.5 Análises e físico-químicas

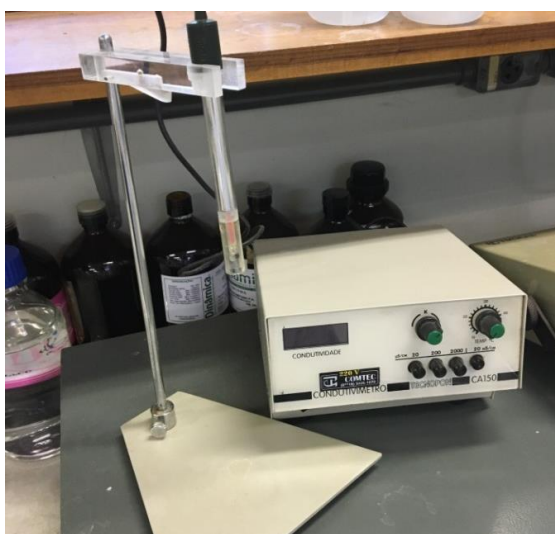
Foi realizado a determinação de pH durante todo o experimento, utilizando, de acordo com APHA, 2012, um pHmetro Digimed DMPH-2, calibrado com soluções tampões 7 e 4, medindo diretamente das amostras semanalmente. A condutividade elétrica foi medida através do condutivímetro Tecnopom CA150, nas mesmas condições e seus resultados expressos pela unidade em μS .

Figura 2: pHmetro Digimed DMPH-2.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 3: Condutivímetro Tecnopom CA150.



Fonte: Autor, 2020.

3.6 Análises microbiológicas

A quantificação de bactérias heterotróficas foi realizada conforme a Norma Técnica L5 201. (CETESB, 2006).

3.6.1 Preparo da água de diluição.

Para a água de diluição foram feitas duas soluções previamente, que foram utilizadas para o preparo de uma terceira solução. Para a solução 1 diluiu-se 34 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em 500 mL de água destilada. Para a solução 2 diluiu-se 81,1 g de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 1 litro de água destilada. Por fim, para a solução 3 adicionou-se 0,25 mL da solução 1 e 1 mL da solução 2 a um balão de 200 mL, e em seguida completando esse balão com água destilada. A terceira solução formada foi passada para um frasco shot para ser levada a autoclave para a esterilização a 120 °C na pressão por 20 minutos. Também foram autoclavados 12 placas de petri para o teste em duplicata, uma caixa de ponteiras para pipeta, uma pipeta de 10 mL, 6 tubos de ensaio e o meio de cultura.

3.6.2 Método de diluição de amostras

A água de diluição foi passada para os tubos de ensaio com o auxílio da pipeta de 10 mL esterilizada. Adiciona-se 9 mL de água de diluição e 1 mL de amostra, obtendo uma diluição de 10 vezes. Isso foi feito para cada coluna, totalizando 6 tubos de ensaio.

3.6.3 Preparo do meio de cultura Plate Count Agar

Pesou-se 8,2 g do meio de cultura desidratado e o dissolveu em 400 mL de água destilada. O meio dissolvido foi levado para o micro-ondas até a solução surgir, levando cerca de 3 minutos e mistura-se bem com o auxílio de bastão de vidro até a completa dissolução do meio. Em seguida o meio foi distribuído em 12 tubos de

ensaio, contendo 20 mL em cada, e tampado para ser levado a autoclave por 20 minutos.

3.6.4 Inoculação, incubação e contagem

Adicionou-se 1 mL de amostra diluída em cada placa de petri com o auxílio da pipeta de ponteiros, em seguida adicionou-se o meio contido em um dos tubos de ensaio esterilizados (20 mL). Agitou-se gentilmente cada placa em formato de 8 para a total mistura do meio e da amostra. Em seguida, as placas foram incubadas à 35°C por 48 horas.

Após esse tempo, verificou-se a presença ou não de colônias de organismos heterotróficos, e realizou-se a contagem das mesmas em um contador de colônias mecânico. Os resultados foram definidos pelas unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) multiplicando pelo valor da diluição - 10.

$$\text{UFC/mL} = \text{n}^{\circ} \text{ de colônias} \times 10$$

Figura 4: Incubadora usada para os testes microbiológicos



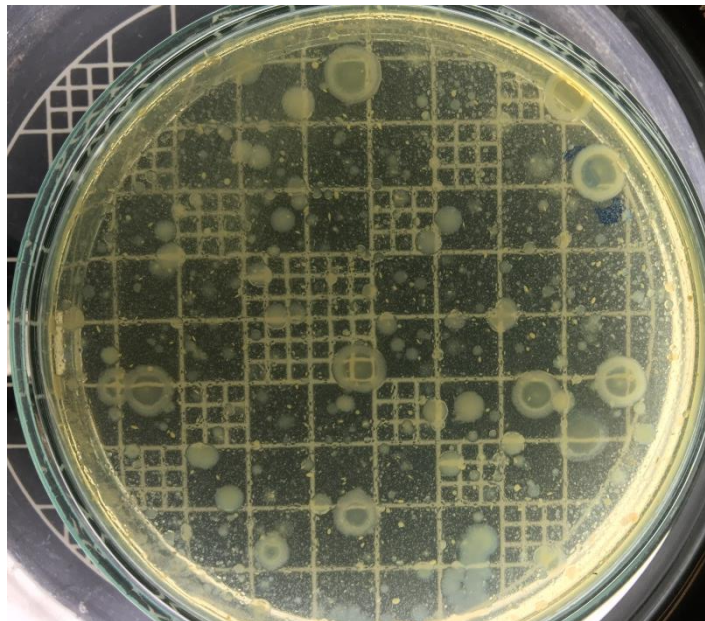
Fonte: Autor, 2020.

Figura 5: Materiais prontos para serem autoclavados.



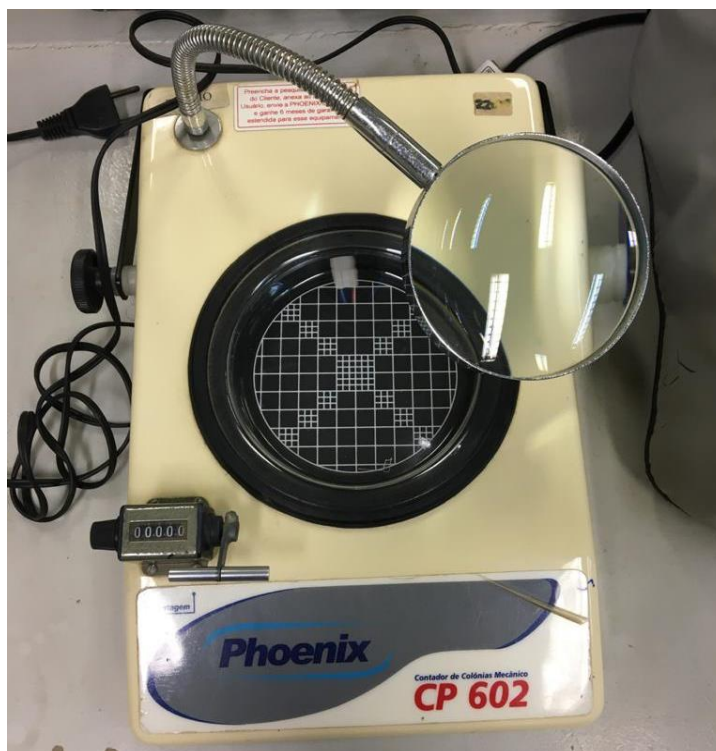
Fonte: Autor, 2020.

Figura 6: Placa pronta para contagem.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 7: Contador de colônias mecânico



Fonte: Autor, 2020.

3.7 Testes analíticos

3.7.1 Demanda química de oxigênio (DQO)

O teste de DQO é uma técnica que estima a quantidade de matéria orgânica através da concentração de oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica, sendo biodegradável ou não, em meio ácido e condições energéticas por ação de um agente químico oxidante forte. Esta técnica é muito utilizada pela rapidez de sua realização e obtenção de resultados, durando pouco mais de duas horas. O teste de DQO é então, um parâmetro importante para avaliar fatores como poluição orgânica e autodepuração de ambientes aquáticos, que indicam o quanto um ambiente é capaz de degradar diferentes compostos externos presentes. (VALENTE et al., 1997).

Para a realização do teste, primeiramente foi feito a diluição das amostras, onde em um balão de 10 mL foi adicionado 1 mL de amostra e 9 mL de água

destilada. Isso se repetiu para todas as colunas, diluindo a amostra a 10x. O passo seguinte foi adicionar 2 mL da amostra diluída a um tubo de vidro pequeno, e em seguida 1,2 mL de solução digestora, por fim 2,8 mL de solução catalítica, nesta ordem, sendo os testes feitos em duplicata. Os tubos então, foram devidamente tampados e levados a um termo-digestor a 150 °C por 2 horas, com posterior leitura no espectrofotômetro. (APHA, 2012).

Previamente ao início dos testes foi criada a equação de análise através da montagem da curva padrão utilizando uma solução de biftalato de potássio.

3.7.2 Preparo dos reagentes

Solução digestora: Em 500 mL de água destilada foram adicionadas 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$ grau padrão primário, previamente seco em estufa a 150 °C por 2 h. Em seguida a mistura é solubilizada adicionando-se lentamente 167 mL de H_2SO_4 e logo após adicionando 33,3 g de $HgSO_4$, dissolvendo-o a temperatura ambiente. Por fim, foi diluído em 1000 mL de água destilada.

Solução Catalítica: Pesou-se 5,5 g de Ag_2SO_4/kg de H_2SO_4 – Sulfato de prata/kg de ácido sulfúrico. Adicionando lentamente o H_2SO_4 P.A ao Ag_2SO_4 .

Solução padrão de biftalato de potássio: Pesou-se 0,8535 g do sal, dissolvendo-o em água destilada e em seguida transferindo-o para um balão volumétrico, completando o volume até 1000 mL. Esta solução equivale a uma DQO de 500 mg/L O_2 .

3.7.3 Confecção da curva padrão e montagem da equação para análise de DQO

Sabendo que uma DQO representa 500 mg/L O_2 , a curva foi criada a partir dos valores médios de leitura de DQO para o ajuste do método, definindo como pontos o considerado “branco do método”, e os pontos de 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L O_2 , sendo esta, a faixa da curva. Para validação do método, a curva em que apresentar o R^2 mais próximo de 1. E chegou-se à equação a seguir, onde $dqo(i)$ representa o valor da leitura no espectrofotômetro.

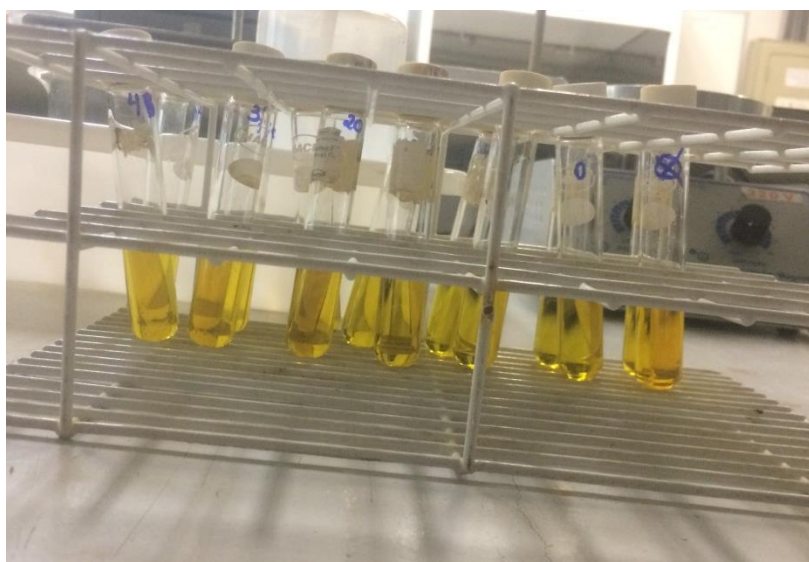
$$DQO = dqo(i) + 0,0212 / 0,007$$

Figura 8: Termo digestor HACH utilizado para os testes de DQO.



Fonte: Apraham, 2020.

Figura 9: Tubos de DQO prontos para digestão.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 10: Preparo das soluções digestoras e catalíticas.



Fonte: Apraham, 2020.

3.8 Testes de pigmentos fotossintéticos: *Clorofila A* e *Clorofila B*

A análise foi realizada primeiramente com extração por acetona 90% e leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 630, 647, 664 e 750 nm, baseado em CETESB (2014).

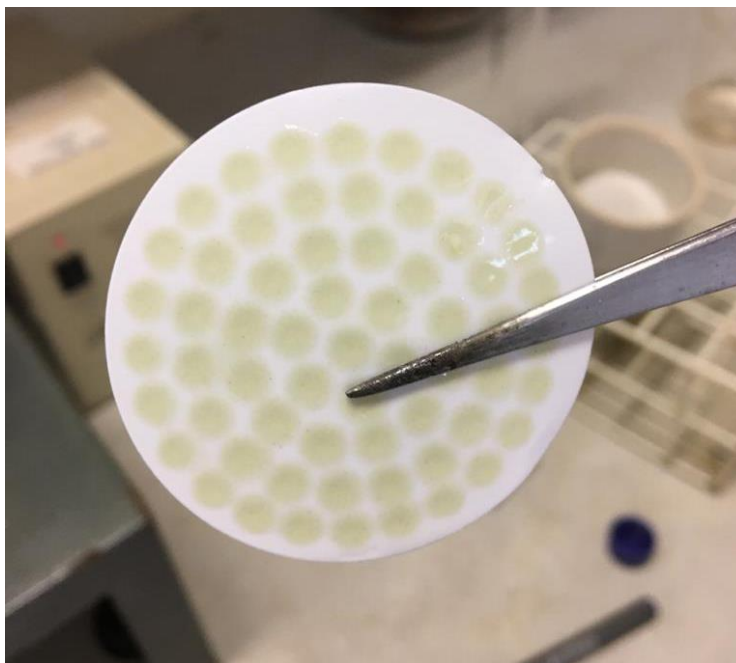
Para a realização do teste foi utilizado a bomba a vácuo para filtrar 20 mL de cada amostra em filtros de fibra de vidro, sendo o teste feito em duplicata. Em seguida o filtro foi passado para tubos de centrifuga onde foi adicionado 10 mL de etanol 90% para início da extração. Posteriormente os tubos, devidamente fechados são levados em banho maria a 78 °C por 5 minutos e logo após foi colocado em banho de gelo para receber um choque térmico. Por fim, os tubos foram postos em geladeira por 24 horas, e após este tempo, levados ao espectrofotômetro para a leitura feita com cubetas de quartzo de 1 cm.

Os valores dados pelo aparelho são posteriormente analisados de acordo com as equações de clorofila A e clorofila B de Jeffrey & Humphrey (1975), para calcular a concentração dos pigmentos de cada amostra. As equações para clorofila A e B são respectivamente:

- $Cl(a) = (11.85(A_{664}-A_{750}) - 1.54(A_{647}-A_{750}) - 0.08(A_{630}-A_{750})) \cdot V_1/(V_2 \cdot l)$
- $Cl(b) = (-5.43(A_{664}-A_{750}) + 21.03(A_{647}-A_{750}) - 2.66(A_{630}-A_{750})) \cdot V_1/(V_2 \cdot l)$

Sendo V1 o volume de etanol 90% utilizado para extração, que é de 10 mL e o V2 o volume da amostra filtrada, que é de 20 mL. E o l é o percurso óptico da célula do espectrofotômetro, que tem 1 cm.

Figura 11: Filtro de vidro logo após filtrar uma amostra.



Fonte: Autor, 2020.

3.9 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Foram realizados ensaios de fitotoxicidade com a semente *Lactuca sativa* (alface), com a fração líquida da coluna 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 duplicata constituídos de controle positivo de sulfato de zinco (ZnSO_4) como substância tóxica de referência e controle negativo utilizando-se água deionizada. Estes são ensaios de toxicidade aguda, pois requerem uma exposição de 120 horas, e a partir dele podemos avaliar os efeitos fitotóxicos de uma substância durante a germinação de sementes, uma vez que é no período de germinação que os processos fisiológicos são muito mais numerosos e a sensibilidade da planta é alta. (GUEVAVA, 2019).

A semente de *L. Sativa* é uma das espécies mais utilizadas e recomendadas pela US Enviromental Protection Agency na detecção de efeitos ecotoxicológicos

(EPA U.S., 1996), sendo utilizada então como bioindicador para avaliar os riscos potenciais no ambiente. (GUEVAVA, 2019). Isto se deve as inúmeras vantagens que apresenta, tais como sua fácil e rápida implementação, confiável, econômica, e de não requerer o uso de grandes equipamentos. (CHARLES et al., 2011).

Para a realização do teste foram utilizadas 16 placas de Petri (2 para cada tratamento e controle). As placas foram forradas com discos de papel de filtro e receberam, com o auxílio de uma pinça, 20 sementes de *L. sativa* cada uma, distribuindo-as em fileiras verticais de 6, 4 e 3 sementes, para que houvesse espaço suficiente entre cada uma e obter melhor desenvolvimento das plântulas, como mostra o esquema da figura 12. Em seguida foi adicionado, com a ajuda de pipetas, 4 mL de amostra, e 4 mL das soluções controles nas suas respectivas duplicatas. Em seguida as placas foram vedadas com papel-filme de PVC com a intenção de impedir a perda de umidade, e cobertas com papel alumínio para impedir qualquer influência de luz. Por fim, foram levadas para incubação à 20 °C durante as 120 horas.

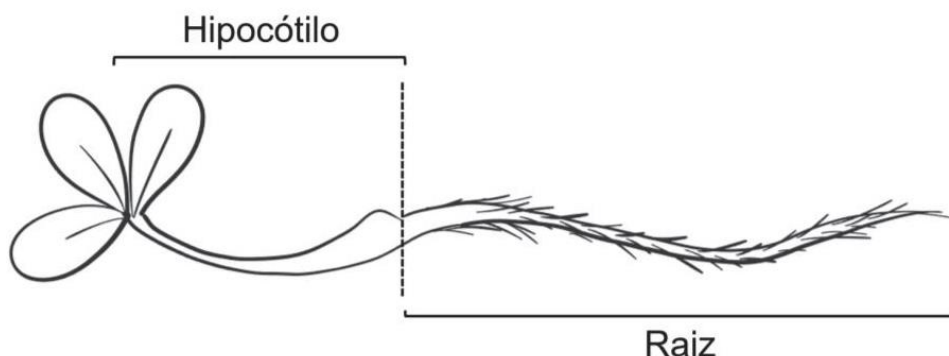
Figura 12: Esquema de distribuição de sementes.



Fonte: CAROLINA, 2019.

A influência de Tebutiurum no crescimento vegetal foi verificada através das medições com régua do comprimento do hipocótilo e da raiz. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram raiz e hipocótilo maior ou igual a 3 mm.

Figura 13: Hipocótilo e raiz de uma plântula.



Fonte: CAROLINA, 2019.

Para a análise, foram calculados o índice de crescimento radicular (ICR), e o índice de germinação (IG), utilizando as seguintes formulas respectivamente:

$$ICR = CRA/CRC$$

Onde: CRA é o comprimento da radícula na amostra e CRC é o comprimento da radícula no controle negativo.

$$IG = ICR \times (SGA/SGC) \times 100$$

Onde ICR é o índice de crescimento, SGA é o número de sementes germinadas na amostra e SGC é o número de sementes germinadas no controle negativo.

3.10 Análise de dados

Todos os resultados dos testes aplicados nas colunas de Winogradsky foram tabelados com o objetivo de analisar e comparar os dados obtidos nas diferentes concentrações das colunas durante o tempo e foram dispostos em gráficos utilizando a ferramenta Excel e OriginPro 8 e não foram realizadas análises estatísticas.

4. TRATAMENTO E DESCARTE DE RESÍDUOS DA PESQUISA

Todo resíduo químico dos materiais utilizados no processo de pesquisa foi levado para a área de resíduos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, em frascos devidamente rotulados, e este foi acumulado no local. Todo resíduo biológico presente foi levado para a autoclave.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

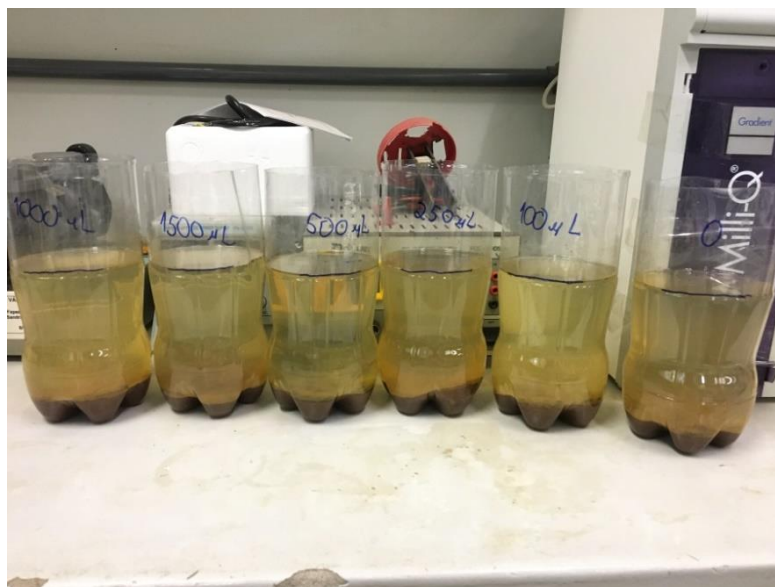
5.1 Coluna de Winogradsky

A partir da contaminação das colunas de Winogradsky com o herbicida Tebutiurum, nas concentrações 0, 100, 250, 500, 1000 e 1500 ppm, foram analisados os impactos do composto em relação ao tempo de exposição (60 dias), e em relação as diferentes concentrações através dos testes anteriormente citados. Foram também, observados características visuais com o passar do tempo, como a mudança de cor da água.

Após o 10º dia do experimento, a água das colunas adquiriu a cor verde (Figura 15), que indicam presença de organismos fotossintetizantes, com exceção das colunas 1000 ppm e 1500 ppm, que adquiriram esta cor somente após o 20º dia, e ao final do experimento todas possuíam a mesma cor uniformemente, sendo possível concluir previamente que a partir da concentração de 1 mL (1000 ppm) de Tebutiurum houve influência no tempo de crescimento de organismos fotossintetizantes, estes demoraram 10 dias a mais para se desenvolver que as demais colunas.

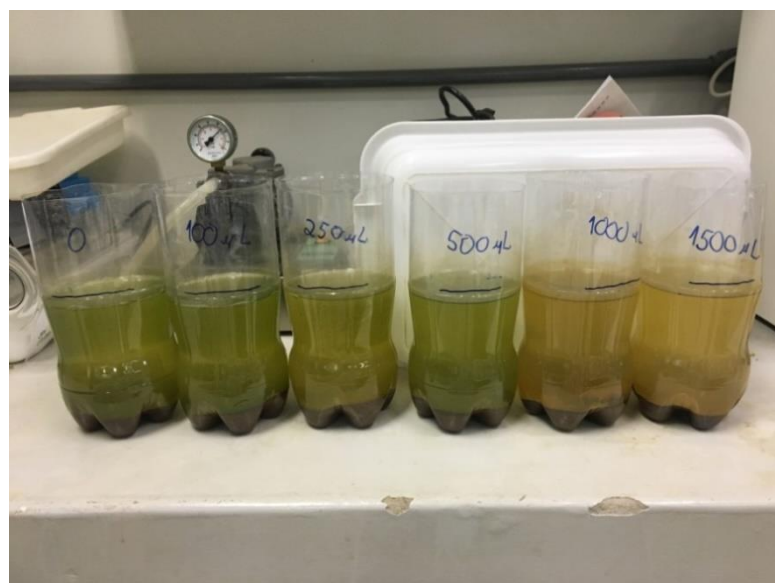
Visualmente, também foi possível perceber que, na última semana, a coluna com 500 ppm obteve a cor mais escura dentre as demais, com menos transparência na água (Figura 16), possivelmente indicando maior presença de clorofila que as demais colunas.

Figura 14: Início do experimento



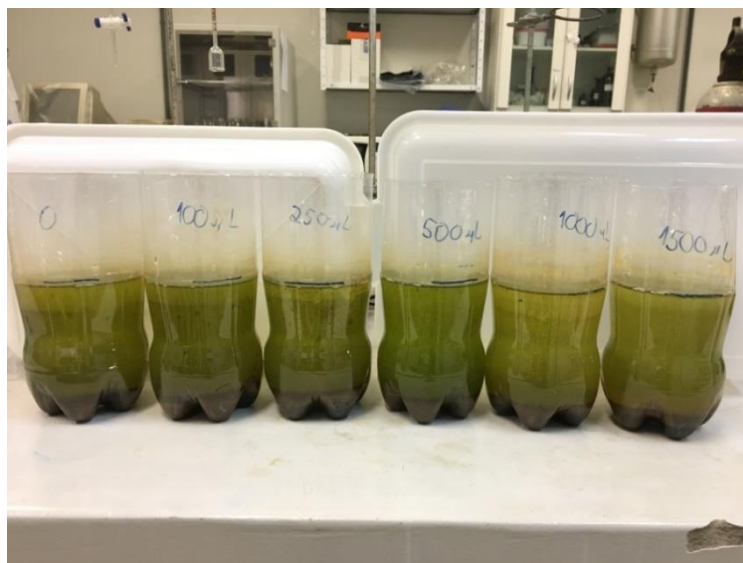
Fonte: Autor, 2020.

Figura 15: 10º dia do experimento



Fonte: Autor, 2020.

Figura 16: 60º dia, final do experimento



Fonte: Autor, 2020.

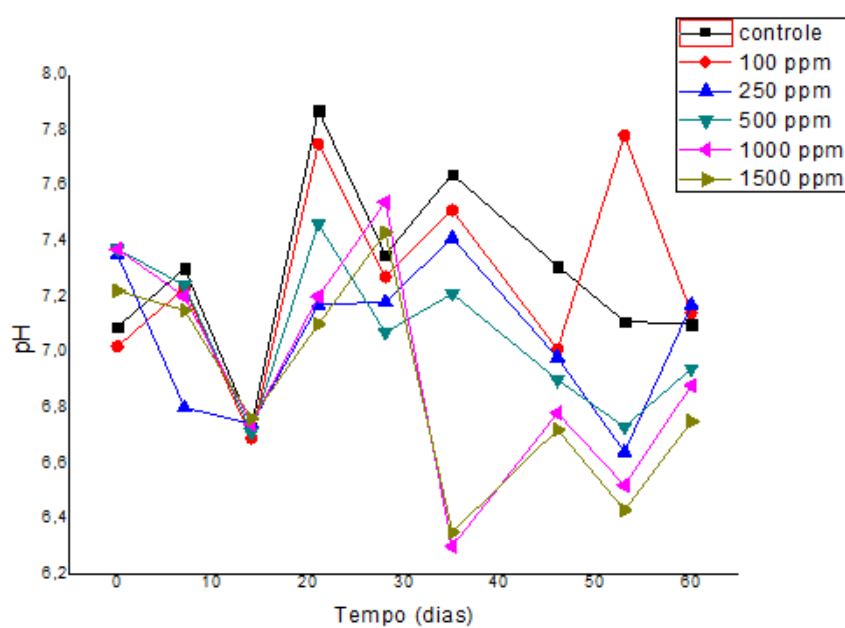
5.1 pH e Condutividade Elétrica

As análises de pH se mantiveram constantes durante os sessenta dias, variando entre 6,3 e 7,8 (Tabela 1), e os resultados das amostras não tiveram diferenças significativas em comparado com a coluna controle (Figura 17), mostrando que o Tebutiuram não influenciou nesse parâmetro.

Em relação a condutividade elétrica, somente no tempo zero de experimento houve valores mais baixos comparado ao restante, variando entre 1 e 4 μS (Tabela 2). Após a primeira semana, a condutividade de todas as colunas aumentou, e assim se mantiveram constantes entre 4,5 e 6,2 μS até o último dia, incluindo a coluna controle, mostrando também, que não houve diferenças significativas com a presença do herbicida neste parâmetro (Figura 18). Valendo salientar que as variações obtidas, tanto do pH quanto da condutividade elétrica, se valem da agitação e dissolução dos sais adicionados na montagem do substrato das colunas de Winogradsky.

Tabela 1: Valores de pH nas colunas de Winogradsky em relação ao tempo.

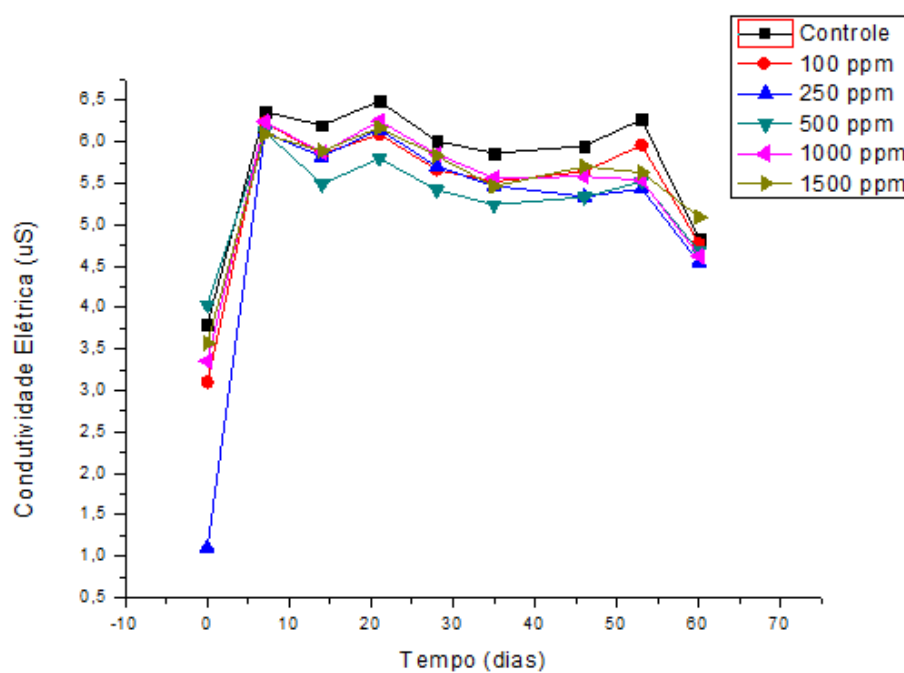
Tempo (dias)	pH					
	Controle	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
0	7,09	7,02	7,35	7,37	7,37	7,22
7	7,3	7,23	6,8	7,24	7,2	7,15
14	6,73	6,69	6,74	6,71	6,74	6,76
21	7,87	7,75	7,17	7,46	7,2	7,1
28	7,35	7,27	7,18	7,07	7,54	7,43
35	7,64	7,51	7,41	7,21	6,3	6,35
46	7,31	7,01	6,98	6,9	6,78	6,72
53	7,11	7,78	6,64	6,73	6,52	6,43
60	7,1	7,14	7,17	6,94	6,88	6,75

Figura 17: Variações de pH de acordo com o tempo.

Fonte: Autor, 2020

Tabela 2: Valores de condutividade elétrica em relação ao tempo.

Condutividade Elétrica (μS)						
Tempo (dias)	Controle	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
0	3,8	3,1	1,1	4,03	3,35	3,57
7	6,36	6,23	6,11	6,12	6,24	6,09
14	6,2	5,85	5,82	5,49	5,87	5,89
21	6,49	6,09	6,15	5,8	6,25	6,17
28	6,01	5,66	5,7	5,42	5,85	5,83
35	5,86	5,52	5,47	5,24	5,56	5,46
46	5,95	5,64	5,34	5,33	5,58	5,7
53	6,27	5,96	5,43	5,52	5,54	5,63
60	4,83	4,77	4,54	4,68	4,62	5,09

Figura 18: Variações na condutividade elétrica nas colunas de Winogradsky em relação ao tempo.

Fonte: Autor, 2020

5.3 Teste microbiológico

Em relação ao teste microbiológico, nota-se pequeno impacto do Tebutiurum nas comunidades microbianas entre os dias 21 e 60 do experimento, onde as quantidades de unidades formadoras de colônias começam a diminuir nas colunas em comparado com a coluna controle, a qual teve crescimento desde o início e em seguida se manteve constante entre 17.400 e 17.900 UFCs (Tabela 3). Além de que, todas as demais colunas tiveram suas médias de valores mais baixas que a controle (Figura 19), mostrando algum impacto do poluente nas colunas contaminadas.

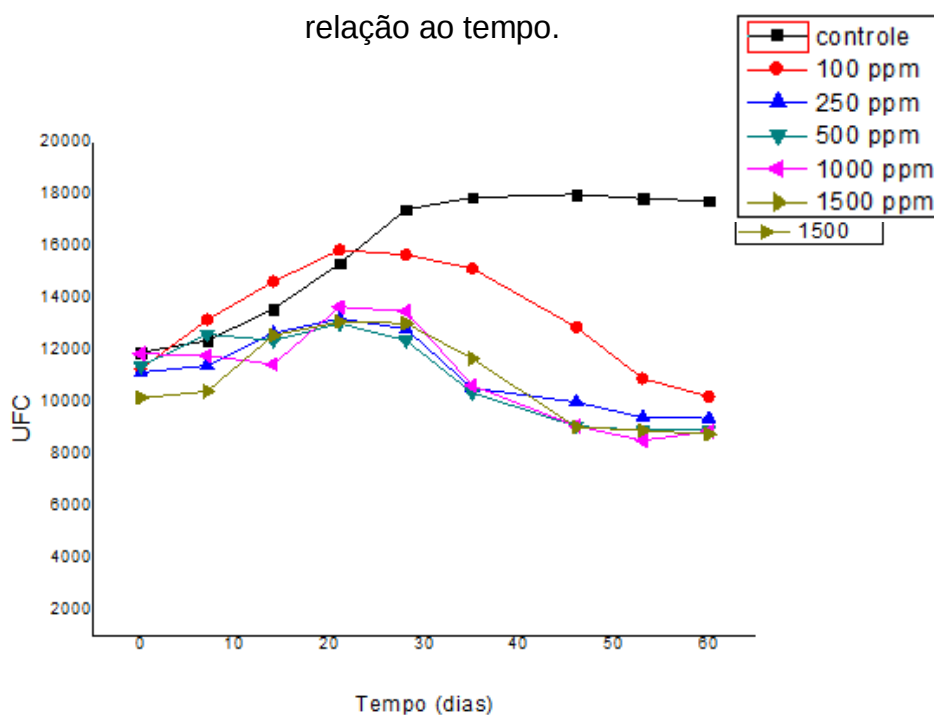
Considerando somente as colunas com adição do Tebutiurum, percebe-se leves crescimentos nas primeiras semanas em 4 de 5 colunas, que tiveram o seu maior valor conjuntamente no dia 21, mostrando possível resistência dos organismos ao poluente nas primeiras semanas, principalmente nas colunas de menor concentração, tendo a coluna de 100 ppm chegado a 15.800 colônias, a coluna 250 ppm 13.200 e a de 500 ppm 13.010 UFCs, corroborando com o estudo de Jorgensen (2000), o qual indica a possibilidade de resistência bacteriana em baixas concentrações de antibióticos.

Em contra ponto, a partir do dia 21 todas as colunas contaminadas tiveram suaves quedas nos seus valores de UFCs até o final do experimento, onde os menores valores de bactérias se deram entre o dia 53 e 60, e entre as colunas de maior contaminação (1000 e 1500 ppm) mostrando mais uma vez, a maior influência do herbicida a partir da utilização de 1 mL/L no ambiente. Outro detalhe observado é que a partir do dia 46 do experimento as quedas dos valores diminuíram, indicando talvez um possível início de estabilização das quantidades de bactérias heterotróficas em relação a presença do componente.

Os menores valores de UFCs ao final do experimento das colunas 100, 250, 500, 1000 e 1500 ppm, foram respectivamente: 10.200, 9360, 8920, 8862 e 8760 UFCs.

Tabela 3: Valores da contagem de UFCs em relação ao tempo.

Tempo (dias)	UFC/mL					
	controle	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
0	11900	11260	11125	11370	11850	10155
7	12360	13160	11400	12600	11780	10400
14	13570	14625	12640	12360	11440	12560
21	15320	15840	13200	13010	13658	13080
28	17400	15657	12800	12360	13480	13020
35	17860	15130	10530	10350	10630	11660
46	17980	12870	9990	9060	9070	9030
53	17820	10900	9400	8900	8520	8900
60	17720	10200	9360	8920	8862	8760

Figura 19: Variações na quantidade de UFCs nas colunas de Winogradsky em relação ao tempo.

Fonte: Autor, 2020

5.4 Testes de pigmentos fotossintéticos

Se tratando dos testes fotossintéticos, a maioria das colunas mostrou a ocorrência de organismos fotossintetizantes a partir do dia 15 de experimento, tanto para a clorofila A quanto para B. Antes disso, os valores não mostraram nenhuma presença de organismos (Figura 20).

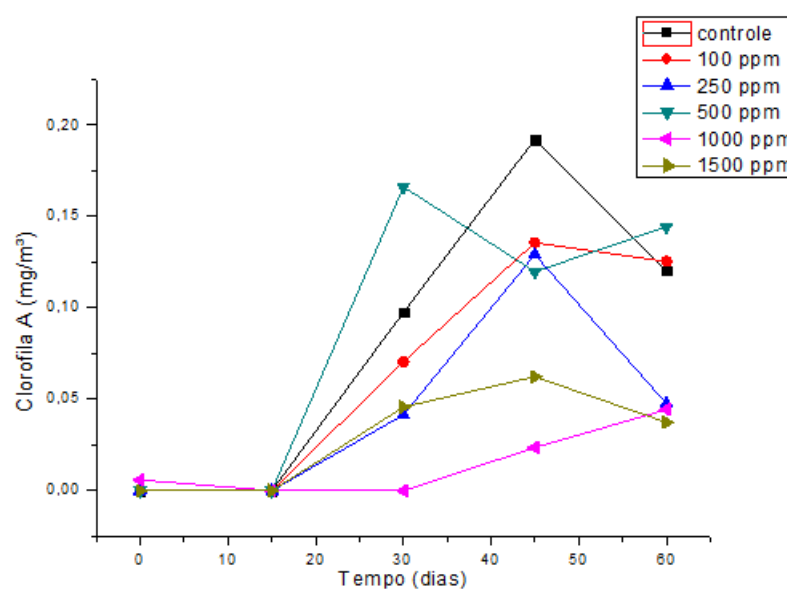
Nos resultados da Clorofila A, a coluna controle teve aumento significativo, chegando a 0,27725 mg/m³, e a partir do dia 45 houve uma pequena queda, chegando ao final do experimento com 0,23362 mg/m³ (Tabela 4). Em relação as outras colunas, somente a amostra com 500 ppm teve valores maiores que a coluna controle, aumento ocorrido no dia 30, e no dia 60, corroborando com as fotos mostradas do final do experimento, onde esta coluna é a que tem a cor mais escura e sem muita transparência na água, e constatando que houve um crescimento maior de organismos resistentes ao Tebutiurum. Já os restantes das colunas, tiveram todos valores menores que a coluna controle, sendo possível perceber que quanto maior a concentração do herbicida, menores foram sendo a quantidade de organismos fotossintetizantes encontrados, chegando no dia 60 com a coluna de 1000 ppm com 0,04432 mg/m³ e a de 1500 ppm com 0,037425 mg/m³.

Os resultados de clorofila B foram semelhantes. A coluna controle teve aumento constante do dia 15 ao dia 45, com valores maiores que todas as outras, chegando a 0,27725 mg/m³ (Tabela 4, figura 21). Já as demais colunas, conforme maior era a concentração de Tebutiurum, menores foram os valores de crescimento de clorofila B, chegando na última coluna de 1500 ppm com seu maior valor de somente 0,097005 mg/m³.

As amostras de 1000 ppm e 1500 ppm foram as que apresentaram menores quantidade de clorofila, tanto A quanto B, mostrando a influência do herbicida no microambiente criado, que dificultou o crescimento de algas nessas concentrações. Os presentes resultados atestam veracidade de outros experimentos já feitos como o de Torres (2012), onde o Tebutiurum testado em cultivares de cana de açúcar causou redução da taxa fotossintética e redução da condutância estomática.

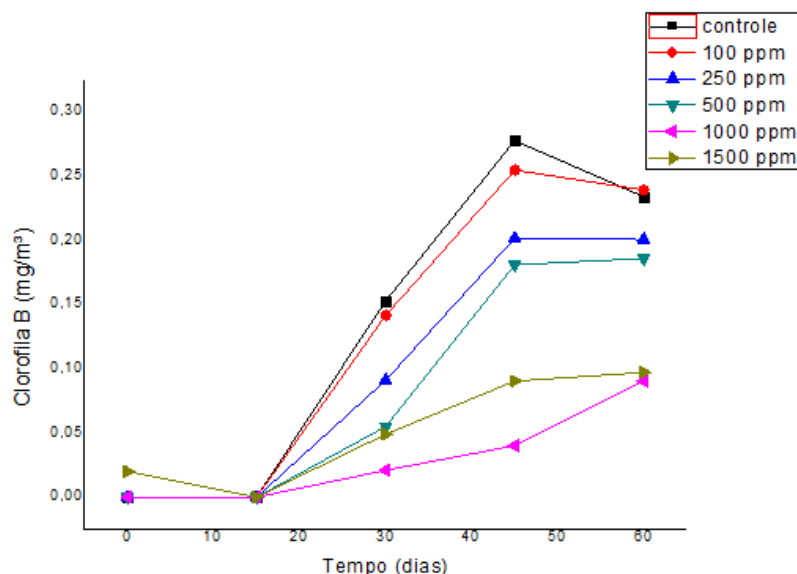
Tabela 4: Valores de clorofila A nas amostras em relação ao tempo.

Tempo (dias)	Clorofila (mg/m ³)					
	Controle	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
0	0	0	0	0	0,005925	0
15	0	0	0	0	0	0
30	0,09757	0,070455	0,041585	0,16627	0	0,045755
45	0,19212	0,13571	0,129135	0,119755	0,023635	0,06234
60	0,120325	0,1254	0,047575	0,1432	0,04432	0,037425

Figura 20: Variações da clorofila A das colunas de Winogradsky em relação ao tempo.**Tabela 5:** Valores de clorofila B das amostras em relação ao tempo.

Tempo (dias)	Clorofila B (mg/m ³)					
	Controle	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
0	0	0	0	0	0	0,019935
15	0	0	0	0	0	0
30	0,152715	0,141395	0,090855	0,25489	0,020905	0,04892
45	0,27725	0,25436	0,201495	0,1807	0,04008	0,09026
60	0,23362	0,23876	0,107285	0,28567	0,090425	0,097005

Figura 21: Variações de clorofila B das amostras em relação ao tempo.



Fonte: Autor, 2020.

5.5 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio aumentou significativamente a partir do 15º dia do experimento, mas não houve diferenças significativas em comparado com a coluna controle, que aumentou conjuntamente (Figura 22). É possível destacar somente que, no 30º dia de experimento as colunas contaminadas tiveram os valores de demanda química de oxigênio acima da coluna controle, com as DQOs das amostras de 100 e 500 ppm chegando a 39% e 19% a mais que a coluna controle, respectivamente (Tabela 5). Mostrando que o herbicida Tebutiurum pode ter dificultado o processo de degradação de matéria orgânica do ambiente neste momento, fazendo com que os organismos precisassem mais de oxigênio do que normalmente para realizar este processo. (VALENTE, 1997).

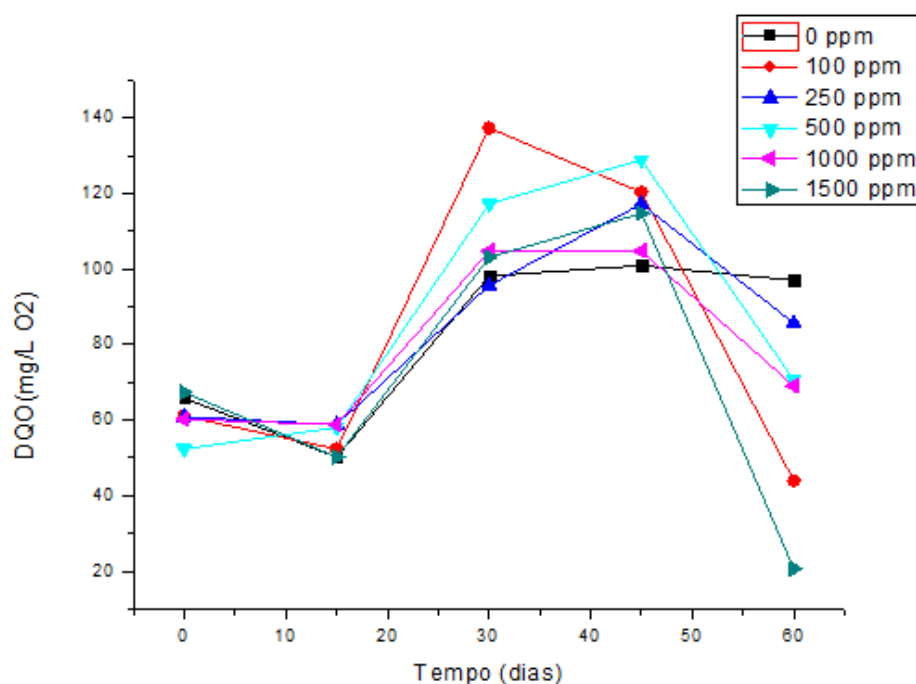
Porém, a partir do 45º dia, todas as colunas contaminadas já se encontravam com valores de DQO a baixo da coluna controle e, após isso, os níveis de demanda química de oxigênio decaíram consideravelmente, indicando a possível degradação do Tebutiurum pelos organismos do ambiente que podem ter se tornado resistentes ao composto entre os dias 45 e 60.

Nota-se, portanto, uma possível biodegradação do herbicida nas colunas de Winogradsky ao final do experimento, mesmo o Tebutiurum se mostrando resistente por um período de tempo no ambiente. Isso também poderia explicar a estabilização dos valores de UFCs no final do estudo.

Tabela 6: Valores de DQO das colunas de Winogradsky medidos em relação ao tempo.

DQO (mg/L O ₂)						
Tempo (dias)	Controle	100ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	1500ppm
0	65,88	61,02	60,88	52,31	60,17	67,31
15	50,17	52,31	58,74	58,02	58,74	50,17
30	98,13	137,3	95,63	117,3	104,8	103,13
45	133,96	120,36	117,3	128,96	104,8	114,8
60	96,96	43,96	85,63	70,63	68,96	20,63

Figura 22: Variações das leituras de DQO em relação ao tempo.



Fonte: Autor, 2020.

5.6 Testes de fitotoxicidade em *Lactuca sativa*:

Em relação as sementes de alface, de forma geral, são possíveis observar que todas as colunas contaminadas obtiveram tanto valores de índices de crescimento radicular quanto índice de germinação menores que a coluna controle, indicando influência negativa da presença do herbicida no desenvolvimento das sementes.

Os valores da coluna controle, para o IG, variaram entre 54% até 71% enquanto a coluna de 100 ppm variou entre 14 e 27% (Tabela 7). A coluna de 250 ppm variou entre 14 e 24%, a de 500 ppm, entre 9 e 24%, a de 1000 ppm entre 7 e 25% e a de 1500 ppm entre 6 e 37%. Percebe-se então que o IG diminuiu moderadamente conforme a maior concentração de Tebutiurum (Figura 23), assim como a mortalidade das sementes aumentou ponderadamente, mas não houve diferenças significativas. O mesmo ocorreu com o ICR, onde a coluna controle variou entre 55 e 71, e as demais colunas variaram entre 20 e 54 (Figura 24).

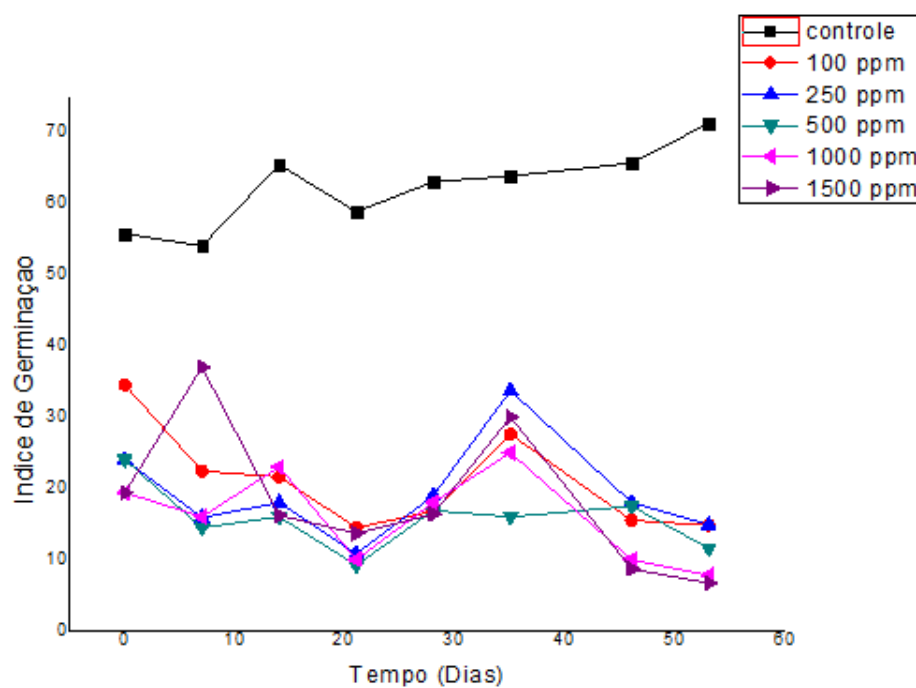
De acordo com Young et al. (2012), a amostra que obteve IG abaixo de 80% pode ser considerada tóxica, acima de 80% considerada não tóxica e acima de 120% pode-se considerar que a amostra estimula o crescimento das sementes. Esses dados são apresentados na figura 24, onde é possível perceber que todas as amostras contaminadas podem ser consideradas tóxicas seguindo este critério. Porém, muitos estudos ainda devem ser feitos para melhor representar a fitotoxicidade do Herbicida Tebutiurum com resultados mais amplos e comparativos entre espécies, uma vez que é de extrema importância o conhecimento dos efeitos deste composto na natureza para tomadas de decisões e ações que previnam e reduzam os impactos do mesmo.

Tabela 7: Valores de fitotoxicidade em colunas de Winogradsky em relação ao tempo.

Resultado dos testes de fitotoxicidade em relação ao tempo						
	COLUNAS	Comp. médio do hipocórito (cm)	Comp. médio da raiz (cm)	Nº de sementes não germinadas	ICR	IG (%)
1ª Semana	CONTROLE	2,22	1,59	0	0,55	55,7
	100 ppm	1,77	1,16	3	0,4	34,5
	250 ppm	1,61	0,87	4	0,3	24
	500 ppm	1,53	0,87	4	0,3	24
	1000 ppm	1,5	0,74	5	0,25	19,4
	1500 ppm	1,33	0,74	5	0,25	19,4
2ª Semana	CONTROLE	2,3	1,54	0	0,54	54
	100 ppm	1,42	0,8	4	0,28	22,4
	250 ppm	1,41	0,7	7	0,24	15,9
	500 ppm	1,4	0,69	8	0,24	14,5
	1000 ppm	1,39	0,66	6	0,23	16
	1500 ppm	1,23	0,82	6	0,54	37
3ª Semana	CONTROLE	2,32	1,86	0	0,65	65,4
	100 ppm	2,29	0,88	6	0,3	21,6
	250 ppm	1,36	0,61	3	0,21	18
	500 ppm	1,36	0,65	5	0,22	16
	1000 ppm	1,31	0,9	5	0,31	23
	1500 ppm	1,16	0,77	8	0,27	16,2
4ª Semana	CONTROLE	2,26	1,74	1	0,61	58,8
	100 ppm	1,9	0,68	8	0,24	14,5
	250 ppm	1,11	0,61	10	0,21	10,8
	500 ppm	0,93	0,65	12	0,23	9,2
	1000 ppm	0,74	0,57	10	0,2	10
	1500 ppm	1,1	0,7	9	0,24	13,7
5ª Semana	CONTROLE	2,65	1,8	0	0,63	63
	100 ppm	1,64	0,87	9	0,3	16,8
	250 ppm	1,52	0,8	6	0,28	19
	500 ppm	1,23	0,74	7	0,26	16,9
	1000 ppm	1,21	0,79	7	0,27	18
	1500 ppm	1,21	0,85	9	0,29	16,4

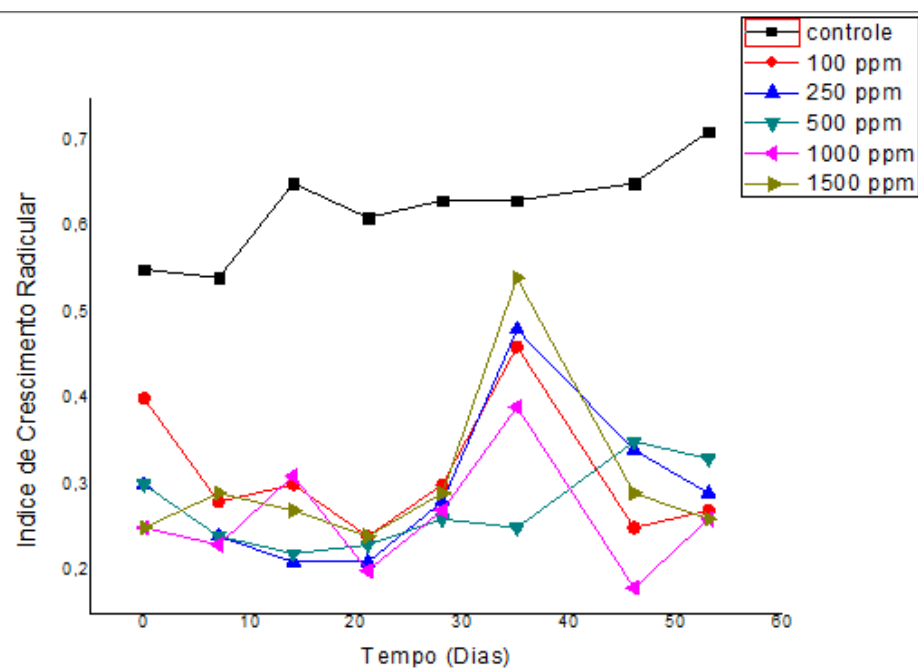
6ª Semana	CONTROLE	2,53	1,8	0	0,63	63,8
	100 ppm	1,36	1,3	8	0,46	27,6
	250 ppm	1,3	1,36	6	0,48	33,7
	500 ppm	1,28	0,71	7	0,25	16
	1000 ppm	0,99	1,1	7	0,39	25
	1500 ppm	1,03	1,55	9	0,54	30
7ª Semana	CONTROLE	2,57	1,87	0	0,65	65,6
	100 ppm	1,56	0,74	8	0,25	15,5
	250 ppm	1,77	0,98	9	0,34	18
	500 ppm	1,57	1	10	0,35	17,5
	1000 ppm	0,53	0,53	9	0,18	10
	1500 ppm	0,53	0,83	14	0,29	8,7
8ª Semana	CONTROLE	3,1	2,03	0	0,71	71,2
	100 ppm	1,98	0,77	9	0,27	14,8
	250 ppm	1,88	0,85	10	0,29	14,9
	500 ppm	1,55	0,95	13	0,33	11,6
	1000 ppm	0,68	0,76	14	0,26	7,8
	1500 ppm	0,41	0,77	15	0,26	6,7

Figura 23: Variações de índices de germinação em relação ao tempo



Fonte: Autor, 2020.

Figura 24: Variações de índices de crescimento radicular em relação ao tempo.



Fonte: Autor, 2020

6. CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível concluir que a presença do Herbicida Tebutiurum não impediu o crescimento dos organismos fotossintetizantes e da biomassa de clorofila a e b, porém influenciou no tempo de crescimento dos mesmos e na quantidade de clorofila encontrada. Quanto maior eram as concentrações de Tebutiurum, menores foram os valores de clorofila durante todo o estudo comparado com a coluna controle. Este fato também foi percebido no teste microbiológico, onde as colunas contaminadas obtiveram quantidades mais baixas de bactérias heterotróficas que a coluna controle. E também os valores de DQO indicaram maiores demandas de oxigênio para degradar a matéria orgânica ao meio do experimento (dia 30) comparado a coluna controle.

As sementes de *Lactuca sativa* demonstraram de forma geral, em todos os tratamentos, índices de germinação e índices de crescimento da raiz menores do que a coluna controle.

Podendo-se afirmar por fim, que em todos os testes realizados, quanto maior a concentração de Tebutiurum, maior foi a influência deste sobre os organismos presentes e/ou os processos realizados pelos mesmos, e que todos os parâmetros avaliados apresentaram algum grau de sensibilidade ao herbicida testado, principalmente nas concentrações de 1000 e 1500 ppm, com exceção do pH e Condutividade que não tiveram diferenças significativas em comparado a coluna controle.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS (EPA). **Leis e Regulamentos**. Disponível em: <https://www.epa.gov/environmentaljustice/epa-environmental-justice-implementation-plan-1996>. Acesso em: 20 ago. 2020.

AL-MUTAIRI, N.; BUFARSAN, A.; AL-RUKAIBI, F. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. **Chemosphere**, v. 74, p. 142-148, 2008.

ANDRADE, M. J. F. V. **Economia do Meio Ambiente e Regulamentação: Análise da Legislação Brasileira Sobre Agrotóxicos**. Fundação Getúlio Vargas (FGV). p. 1-5, 1995.

APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**. 22nd edn. American Public Health Association, Washington, DC, 2012.

BULA AGROFIT COMBINE 500 SC. 2019. Disponível em: <chromeextension://ohfgljidgelakfkefopgklcohadegdpjf/http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/COMBINE500SC0120.pdf>. Acesso em: 20 de agosto. 2020.

CASTILLO, G. M. **Ensayos Toxicológicos y Métodos evaluación de calidad de aguas. Estandarizacion, intercalibracion, resultados e aplicaciones**. Edição n. 1. México: IMATA. 2004.

COMITÊ DE AÇÃO A RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS (HRAC-BR). **Herbicidas**. Disponível em: <https://www.hrac-br.org/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Contagem padrão de colônias de bactérias: Método de ensaio. Bnh/Abes/Cetesb. **Norma Técnica L5.201**. São Paulo, 2006.

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

CHARLES, J. et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 2057-2064, 2011.

GOMES, A. 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.

GUEVAVA et al. Fitotoxicidade em águas residuárias domésticas utilizando sementes como bioindicadores. **Revista DAE**, n. 216, vol. 67, p. 45, abril a junho de 2019.

GRANT, W. D.; LONG, P. E. **Microbiologia Ambiental**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1989.

HRAC - BR. **Pesquisa global de classificação de herbicidas**. Disponível em: <https://www.hrac-br.org/>. Acesso em: 29 set. 2020.

Jorgensen, S. E.; Halling-Sorensen, B.; **Chemosphere 2000, 40, 691**.

KAUR, I.; GABA, S.; KAUR, S.; KUMAR, R.; CHAWLA, J. **Spectrophotometric determination of triclosan based on diazotization reaction: response surface optimization using Box-Behnken design. Water Science & Technology**. 2018.

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.

MAESTRIN, A.P.J. et al. Extinção 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.

MANASCHE, R.; MARQUES, F.C. & ZANETTI, C. Autoconsumo e segurança alimentar: a agricultura familiar a partir dos saberes e práticas da alimentação. **Revista de Nutrição**, v21, p. 145-158, 2008.

MARTINS, P. R. **Tragéticas Tecnológicas e Meio Ambiente: A Indústria de Agroquímicos/Transgênicos no Brasil**. v. n., p. 79-102, Campinas, SP, 2000.

MAZOYER M. ROUDART L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD. p. 45-48, 2008.

OCTAVIANO, Carolina. Muito além da tecnologia: os impactos da Revolução Verde. **ComCiência**, Campinas, n. 120, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO). **Agricultura**. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/pt/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., e EICHHORN, S. E. Fotossíntese, luz e vida. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. Edição n. 7, p. 125-151, 2007.

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

SOUZA, E. L. C. D. **Comportamento do Herbicida Tebuthiriuon em solo de Cultivo de Cana de Açúcar utilizando "Lisímetro de drenagem modificado"**. Campinas, 2007.

TORRES, L.G. et al. Alterações nas características fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar submetida à aplicação de herbicidas. **Planta daninha**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 581-587, 2012.

VALENTE, J. P. S, PADILHA, P. M., SILVA, A. M. M. da. Dissolved oxygen (DO), biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) as pollution parameters in the Lavapés/Botucatu - SP brook. **Ecl. Quím.** (São Paulo), v.22, p.49-66, 1997.

YOUNG et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 76, p. 182-186, 2012.



Nielly de Freitas Lima
Aluna



Ederio Dino Bidoia
Orientador