

Vinícius de Moraes Ruy Sapata

**Analisando o efeito do herbicida Tebuthiuron
em Microbiotas aquáticas e sua toxicidade
através de colunas de Winogradsky**

VINÍCIUS DE MORAES RUY SAPATA

**ANALISANDO O EFEITO DO HERBICIDA TEBUTHIURON EM
MICROBIOTAS AQUÁTICAS E SUA TOXICIDADE ATRAVÉS DE
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 Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Profº Dr. Ederio Dino Bidoia

Coorientadora: M. Sc. Carolina Rosai Mendes

Rio Claro - SP
2022

S241a

Sapata, Vinícius de Moraes Ruy

Analisando o efeito do herbicida Tebuthiuron em Microbiotas aquáticas e sua toxicidade através de colunas de Winogradsky / Vinícius de Moraes Ruy

Sapata. -- Rio Claro, 2022

57 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Ederio Dino Bidoia

Coorientadora: Carolina Rosai Mendes

1. Microbiologia. 2. Toxicologia ambiental. 3. Herbicidas. I. Título.

VINÍCIUS DE MORAES RUY SAPATA

**ANALISANDO O EFEITO DO HERBICIDA TEBUTHIURON EM
MICROBIOTAS AQUÁTICAS E SUA TOXICIDADE ATRAVÉS DE
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 Bacharel e Li-
cenciado em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

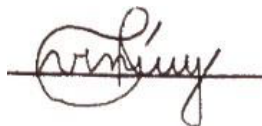
Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia (orientador)

Prof. M. Sc. Carolina Rosai Mendes (co-orientadora)

Prof. Dr. Guilherme Dilarri

Prof. Dr. Pedro Henrique Mainardi

Aprovado em: 7 de Janeiro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura do orientador



Assinatura da coorientadora

Dedico este trabalho a minha mãe Rosa Maria de Moraes Ruy, por ter me incentivado desde pequeno a seguir meus sonhos e embarcar nesta fascinante jornada em busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha mãe Rosa Maria de Moraes Ruy por toda a dedicação, amor e esforço em minha criação, obrigado por sempre ter me dado um apoio incondicional e suporte emocional, sem você nada disto seria possível!

Agradeço também a meus tios Fernando José de Moraes Ruy e Maria Alexandrina de Moraes Ruy por todo o amor e carinho e por sempre me incentivarem e apoiarem a seguir esta graduação.

Agradeço a meus amigos de Tietê e Cerquilha pelos longos anos de amizade sincera e pelo companheirismo.

Agradeço a meus amigos de Rio Claro, em especial ao pessoal que morou comigo nas repúblicas Echinodermatas, Refúgio e Quebrada ao longo desses 6 anos de graduação pelas conversas, risadas, companheirismo e festas!

Agradeço aos meus amigos músicos por todos os bons momentos que tivemos nos ensaios e palcos ao longo desses 6 anos que morei em Rio Claro.

Agradeço a minha namorada Amanda Viana pela amizade, amor, confiança, carinho, suporte e respeito nessa jornada que o universo nos permitiu vivenciar.

Agradeço aos meus orientadores Ederio Dino Bidoia e Carolina Rosai Mendes por todo o suporte, aprendizado, confiança, paciência e carinho ao longo do desenvolvimento deste trabalho e por me introduzirem a esse universo incrível da pesquisa, me fazendo descobrir a paixão pelo laboratório e pelo mundo da microbiologia!

Agradeço ao Adriano Uemura por todo o suporte dado no laboratório!

Agradeço a todos os Professores e Professoras incríveis que tive ao longo dessa graduação e que contribuíram para minha formação.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter financiado através de uma bolsa de estudos (processo 100383/2021-1) a iniciação científica que originou este trabalho de conclusão de curso.

“If we can't think for ourselves, if we're unwilling to question authority, then we're just putty in the hands of those in power. But if the citizens are educated and form their own opinions, then those in power work for us. In every country, we should be teaching our children the scientific method and the reasons for a Bill of Rights. With it comes a certain decency, humility and community spirit. In the demon haunted world that we inhabit by virtue of being human, this may be all that stands between us and the enveloping darkness”.

(Carl Sagan, 1995)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	16
2.1 Gerais	16
2.2 Específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local de estudo	17
3.2 Montagem das colunas	17
3.3 Testes	19
3.3.1 Quantificação de Clorofila A	19
3.3.1.1 Método de extração e quantificação de Clorofila A	19
3.3.2 Demanda Química de Oxigênio	20
3.3.2.1 Preparo dos reagentes	21
3.3.2.2 Confeção da curva padrão de Biftalato de potássio	21
3.3.2.3 Método espectofotométrico	22
3.3.3 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)	23
3.3.3.1 Preparo dos materiais para a execução do teste	23
3.3.3.2 Diluições seriadas e inoculação nas placas	25
3.3.3.3 Contagem de UFCs	26
3.3.4 Análises de pH e condutividade	26
3.3.5 Ensaios de Fitotoxicidade com sementes de <i>L. sativa</i>	27
3.4 Análises de dados	29
3.5 Tratamento e descarte de resíduos da pesquisa	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Colunas de Winogradsky	31
4.2 Extração de Clorofila	35
4.3 Demanda Química de Oxigênio	37
4.4 Ensaios de Fitotoxicidade com sementes de <i>L. sativa</i> e testes estatísticos	39
4.4.1 Análise de Germinação Relativa (%)	39
4.4.2 Análise de Elongação Radicular (%)	42
4.4.3 Análise de Índice de Germinação (%)	45
4.5 Análise de pH	47
4.6 Análise de condutividade elétrica	49
4.7 Bactérias heterotróficas	51
5 CONCLUSÃO	54
6 REFERÊNCIAS	55

RESUMO

O plantio de cana-de-açúcar é acompanhado de um intenso uso de agrotóxicos, sendo a cultura que mais utiliza o mecanismo de pulverização aérea no Estado de São Paulo. Muito se sabe sobre o potencial de lixiviação de diversos herbicidas e dos danos que podem causar em ecossistemas aquáticos, gerando desequilíbrios nas micro e macrobiotas. O Tebuthiuron é um dos herbicidas utilizados nas culturas de cana de açúcar no Brasil desde 1974, pertencente ao grupo das uréias, possuindo como mecanismo de ação a inibição do Fotossistema II das plantas, além de ser solúvel em água e lixiviável. Estudos demonstraram que o Herbicida é prejudicial ao fitoplâncton e macrófitas, devido a sua toxicidade e modo de ação, além de afetar a produção de hormônios e espermatogênese em tilápias. O presente estudo utilizou Colunas de Winogradsky para replicar um ambiente aquático em menor escala e visou avaliar possíveis alterações na microbiota natural aquática após contato com o herbicida Tebuthiuron em diferentes concentrações ao longo de 8 semanas. Foram analisados pH, condutividade, biomassa clorofilada, DQO, quantidade de bactérias heterotróficas e efeitos na germinação de sementes. O Herbicida apenas afetou o pH na primeira semana, reduzindo-o, e a condutividade não foi afetada por este. Foi possível constatar que as bactérias heterotróficas tiveram dificuldade para utilizar o herbicida em quantidades superiores a 500 ppm como fonte energética até a 4ª semana do experimento, pois suas comunidades microbianas demoraram mais para atingir seus picos quando comparados a coluna controle, 100 ppm e 250 ppm. O Tebuthiuron se mostrou prejudicial para a germinação e Elongação Radicular das sementes de *Lactuca sativa*. Por fim, o Herbicida não trouxe prejuízos à biomassa fitoplanctonica em geral, porém não foi analisada a perda de riqueza de espécies e mais estudos levando em conta a taxonomia são necessários para analisar se houve perda de diversidade.

Palavra-chave: Tebuthiuron. Microbiota. Colunas de Winogradsky. Toxicidade.

ABSTRACT

Sugarcane planting is accompanied by an intense use of pesticides, being the crop that most uses the aerial spraying mechanism in the State of São Paulo. Much is known about the leaching potential of various herbicides and the damage they can cause to aquatic ecosystems, breaking the ecological balance in micro and macrobiota. Tebuthiuron is one of the herbicides used in sugarcane crops in Brazil since 1974, belonging to the urea group, having as a mechanism of action the inhibition of photosystem II in plants, in addition to being soluble in water and leachable. Studies have shown that the herbicide is harmful to phytoplankton and macrophytes, due to its toxicity and mode of action, in addition to affecting hormone production and spermatogenesis in tilapia. The present study used Winogradsky Columns to replicate an aquatic environment on a smaller scale and aimed to evaluate possible changes in the natural aquatic microbiota after contact with the herbicide Tebuthiuron at different concentrations over 8 weeks. pH, conductivity, chlorophyll biomass, Chemical oxygen demand, amount of heterotrophic bacteria and effects on seed germination were analyzed. The Herbicide only affected the pH in the first week, reducing it, and the conductivity was not affected by it. It was found that heterotrophic bacteria had difficulty in biodegrading the herbicide and utilizing it as an energy source in amounts greater than 500 ppm until the 4th week of the experiment, as those treatment microbial communities took longer to reach their peaks when compared to the control column, 100 ppm and 250 ppm. Tebuthiuron was shown to be harmful to *L. sativa* seed germination and root elongation. Finally, the herbicide did not harm the phytoplankton biomass in general, but the loss of species richness was not analyzed and further studies taking into account the taxonomy are needed to analyze whether there was a loss of diversity.

Key words: Tebuthiuron. Microbiota. Winogradsky Columns. Toxicity.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um País de dimensões continentais, o quinto maior do mundo, apresenta uma extensão de 8.547.403 km², ocupando quase metade do continente Sul-americano. Possui uma rica biodiversidade, diferentes climas e abundância de recursos hídricos e minerais, o que confere ao País condições favoráveis para o desenvolvimento do agronegócio (IBGE, 2016). O Brasil colonial possuía como característica marcante a exploração predatória de seus recursos através de extrativismo de recursos naturais e plantio de monoculturas em latifúndios, uso extensivo do solo e de técnicas rudimentares (IBGE, 2016). Após a emancipação nacional e libertação de Portugal, o País continuou a ter sua economia fortemente centralizada no agonegócio, característica muito marcante até os dias de hoje, em que temos no Brasil um grande exportador de comódites (produtos de base em estado bruto ou com pequeno grau de industrialização), sendo suas principais mercadorias: soja, café, suco de laranja, açúcar, bioetanol, carnes bovinas e de frango (TEIXEIRA, 2005).

O País modernizou o setor agrícola em 1960, seguindo a tendência da “Revolução Verde” norte americana nos anos 50. Nesse período, houve investimento em técnicas avançadas de manejo e maquinários agrícolas que garantiram o aumento da produção. Em concomitância impulsionou o crescimento do setor de insumos e defensivos agrícolas. Em 1975 o Brasil passou a ter um órgão responsável por registrar e restringir produtos químicos aplicados à produção agrícola com a criação do Plano Nacional de Defensivos Agrícolas (TEIXEIRA, 2005; LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Os herbicidas aplicados nos campos agrícolas reduzem o crescimento de ervas-daninhas no início do ciclo de crescimento da cultura, o que evita competições de água e nutriente entre as espécies vegetais. Além disso, apresenta flexibilidade quanto à época de aplicação, o que permite o uso dos herbicidas em diferentes etapas do cultivo para um controle efetivo das ervas-daninhas (OLIVEIRA JR., 2011). Outra vantagem do uso de herbicidas é que podem ser muito efetivos quando agrupados com outras técnicas no manejo integrado, permitindo reduzir o tráfego pesado de maquinário no campo, um dos principais responsáveis por erosão em solos susceptíveis a estes processos, além de possuírem um rendimento operacional elevado (OLIVEIRA JR., 2011).

Apesar das vantagens, os herbicidas apresentam um grau de toxicidade para o meio ambiente e o ser humano. Segundo a revisão bibliográfica de Lopes & Albu-

querque (2018) com 116 publicações recentes produzidas entre 2011 e 2017 sobre o tema, a má utilização dos agrotóxicos pode levar a um grande prejuízo sobre insetos, peixes, a água e o solo por causar alterações nos habitats naturais de muitas espécies, além de apresentarem a capacidade de contaminar reservatórios de água, rios, mares e bacias fluviais através dos processos de escoamento e lixiviação, interferindo, portanto, nos ecossistemas aquáticos. Um exemplo de como agrotóxicos podem causar prejuízos de longo prazo é o caso do Hexaclorociclohexano: inseticida persistente nos solos e de baixa degradabilidade por processos físicos, altamente tóxico e possivelmente carcinogênico, proibido desde 1985 no País (OLIVEIRA et al., 2003), foi detectado em amostras de poços e mananciais em estudo realizado por Kussumi et al. (2011). Lagos urbanos na cidade de Cascavel, local de intensa atividade agrícola apresentaram contaminação por organofosforados e em Fortaleza foram encontrados em dois rios a cipermetrina e malationa, outros exemplos de inseticidas que persistem no meio ambiente após sua aplicação agrícola (DUAVI et al., 2015; CEMBRANELI et al., 2017; LOPES & ALBUQUERQUE 2018).

Segundo um relatório da ONU de 2017, cerca de 200 mil pessoas morrem anualmente devido a envenenamento agudo por agrotóxicos, sendo os que compõem esta cifra principalmente os trabalhadores e moradores da zona rural. Além disso, segundo o ministério da saúde cerca de 84 mil pessoas sofreram intoxicação entre 2007 e 2015 no Brasil por exposição a defensivos agrícolas (VASCONCELOS, 2018). Estudos analisados por Lopes & Albuquerque (2018) apontaram dentre os efeitos danosos dos agrotóxicos: alterações celulares ligadas a diferentes tipos de neoplasia, alterações nos telômeros, problemas no fígado, dores no estômago, náuseas, cólicas abdominais alterações hormonais, alterações nos sistemas reprodutores masculinos e femininos, má formações congênitas, além de outros efeitos decorrentes da intoxicação por agrotóxicos.

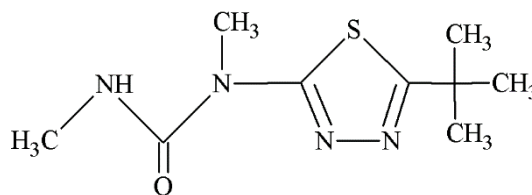
O Brasil passou a ter um marco regulatório mais restritivo no processo de registro destes produtos em 1989, através da Lei dos Agrotóxicos (7.802/89), responsável por introduzir normativas para a pesquisa, produção, comercialização e uso dos agrotóxicos, a qual infelizmente não acompanhou um maior investimento nas capacidades técnicas e nos recursos dos órgãos públicos fiscalizadores (PELAEZ et al., 2015). Apesar dos avanços na década de 80 quanto a regulamentação dos agrotóxicos, o Brasil apresenta desde os anos 2000 a maior taxa de crescimento das importações mundiais de agrotóxicos, tornando-se o maior importador mundial naquele

ano, sendo responsável em 2013 pela movimentação de 3 Bilhões de dólares segundo dados da COMTRADE (base de dados das Nações Unidas) descrito por Pelaez et al. (2015). Segundo o censo agropecuário do IBGE (2017), constata-se um aumento de 20% no total de estabelecimentos que utilizam agrotóxicos quando comparado com o censo de 2006, havendo o agravante de que do grupo de analfabetos que declarou fazer uso de agrotóxicos, 89% não apresentou orientação técnica, e do grupo alfabetizado 69% dos entrevistados não recebeu orientação técnica para o uso destes, dados extremamente preocupantes pois estes produtos devem ser utilizados nas quantidades ideais e manejados de forma adequada para evitar os prejuízos que podem decorrer do mal uso.

O Agronegócio foi responsável por 21,4% do PIB brasileiro no ano de 2019 (1,55 Trilhão de reais) (CEPEA/USP/CNA, 2020) e a cana-de-açúcar atualmente é o terceiro maior cultivo brasileiro em área de plantio, em 2016 ocupava 10.536.274 hectares (13,5% do total de áreas plantadas no País), estimando-se que sua cadeia produtiva correspondeu a 1/5 do PIB do agronegócio brasileiro (cerca de R\$ 152,3 bilhões) no último trimestre daquele ano, além de seus derivados terem correspondido a cerca de 5% das exportações do Brasil (BOMBARDI, 2017; IBGE, 2017), sendo atualmente o maior exportador mundial de açúcar e o segundo maior produtor de álcool com base na cana (BOMBARDI, 2017). A cana de açúcar corresponde a 60% das pulverizações com agrotóxicos por vias aéreas do Estado de São Paulo, sendo, portanto, a cultura que mais apresenta esse mecanismo, o qual foi proibido na União Européia em 2009 (BOMBARDI, 2017). A pulverização por vias aéreas apresenta o fenômeno da deriva, que ocorre quando parte do composto a ser pulverizado é levado a se dispersar para locais diferentes do “cultivo-alvo” por fenômenos físicos como o vento, temperatura e umidade, apresentando desta forma um alto potencial de contaminação ambiental e da população local (BOMBARDI, 2017).

Em 2017 a legislação Brasileira permitia cerca de 85 agrotóxicos autorizados para uso na Cultura de Cana de açúcar, 25 dos quais foram proibidos na Europa (BOMBARDI, 2017). Dentre os agrotóxicos proibidos na EU (UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2021) está um dos principais Herbicidas utilizados nas culturas de Cana de açúcar do Brasil, o Tebuthiuron, cuja estrutura química é: 1-(5-tert-butyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1,3-dimethylurea (Figura 1), pertencente ao grupo químico das Uréias, sendo vendido pelos nomes comerciais de Aval, Butiron, Combine, Graslan, Lava, Perflan e Spike e comercializado no País desde 1974 (OLIVEIRA JR., 2011).

Figura 1. Estrutura molecular do herbicida Tebuthiuron.



Fonte: Autor, 2021.

Trata-se de um Herbicida seletivo, que pode ser aplicado de maneira pré ou pós-emergente, sendo absorvido pelas raízes e acumulado na parte aérea das plantas (PIRES et al., 2005; SILVA JUNIOR et al., 2018). Seu modo de ação é no Fotossistema II, interrompendo o fluxo de elétrons entre os Fotossistemas ao ligar-se a proteína D1, no sítio de acoplamento onde a plastoquinona QB se ligaria, ocasionando a interrupção da fixação de CO₂ e da produção de moléculas energéticas como o ATP e NADPH₂ (OLIVEIRA JR., 2011; SILVA JUNIOR et al., 2018). Dentre os sintomas visíveis desse mecanismo de ação está a clorose foliar em função do estado energético elevado da clorofila, a qual leva a um efeito dominó onde os lipídeos são peroxidados, processo que uma vez iniciado, apresenta a característica de ser autocatalítico, ocasionando a destruição das membranas do cloroplasto e de outras estruturas da célula vegetal, ocasionando uma visível necrose foliar (OLIVEIRA JR., 2011; SILVA JUNIOR et al., 2018). Por ter alta solubilidade em água, é recomendável sua utilização nos períodos de seca, além de apresentar atividade residual no solo, com meia vida de 12 a 15 meses em ambientes com queda pluviométrica anual entre 1000 e 1500 mm (CHRISTOFFOLETI & LÓPES-OVEJERO, 2005, apud SILVA JUNIOR et al., 2018, PESSOA et al., 1999). Estudos mostraram que o Herbicida possui capacidade de infiltração em solos como o latossolo roxo e latossolo vermelho-escuro argilosos, além do alto potencial de lixiviação, podendo afetar ecossistemas aquáticos, sendo prejudicial ao fitoplâncton e macrófitas, devido a sua toxicidade e modo de ação (DAM et al. 2005; GOMES et al., 2001; KING et al., 2017; PESSOA et al., 1999; TEMPLE et al., 1991). Além de afetar a produção de hormônios e espermatogênese em tilápias e possivelmente outras espécies de peixes (ALMEIDA et al., 2018), podendo reduzir a biodiversidade e levar a prejuízos a toda a cadeia alimentar, ao afetar sua base e por consequência ao ser humano que depende das regiões para alimentação.

Dentre as diversas formas de estudar o impacto ambiental causado pelos agrotóxicos, uma das mais interessantes é a coluna de Winogradsky, desenvolvida pelo Microbiólogo Russo Sergei Winogradsky por volta de 1880 (HAIRSTON, 1999). A coluna permite replicar em menor escala um ecossistema e estudar ciclos biogeoquímicos, biodegradação de poluentes e as interações de micro-organismos entre si e formação de consórcios microbianos. É possível controlar uma gama de condições no experimento relacionadas à nutrição microbiana e utilização de poluentes, verificando ao longo do tempo as alterações na comunidade microbiana e a possível seleção de micro-organismos adaptados com potencial de biodegradar o composto contaminante de interesse do pesquisador (BABCSÁNYI et al., 2017). Uma característica observável na coluna de Winogradsky é a formação de zonas com maior abundância de oxigênio e luz no topo e zonas anaeróbias no fundo, permitindo que os micro-organismos ocupem diferentes nichos de acordo com seu modo de vida (heterótrofos ou autótrofos, aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios) (BABCSÁNYI et al., 2017; HAIRSTON, 1999).

Uma técnica que apresenta um custo mais baixo para biorremediação é a biodegradação pela microbiota local, na qual os micro-organismos utilizados (em geral bactérias, fungos filamentosos e leveduras) passam por um processo de adaptação aos compostos presentes no local impactado, passando a atuar em consórcios microbianos e utilizar em seus metabolismos os compostos orgânicos de potencial poluidor como uma fonte nutricional através de processos aeróbios e/ou anaeróbios (como respiração e fermentação), reduzindo efetivamente as concentrações dos compostos poluidores presentes no local (ANDRADE et al., 2010; MARIANO et al., 2007; ROBB & MOYER, 2001). Fatores como os tipos e a quantidade de micro-organismos no local contaminado, somado às condições físicas e químicas (pH, umidade, temperatura, oxigênio e nutrientes) do local, podem influenciar na eficácia do processo de biodegradação. Entre as estratégias de biorremediação pode ser utilizada a própria microbiota do local afetado, sendo este um método mais passivo onde não há interferência de tecnologias ativas de biorremediação; pode haver a adição de agentes estimulantes como os biossurfactantes (responsáveis por reduzir a tensão superficial ou interfacial), além de nutrientes e oxigênio (sendo conhecido como bioestimulação) e ainda pode haver a inoculação de culturas microbianas no local, por meio de um processo conhecido como bioaugmentação (MARIANO et al., 2007).

Motivado pelo fato de que grande parte dos agrotóxicos, entre estes, o Tebuthiuron, é lixiviado ou infiltrado nos lençóis freáticos e acaba contaminando ecossistemas aquáticos como rios e lagos, sendo detectado até mesmo em águas marinhas e próximo a grande barreira dos corais na Austrália, segundo KING et. al (2017). A contaminação afeta o equilíbrio e pode romper a cadeia alimentar (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Novos estudos e trabalhos demonstram a importância dos consórcios microbianos que são selecionados pela sua capacidade de biodegradar e biorremediar locais contaminados aquáticos ou terrestres (JACQUES et al., 2007; MOHANAKRISHNA et al., 2016).

Nessa perspectiva, esse estudo visa avaliar possíveis alterações na microbiota natural aquática após contato com o herbicida Tebuthiuron em diferentes concentrações. As análises serão realizadas *in vitro* com microrganismos *in-situ* do solo e lago do Instituto de biociências da Unesp, campus Rio Claro/SP. Para avaliar os impactos que o herbicida gera no meio ambiente serão realizados ensaios de toxicidade aguda em sementes de *Lactuca sativa* comparando o crescimento radicular com sementes que não tiveram contato com Tebuthiuron. Desse modo, o estudo propõe discutir as interferências que o herbicida gera nas comunidades microbianas em ambiente natural e expõe possíveis perigos de contaminação provocado pela lixiviação do Tebuthiuron.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Analisar o comportamento da microbiota aquática ao longo de 2 meses de contaminação com o herbicida Tebuthiuron nas colunas de Winogradsky, variação nas condições físico-químicas, Demanda química de oxigênio (DQO), variação na comunidade de bactérias heterotróficas, biomassa de clorofilados e fitotoxicidade através de testes de germinação com *L. sativa*.

2.2 Específicos

I. Acompanhar a variação na comunidade microbiana através de valores de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) nas diferentes concentrações de Herbicida.

II. Determinar o impacto nos produtores primários através da estimativa da quantidade de biomassa clorofilada do tipo a utilizando a extração de clorofila seguindo a Norma Técnica L5.201 adaptada da CETESB e a equação de Jeffrey & Humphrey (1975).

III. Analisar as variações das condições físico-químicas em cada coluna através do monitoramento de pH e Condutividade nas colunas de Winogradsky.

IV. Realizar ensaios de fitotoxicidade semanais com sementes de *L. sativa* para avaliar os efeitos que o Herbicida e seus metabólitos secundários provenientes da biodegradação apresentam na germinação.

V. Acompanhar a variação na DQO nas colunas ao longo do tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido na Unesp de Rio Claro, no Departamento de Biologia Geral e Aplicada no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente.

3.2 Montagem das colunas

As colunas de Winogradsky foram montadas com diferentes concentrações do herbicida Tebuthiuron para cada tratamento e o controle sem o contaminante conforme a Tabela 1.

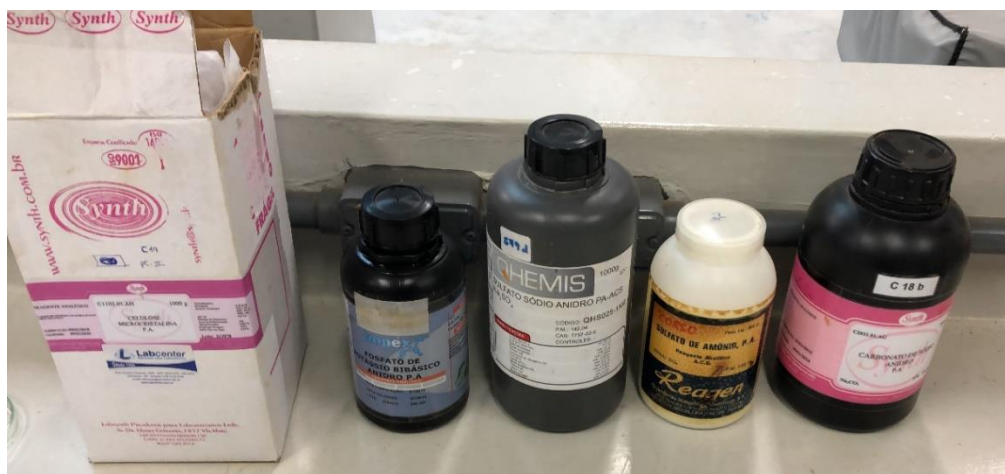
Tabela 1: Concentração do herbicida Tebuthiuron para cada tratamento.

Identificação	Contaminação
Coluna 0 (Controle)	0
Coluna 1	100 ppm
Coluna 2	250 ppm
Coluna 3	500 ppm
Coluna 4	1.000 ppm
Coluna 5	1.500 ppm

Fonte: Autor, 2021.

Para o preparo das colunas foram utilizadas garrafas plásticas de 1,5 L de água, cortadas previamente e secas. Foram colocadas 100 g de solo coletado na Unesp como sedimento, 4.5 g Na_2SO_4 , 0.2 g Na_2CO_3 , 0.2 g K_2HPO_4 , 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e 0.5 g de celulose em pó para as necessidades nutricionais da microbiota (Figura 2), permitindo seu desenvolvimento de maneira adequada, segundo a metodologia descrita por Sousa et al. (2012). A água utilizada foi coletada no lago do Instituto de Biociências, por se tratar de um lago com pouca interferência externa e rica microbiota, sendo abastecido por chuva e sem contato com poluentes, do qual foi utilizado 1 L para cada coluna.

Figura 2. Reagentes utilizados para a montagem da coluna.

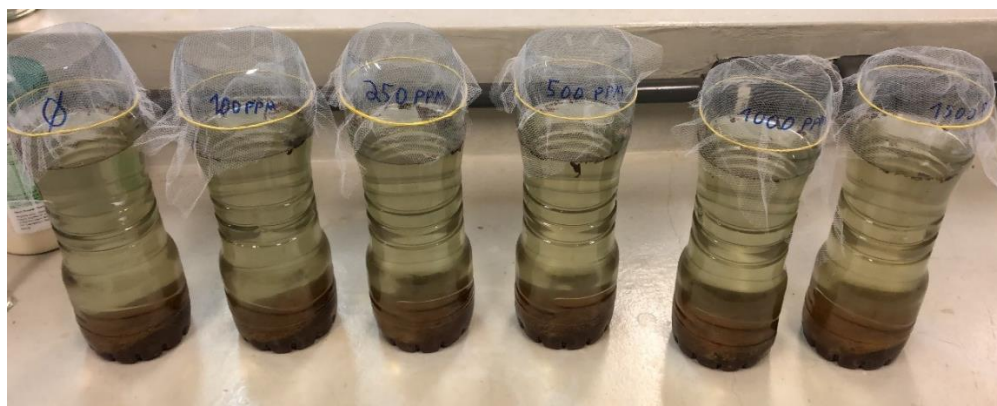


Fonte: Autor, 2021.

O Herbicida Tebuthiuron utilizado foi da marca Combine, cuja concentração é de 500 g/L. Foi preparada uma diluição na qual foi adicionado 1 g do produto em 1 L de água e a solução estoque contendo 0,5 g/L de Tebuthiuron foi utilizada para a montagem das colunas.

Para contaminar a água com o Herbicida foram utilizados diferentes balões volumétricos de 1 L aonde foi pipetada a quantidade de herbicida correspondente ao tratamento através de micropipetas. Por fim, a água dos balões foi vertida lentamente nas colunas correspondentes e estas foram cobertas com redinhas e elásticos para evitar que insetos entrem em contato com a água ou usem para depositar ovos (Figura 3). Para evitar a diluição do composto, foram realizadas marcações semanais nas colunas no ponto em que a água se encontrava, sendo realizada apenas uma leve reposição de água em alguns momentos que houve muita evaporação.

Figura 3. Colunas montadas no dia 1.



Fonte: Autor, 2021.

3.3 Testes

Foram realizados semanalmente os seguintes testes: Medição de pH e Condutividade nas colunas, ensaios de Fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* e contagem de UFCs; quinzenalmente foram realizados testes de extração de clorofila e DQO.

3.3.1 Quantificação de Clorofila A

A Clorofila A é o pigmento fotossintetizante mais importante que existe e pode ser encontrada em todos os grupos de algas e cianobactérias, micro-organismos que formam a base da cadeia trófica aquática e fornecem oxigênio, sendo frequentemente utilizada como indicadora da biomassa fitoplanctônica, podendo atuar como indicador de aumento ou diminuição dos micro-organismos em determinado local em função de contaminação orgânica e inorgânica (CETESB, 2014). A concentração de Clorofila A presente nas amostras coletadas foi quantificada pelo método espectrofotométrico de acordo com a Cetesb (2014) e Jeffrey & Humphrey (1975).

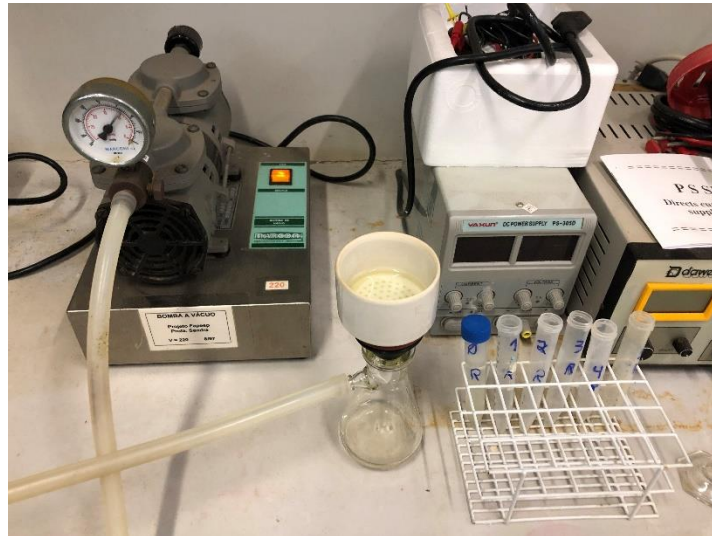
3.3.1.1 Método de extração e quantificação de Clorofila A

O método espectrofotométrico adaptado da Cetesb (2014) juntamente da equação de Jeffrey & Humphrey (1975) permite estimar a concentração de Clorofila A presente nas colunas e com este valor, a biomassa fitoplanctônica. Para realizar a extração deve-se utilizar um kitassato e bomba a vácuo para filtrar cerca de 15 mL da amostra de interesse em um filtro de fibra de vidro (Figura 4). Após a filtração deve-se adicionar 10 mL de acetona 90% no tubo de centrífuga contendo o filtro com a clorofila retida, a qual é aquecida a 75 °C por 5 minutos e em seguida resfriada por mais 5 minutos em banho de gelo, para então ser levada a geladeira por 24 horas. A leitura é realizada no espectrofotômetro UV-2401 PC (Figura 5) em cubetas de quartzo de 1 cm. Uma cubeta contendo acetona 90% é utilizada como branco e as leituras ocorrem nos espectros de 630 nm, 647nm e 664nm. Os valores são colocados na equação de Jeffrey & Humphrey (1975) para obtenção dos valores de Clorofila A para cada coluna:

- $Cl(a): (11,85.E_{664} - 1,54.E_{647} - 0,08.E_{630})$

Os valores são expressos em $\mu\text{G.mL}^{-1}$.

Figura 4. Extração de clorofila.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 5. Espectrofotômetro UV-2401 PC.



Fonte: Autor, 2021.

3.3.2 Demanda Química de Oxigênio

Quando ocorre a adição de matéria orgânica em ecossistemas aquáticos o oxigênio presente no ambiente é consumido através da oxidação química e bioquímica, levando a degradação desta matéria orgânica (VALENTE et al., 1997). Podemos por tanto, definir a DQO como a quantidade de O_2 consumido por materiais e substâncias orgânicas e minerais que são oxidadas sob condições experimentais definidas (GRANER et al., 1998). Trata-se de um parâmetro importante para estimar

o potencial poluidor de efluentes domésticos, industriais e o impacto que possuem em ecossistemas aquáticos, visto que quanto menor a concentração de oxigênio dissolvido na água mais alta está sendo sua demanda e conseqüentemente a poluição local (alta concentração de matéria orgânica) (GRANER et al., 1998; VALENTE et al., 1997). A DQO é realizada em meio acidificado com ácido sulfúrico e com a ação de um agente químico oxidante forte como o Dicromato e com íons de prata como catalisadores, e tem entre suas vantagens a velocidade que ocorre, sendo possível obter resultados em duas horas (VALENTE et al., 1997).

3.3.2.1 Preparo dos reagentes

Foram preparadas duas soluções para a digestão ácida das amostras ser realizada.

Solução digestora: Foram adicionados 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$ previamente seco em estufa a 150 °C por 2 h em 500 mL de água destilada. Após a solubilização foram adicionados lentamente 167 mL de H_2SO_4 . Em seguida adicionou-se 33,3 g de $HgSO_4$ para dissolução em temperatura e por fim foi realizada a diluição da solução em 1 L de água destilada.

Solução catalítica: Foram adicionados 5,5g de Ag_2SO_4 em 1 L de H_2SO_4 , agitando a solução lentamente com um bastão de vidro até a completa diluição do Ag_2SO_4 .

3.3.2.2 Confeção da curva padrão de Biftalato de potássio

Solução padrão de Biftalato de potássio: Foram pesados 0,8535 g de $C_8H_5O_4K$, em seguida o sal foi diluído em um Becker de 200 mL de água destilada e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, o qual teve seu volume completado com água destilada. Esta solução equivale a uma DQO de 500 mg/L O_2 .

A curva padrão foi criada a partir dos valores médios de leitura de DQO para o ajuste do método, sendo definidos os pontos de 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L de O_2 . Para validação do método analisando a curva em software e com R^2 próximo a 1 chegou-se a seguinte equação, onde $dqo(i)$ representa o valor da leitura no espectrofotômetro.

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

3.3.2.3 Método espectrofotométrico

Para a realização da DQO foram utilizados tubos de ensaio em duplicatas para cada coluna e mais dois tubos contendo água destilada para atuar como o branco do espectrofotômetro. Para cada tubo foram pipetados 2 mL da amostra de interesse, 1,2 mL da solução digestora e 2,8 mL da solução catalítica na capela com o exaustor ligado. Em seguida as amostras foram levadas para a digestão em uma termodigestora DRB200 (Figura 6) por 120 minutos, sendo realizada na sequência a leitura no espectrofotômetro utilizando cubetas de quartzo de 1cm no comprimento de onda de 600 nM, utilizando como branco a amostra contendo água destilada. O valor obtido foi colocado na equação padrão feita com o biftalato de potássio para obter o valor da DQO (APHA, 2012).

Figura 6. Termo digestora DRB 200.



Fonte: Autor, 2021.

3.3.3 Contagem de Unidades Formadoras de colônias (UFCs)

Podemos considerar as bactérias que utilizam compostos orgânicos como fontes de carbono como bactérias heterotróficas, estando presentes em todos os tipos de água, solo, vegetação ou ar (CETESB, 2006). Estas bactérias apresentam capacidade de se multiplicar após degradar compostos e utilizá-los como fonte nutritiva, sendo um importante indicador da qualidade microbiológica da água quando acompanhando regularmente sua quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por mL (CETESB, 2006). Para o estudo foi utilizada a metodologia de Pour plate (inoculação em profundidade) descrita por APHA (2012) e pela norma técnica L5.201 da Cetesb.

Deve-se preparar o meio de cultivo de ágar do tipo plate count agar (PCA), água de diluição (contendo potássio monobásico e magnésio hexahidratado) e autoclavá-los juntamente com a quantidade de placas de Petri em duplicatas para cada coluna por cerca de 20 minutos. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias é realizada com um contador mecânico de colônias.

3.3.3.1 Preparo dos materiais para a execução do teste

Para a água de diluição foram feitas duas soluções previamente. 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. Estas duas soluções são utilizadas para preparar a água salina de diluição, sendo colocadas em um balão volumétrico de 200 mL na proporção de 0,25 mL da solução 1, 1 mL da solução 2 e 198,75 mL de água destilada. Foram preparados semanalmente 18 tubos de ensaio contendo 9 mL da solução salina para a posterior diluição seriada, sendo em seguida fechados com algodão e vedados com papel alumínio.

Para o preparo do meio de cultura Plate count agar (PCA) pesou-se 8,2 g do meio de cultura desidratado e misturou-se com 400 mL de água destilada dentro de um frasco Schott de 1L. O aquecimento na autoclave é o responsável pela diluição do meio PCA na água e sua esterilização.

Separou-se também 12 placas de petri embaladas com papel, uma caixa de ponteira e todos os materiais foram levados a autoclave para a esterilização a 120

°C na pressão por 20 minutos, sendo levados em seguida para a cabine de fluxo laminar esterilizada.

Figura 7. Materiais prontos para serem autoclavados



Fonte: Autor, 2021.

Figura 8. Materiais autoclavados



Fonte: Autor, 2021.

3.3.3.2 Diluições seriadas e inoculação nas placas

A cabine de fluxo laminar foi esterilizada com o uso de álcool onde foram também limpas uma micropipeta de 1000 uL, uma caneta e dois Becker de descarte, sendo em seguida ligada a luz Ultravioleta por 15 minutos para garantir a esterilização do local, zerando o risco de contaminação. Os materiais autoclavados foram trazidos para dentro da capela e rotulados de acordo com a amostra correspondente e o grau de diluição. As diluições seriadas foram feitas através da transferência de 1 mL da amostra para o tubo de ensaio contendo água salina, agitação e subsequente transferência para o próximo tubo e por fim foi realizada a inoculação das placas em duplicatas com 1 mL da amostra de interesse e derrame de 20 mL do meio de cultura. As placas foram agitadas lentamente em movimentos de 8 para garantir o espalhamento das bactérias (Figura 9). Após o agar endurecer as placas foram vedadas com plástico filme de ponta cabeça para evitar contaminação e levadas a estufa na qual ficaram por 48 horas a uma temperatura de 28 °C.

Figura 9. Placas inoculadas após a diluição seriada



Fonte: Autor, 2021.

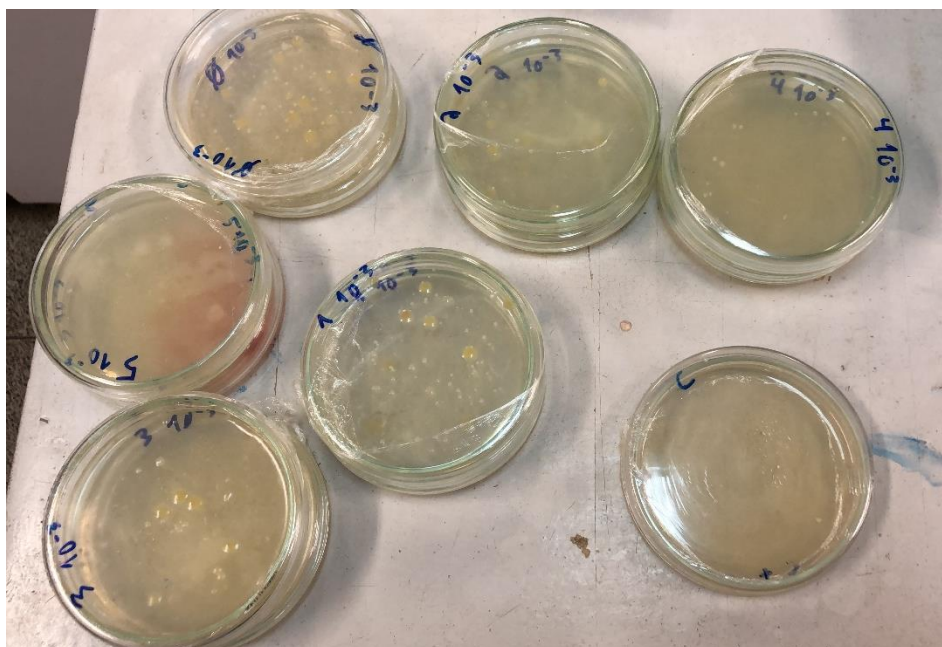
3.3.3.3 Contagem de UFCs

A contagem das Unidades Formadoras de Colônias foi realizada com um contador de colônias mecânico e os valores foram obtidos multiplicando as UFCs pelo grau de diluição realizado:

- $\text{UFCs/mL} = \text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 10^3$

Após a contagem de UFCs as placas foram levadas para a autoclave para eliminar o material biológico.

Figura 10. Placas após 48 horas a 28°C prontas para a contagem de UFCs

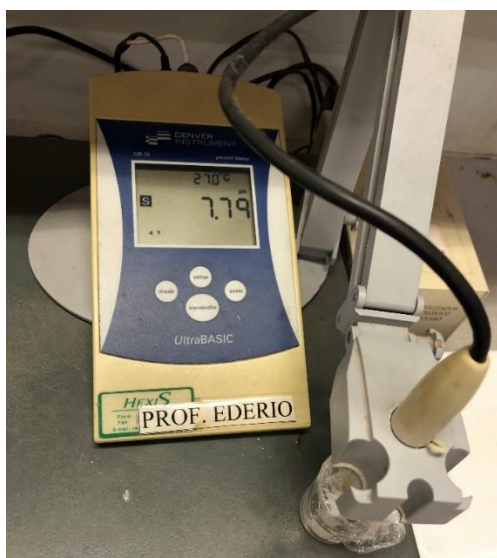


Fonte: Autor, 2021.

3.3.4 Análises de pH e condutividade

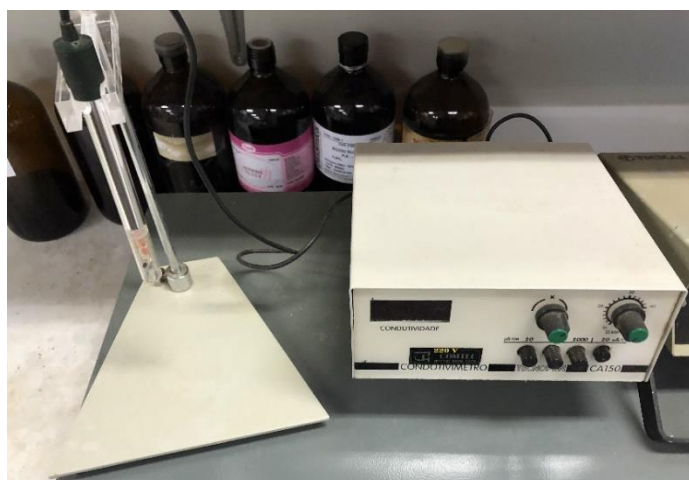
Seguindo as metodologias de APHA (2012) foram medidas semanalmente as variações de pH e de condutividade elétrica nas colunas de Winogradsky, utilizando para tanto um pHmetro Digimed DMPH-2 e um condutivímetro Tecnopom CA150, previamente calibrados.

Figura 11. pHmetro Digimed DMPH-2



Fonte: Autor, 2021.

Figura 12. Condutivímetro Tecnopom CA150



Fonte: Autor, 2021.

3.3.5 Ensaio de Fitotoxicidade com sementes de *L. sativa*

Para o teste de germinação foram utilizadas sementes de *L. sativa* da marca Isla Park®, do Lote 21302 sem defensivos agrícolas, índice de 98% de desempenho germinativo e 100% de pureza. As sementes não possuem melhoramento genético ou transgênico (Figura 13).

Figura 13. Sementes utilizadas



Fonte: Autor, 2021.

As placas de Petri foram esterilizadas antes do uso e em seu fundo foi colocado um papel de filtro embebido através da adição de 3 mL de cada amostra a ser testada com o auxílio de micropipetas, sendo em seguida alocadas 20 sementes em duplicatas. As placas foram vedadas com plástico filme para evitar contaminação e perda da umidade e sobre elas foi colocada uma camada de papel alumínio para simular um ambiente escuro para sua germinação, sendo então levadas a câmara de germinação BOD para incubação por 5 dias a 21 °C. Após o período foram realizadas medidas das radículas em centímetros e o número de sementes germinadas foi contabilizada (MONTEIRO & DELLAMATRICE, 2006). Como controle positivo foi utilizado sulfato de zinco 0,05 mol/L e como controle negativo, água deionizada. O procedimento seguiu de acordo com o teste descrito por Sobrero & Ronco (2008) e Monteiro & Dellamatrice (2006) com modificações e visa através dos cálculos de Germinação Relativa (Equação 1) e Elongação Radicular Relativa (Equação 2). O fator entre a enlongação da radícula e germinação de sementes é avaliado pelo Índice de Germinação (Equação 3) (ARAUJO, 2010). Os testes foram realizados com três repetições e submetidos a dados estatísticos não paramétricos utilizando o método de Kruskal-Wallis no programa BioEstat 4.

$$\text{Germinação Relativa (\%)} = \frac{\text{Número de Sementes Germinadas na Amostra}}{\text{Número de Sementes Germinadas no Controle}} * 100 \quad (1)$$

$$\text{Enlongação Radicular Relativa (\%)} = \frac{\text{Enlongamento Médio na Amostra}}{\text{Enlongamento Médio no Controle}} * 100 \quad (2)$$

$$\text{Índice de Germinação (\%)} = \frac{\text{Germinação Relativa(\%)} * \text{Enlongação Radicular Relativa(\%)}}{100} \quad (3)$$

Figura 14. Sementes após 5 dias na câmara de germinação



Fonte: Autor, 2021.

3.4 Análises de dados

Após a realização dos experimentos, os dados foram compilados em tabelas e analisados através do Excel. A montagem de gráficos foi realizada no software Origin pro 2018 para auxiliar na visualização e comparação dos resultados obtidos nos diferentes tratamentos com o controle e entre si. Foram realizados testes esta-

tísticos através do software Bioestat 5.3 do tipo teste não paramétrico de Kruskal-wallis Dunn que garantiram a significância e correlação observados.

3.5 Tratamento e descarte de resíduos da pesquisa

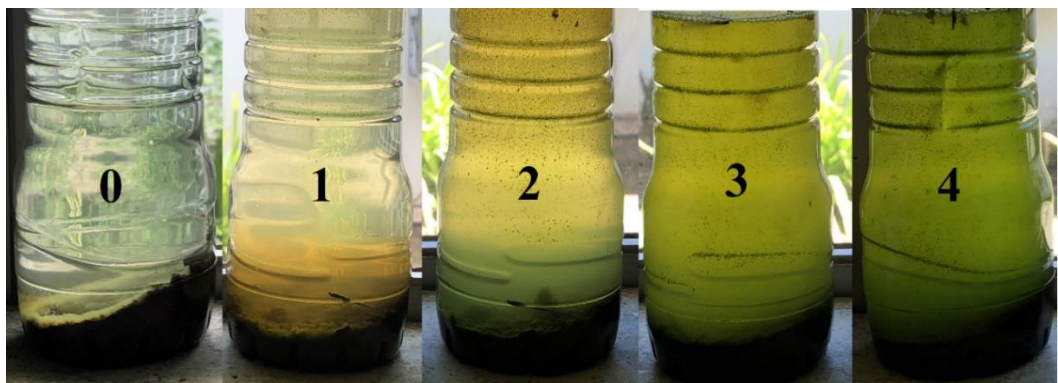
Todo resíduo químico dos materiais utilizados no processo de pesquisa foi levado para a área de resíduos do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da Unesp em frascos devidamente rotulados para serem acumulados no local. Todo resíduo biológico presente foi levado para a autoclave a 120 °C a 1,5 atm por 20 minutos para evitar a possível contaminação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Colunas de Winogradsky

Foi estabelecida uma escala visual de 5 intensidades com a turbidez das colunas com base na compilação e seleção das imagens ao longo do experimento conforme a Figura 15.

Figura 15. Escala de turbidez das colunas estabelecida para auxiliar na análise



Fonte: Autor, 2021.

Todas as colunas apresentaram uma coloração de água cristalina (0) nas duas primeiras semanas de experimento (Figura 16), (Figura 17), sendo possível observar um leve aumento na turbidez a partir da segunda semana do experimento. Foi possível constatar a formação de biofilmes nas laterais das colunas de Winogradsky ao longo do experimento, conforme apontado por Hairston (1999).

Figura 16. Colunas na semana 1



Fonte: Autor, 2021.

Figura 17. Colunas na semana 2



Fonte: Autor, 2021.

A partir da semana 3 (Figura 18) a coluna 100 ppm se apresentou visivelmente mais verde (2) do que a controle e os outros tratamentos (1), com exceção da coluna 250 ppm (entre 1 e 2).

Figura 18. Colunas na semana 3

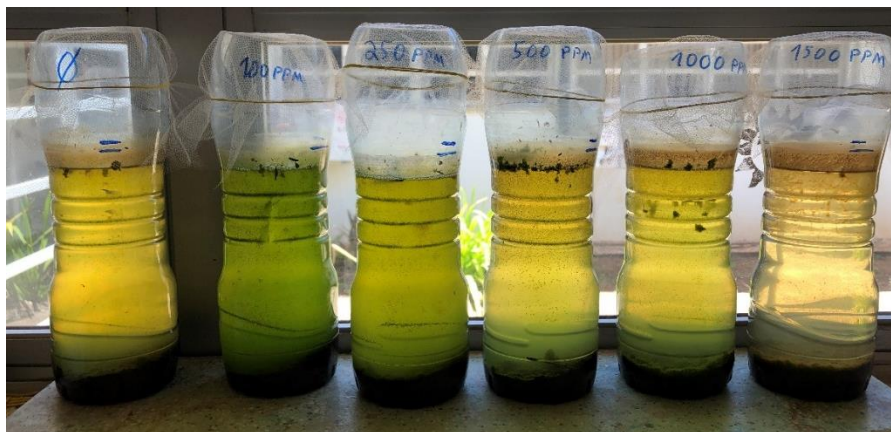


Fonte: Autor, 2021.

A partir da 4ª semana (Figura 19) as 6 colunas se mostraram com mais turbidez, sendo as colunas 0, 500 ppm e 1000 ppm na intensidade 2, a coluna 250 ppm na intensidade 3 e a coluna 100 ppm na intensidade máxima (4), sendo que o tratamento 1500 ppm manteve a menor turbidez (1). O momento que as colunas apresentaram a maior turbidez em todo o experimento foi na 5ª semana (Figura 20), possivelmente demonstrando que a microbiota fitoplanctonica sofreu seleção adaptativa pelo contato com o herbicida e possivelmente passou a utilizar o contaminante como fonte de carbono. A turbidez observada conforme a escala foi de intensidade 3 para

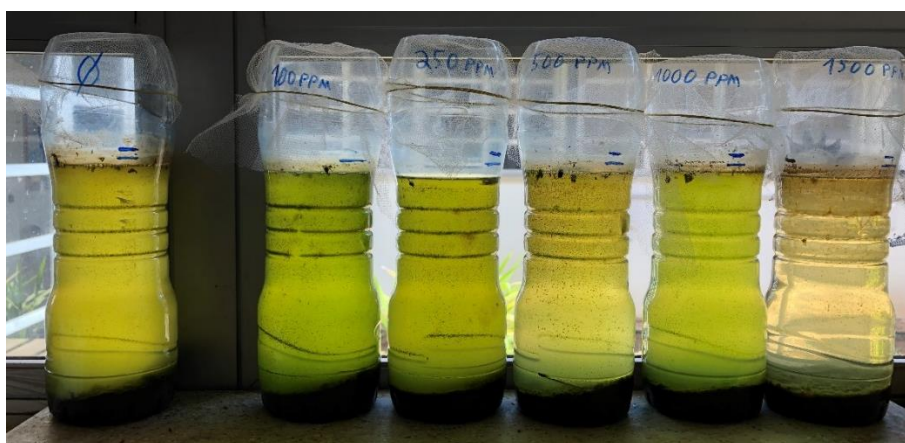
a coluna 0, 250 ppm e 1000 ppm, 2 para 500 ppm e 1 para 1500 ppm, sendo que a coluna 100 ppm manteve a turbidez máxima de intensidade 4.

Figura 19. Colunas na semana 4



Fonte: Autor, 2021.

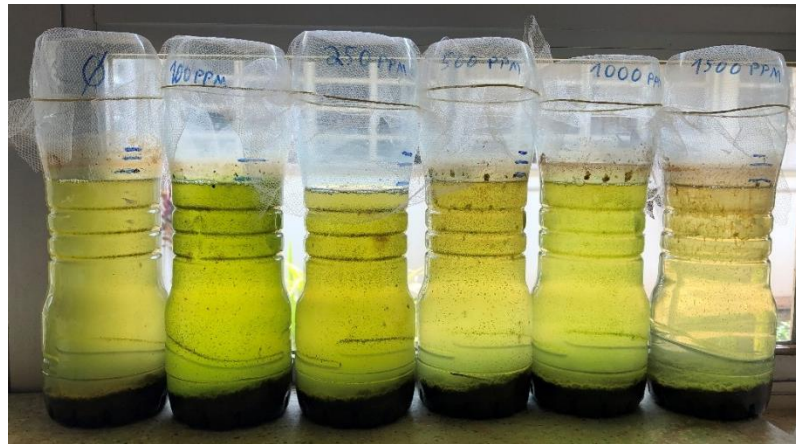
Figura 20. Colunas na semana 5



Fonte: Autor, 2021.

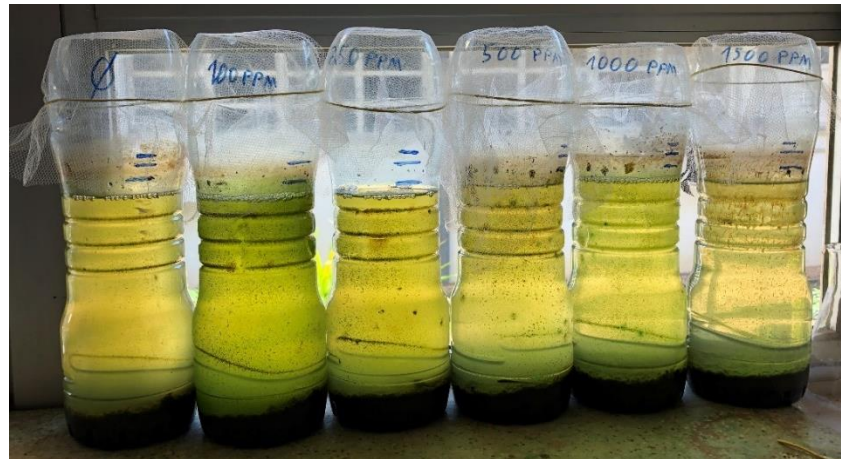
Nas semanas seguintes de experimento (Figura 21), (Figura 22), (Figura 23) foi possível constatar que as colunas perderam um pouco da tonalidade mais intensa esverdeada com exceção do tratamento 100 ppm que manteve o verde escuro intenso de intensidade 4 até o final do experimento. O tratamento 1500 ppm apresentou uma coloração de intensidade 2 ao final do experimento, uma turbidez mais baixa, porém indicando a possível adaptação da microbiota fitoplânctonica ao Tebuthiuron ou o aumento populacional de alguma espécie resistente ao composto.

Figura 21. Colunas na semana 6



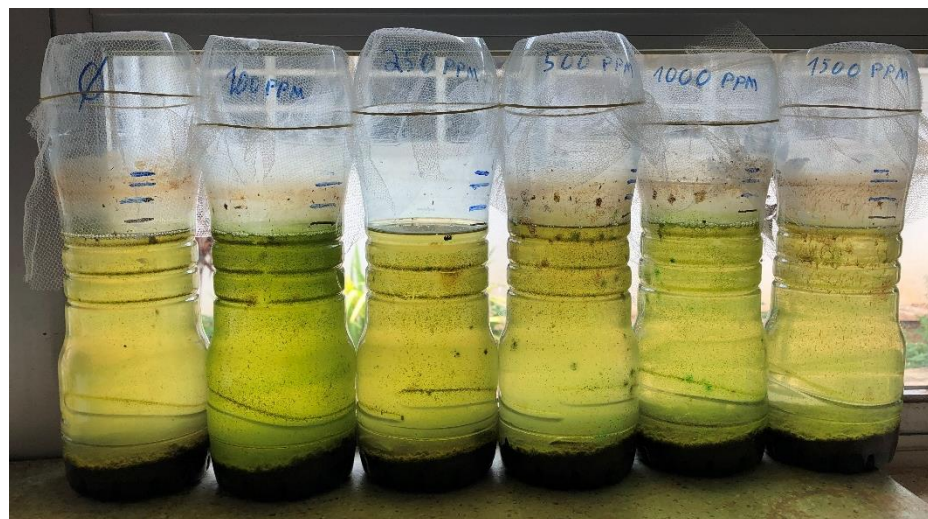
Fonte: Autor, 2021.

Figura 22. Colunas na semana 7



Fonte: Autor, 2021.

Figura 23. Colunas na semana 8 (final do experimento)



Fonte: Autor, 2021.

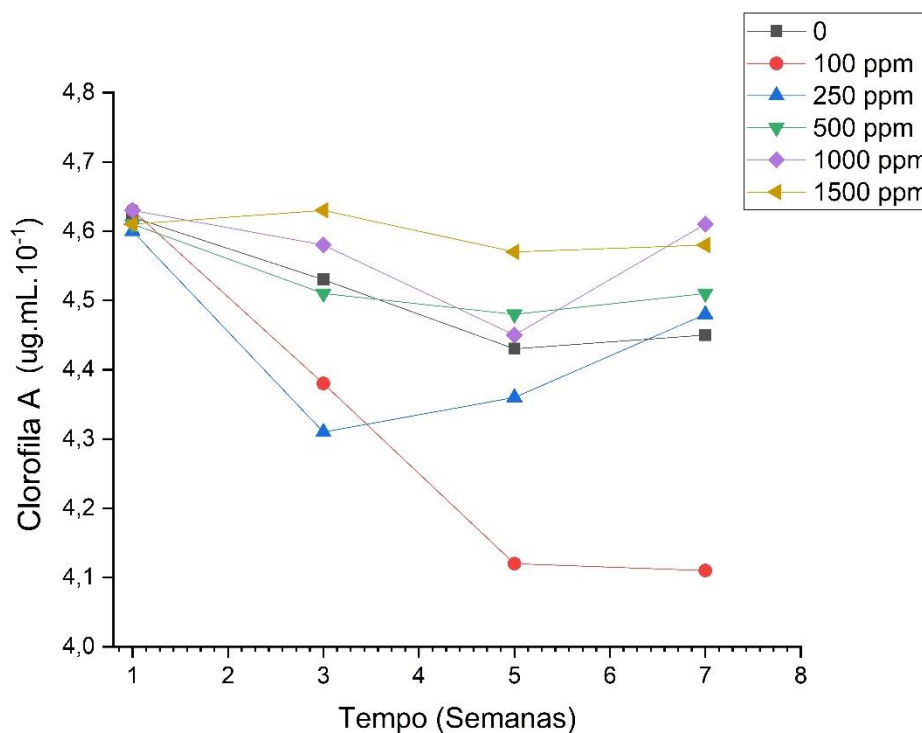
4.2 Extração de Clorofila

O valor de clorofila em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ se alterou pouco nas colunas ao longo dos dois meses de testes (Tabela 2) contrariando a hipótese inicial de que o herbicida causaria uma queda na produtividade correlacionada ao aumento na concentração do Tebuthiuron nos tratamentos, como foi observado no estudo de Temple et al. (1991) onde os produtores primários da microbiota aquática foram afetados conforme o aumento na concentração do contaminante. Todas as colunas apresentaram a mesma quantidade de $4,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inicial e com exceção das colunas 1000 ppm e 1500 ppm apresentaram quedas muito leves após 15 dias de experimento. Mesmo nos tratamentos contendo as concentrações mais elevadas do herbicida, sendo estas: 500 ppm, 1000 ppm e 1500 ppm, o valor de Clorofila A oscilou muito pouco, entre $4,4$ e $4,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, retornando ao valor inicial nos tratamentos 1000 e 1500 ppm e ficando acima da quantidade da coluna controle (Figura 24). Os tratamentos de 100 ppm e 250 ppm foram os que apresentaram a maior queda no valor, sendo que o tratamento de 100 ppm apresentou reduções contínuas ao longo do experimento, começando com $4,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como os outros tratamentos e finalizando com biomassa clorofilada reduzida de $4,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O Tratamento de 250 ppm apresentou leve redução após 15 dias e sucessivos aumentos nas semanas seguintes, finalizando $4,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valor muito próximo do controle.

Tabela 2. Resultados da quantidade de Clorofila A em função do tempo.

Variação de Clorofila A em função do tempo em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (-10)						
Tempo (semanas)	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	4,62	4,63	4,6	4,61	4,63	4,61
3	4,53	4,38	4,31	4,51	4,58	4,63
5	4,43	4,12	4,36	4,48	4,45	4,57
7	4,45	4,11	4,48	4,51	4,61	4,58

Fonte: Autor, 2021.

Figura 24. Gráfico contendo os resultados da extração de Clorofila A em função do tempo

Fonte: Autor, 2021.

Entre as possíveis hipóteses para explicar a baixíssima alteração na biomassa clorofilada das colunas, mesmo com o aumento nas concentrações do herbicida, podemos discorrer que pode ter ocorrido uma seleção de micro-organismos fotossintetizantes resistentes ao herbicida ao longo do experimento. A hipótese tem como base o estudo desenvolvido por Peterson et al. (1994), que demonstrou que o herbicida foi praticamente inofensivo para a alga *Anabaena inaequalis*, sendo este um importante gênero de cianobactérias filamentosas que compõem o fitoplâncton, enquanto que foi altamente tóxico para diatomáceas e algas verdes (inibindo até 70 % da fotossíntese destas). Outra possibilidade seria a seleção de microalgas com um aparato enzimático para degradar o Tebuthiuron, podendo utilizá-lo como fonte de carbono, o que explicaria a não inibição do crescimento de clorofilados. O composto pode ter sido degradado pelos consórcios microbianos que se formaram ao longo dos dois meses de experimento ou sofrido degradação química, conforme apontado por GOMES et al. (2001). Por fim, resta a hipótese de que mesmo nos tratamentos com as concentrações mais elevadas de Tebuthiuron, o herbicida pode não ter esta-

do concentração suficiente para apresentar toxicidade e inibir a fotossíntese dos micro-organismos clorofilados.

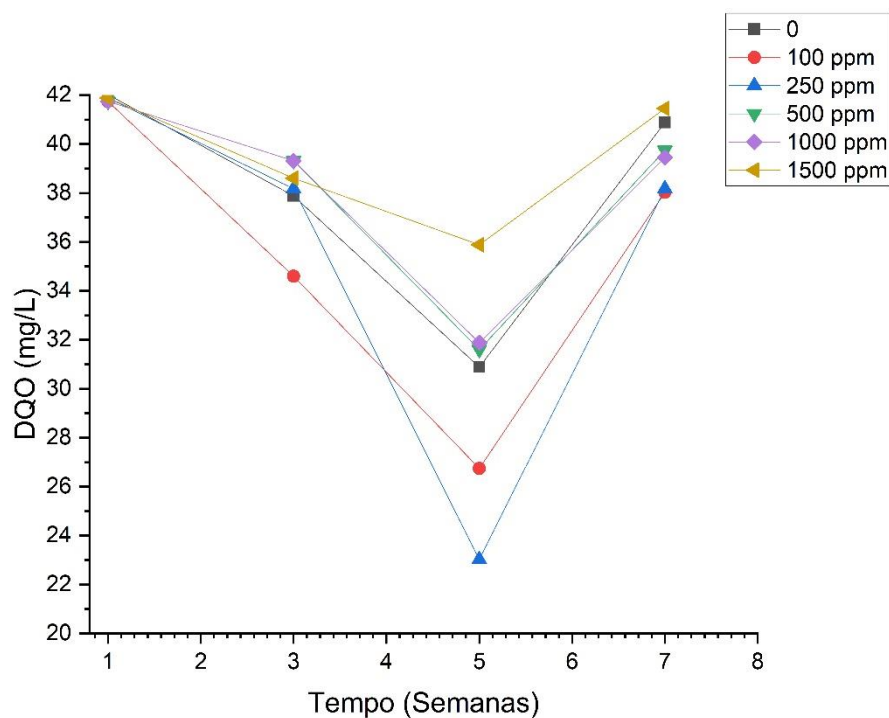
4.3 Demanda Química de Oxigênio

A coluna controle e os 5 tratamentos apresentaram inicialmente um valor muito próximo de DQO, estando em torno de 42 mg/L (Tabela 3). Sabendo-se que a DQO estima a oxidação química de poluentes em ecossistemas aquáticos e quanto mais alto seu valor menor a concentração de oxigênio no ambiente, a hipótese inicial seria a de que os tratamentos com maior quantidade de herbicida fossem apresentar DQOs mais elevadas e com isso menos oxigênio disponível (GRANER et al., 1998; GOMES et al. 2001; VALENTE et al., 1997). É possível observar que após 2 semanas de experimento a DQO sofreu uma pequena queda no controle e nos tratamentos, sendo mais acentuada em 100 ppm (34,6 mg/L) (Figura 25). Após 5 semanas de experimento o valor de DQO esteve mais baixo com o controle apresentando o valor de 30,88 mg/L e os tratamentos 100 ppm e 250 ppm apresentando valores ainda mais baixos, sendo estes respectivamente 26,74 mg/L e 23,02 mg/L. Os outros tratamentos apresentaram valores de DQO acima de 30 mg/L no mesmo período, sendo que em 1500 ppm o valor (35,88 mg/L) se manteve próximo ao da semana 3 (38,6 mg/L). Os valores observados ao longo do experimento podem indicar que a degradação do herbicida ocorreu também de maneira química, como apontado por GOMES et al. (2001), visto que a DQO se manteve mais alta nos tratamentos contendo as concentrações mais elevadas do herbicida.

Tabela 3: Resultados da DQO em função do tempo.

Variação da DQO em função do tempo (em mg/L)						
Tempo (semanas)	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	42,02	41,74	41,88	41,74	41,74	41,88
3	37,88	34,6	38,17	39,31	39,31	38,6
5	30,88	26,74	23,02	31,6	31,88	35,88
7	40,88	38,02	38,17	39,74	39,45	41,45

Fonte: Autor, 2021.

Figura 25. Gráfico contendo os resultados da DQO em função do tempo

Fonte: Autor, 2021.

Ao fim do experimento os valores de DQO estiveram muito próximos dos valores iniciais do experimento para o controle e os 5 tratamentos, o que pode indicar que a quantidade de metabólitos secundários derivados da biodegradação ou químiodegradação do herbicida ou até mesmo de outras moléculas orgânicas presentes na água ainda se encontravam em processo de degradação.

4.4 Ensaios de Fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* e testes estatísticos

A hipótese inicial que antecedeu os experimentos consistiu na ideia de que o Tebuthiuron traria algum prejuízo ao desenvolvimento radicular, visto que é absorvido por esta região e as plântulas são mais sensíveis em seus primeiros dias após a germinação, além de prejudicar a germinação por se tratar de um composto químico (PIRES et al., 2005; SILVA JUNIOR et al., 2018; DAM et al., 2015).

Para analisar a significância dos resultados foi realizado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis Dunn para os três tipos de análise desenvolvidos, e os resultados se mostraram estatisticamente significativos quando comparando o controle de água filtrada com as colunas 250 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, porém não significativo quando comparando os outros tratamentos entre si.

4.4.1 Análise de Germinação Relativa (%)

O controle feito com água filtrada semanalmente apresentou ao longo das 8 semanas de experimento valores de Germinação Relativa ao controle negativo superiores a 90%, apresentando uma média geral ao longo do experimento de 94,74%, enquanto que os 5 tratamentos apresentaram uma média geral menor ou igual a 87% (Tabela 4), valor que ficou abaixo também da coluna controle (0), que apresentou média geral de 91,91%. A média da germinação quando utilizada água da coluna controle (0) ficou abaixo da média de germinação com água filtrada provavelmente por conta da presença de micro-organismos e metabólitos presentes na água em decorrência das atividades destes, os quais podem ter impactado a germinação. Os valores obtidos constatarem que o Herbicida Tebuthiuron, apesar de apresentar como mecanismo de ação a inibição do Fotossistema II das plantas, possui um efeito prejudicial na germinação das sementes devido a sua composição química.

Tabela 4: Média das Germinações Relativas (%) semanais.

Média %						
Controle	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
94,74	91,91	87,83	82,53	87,28	82,78	83,78

Fonte: Autor, 2021.

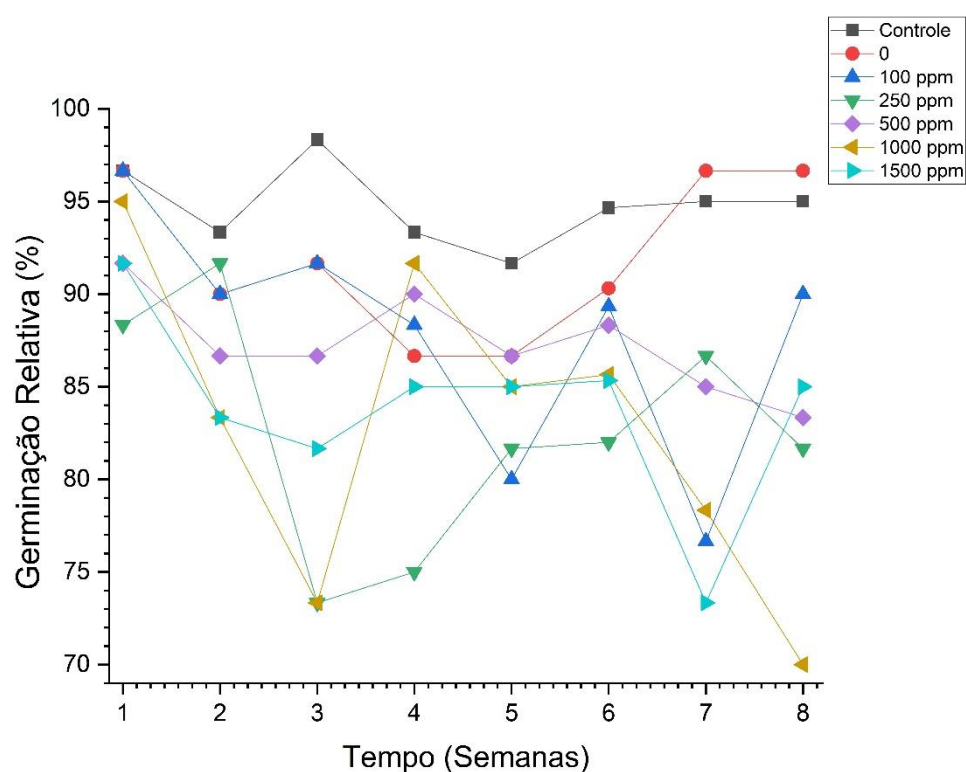
Ao longo dos dois meses do experimento, o valor mais baixo registrado foi de 70% de Germinação Relativa no tratamento 1000 ppm na semana final do experimento, porém outros valores baixos foram constatados na coluna 250 ppm nas semanas 3 e 4, sendo estes 73,33% e 75% respectivamente, e 73,33% na coluna 1000 ppm na semana 3 e na coluna 1500 ppm na semana 7 (Tabela 5). Os valores mais baixos registrados na coluna 100 ppm foram na semana 5 e 7, sendo respectivamente 80% e 76,66% (Figura 26). Apesar da concentração maior de herbicida na coluna 500 ppm, este tratamento apresentou um valor de Germinação Relativa (%) muito próximo ao observado na coluna 100 ppm, contrariando o que pode ser observado nos tratamentos 250 ppm, 1000 ppm e 1500 ppm.

Tabela 5: Resultados de Germinação Relativa (%) em função do tempo.

Germinação Relativa (%)							
Tempo (semanas)	Controle	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	96,66	96,66	96,66	88,33	91,66	95	91,66
2	93,33	90	90	91,66	86,66	83,33	83,33
3	98,33	91,66	91,66	73,33	86,66	73,33	81,66
4	93,33	86,66	88,33	75	90	91,66	85
5	91,66	86,66	80	81,66	86,66	85	85
6	94,66	90,32	89,33	82	88,32	85,66	85,33
7	95	96,66	76,66	86,66	85	78,33	73,33
8	95	96,66	90	81,66	83,33	70	85

Fonte: Autor, 2021.

Deve-se atentar para o fato de que por se tratar de um composto diluído na água das colunas, nem sempre a água utilizada para embeber o papel filtro das sementes estava com a máxima concentração do herbicida para aquele tratamento, o que pode ter influenciado algumas oscilações observadas nas germinações relativas (%) observadas ao longo do experimento. Apesar disto, é interessante constatar que mesmo diluído na água o Tebuthiuron apresenta capacidade de prejudicar a germinação, pois segundo DAM et al. (2015) e KING et al. (2017) o Tebuthiuron apresenta alta solubilidade em água e com isso grande potencial de lixiviação, e esta água contaminada pode acabar sendo utilizada por famílias que praticam agricultura de subsistência, tendo com isso prejuízos em sua agricultura em decorrência da má utilização de agrotóxicos por agricultores maiores.

Figura 26. Gráfico contendo os resultados de Germinação Relativa (%) em função do tempo**Fonte:** Autor, 2021.**Tabela 6.** Tabela contendo os testes estatísticos de Germinação Relativa (%)

Resultados		Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
H =	20.6163	Postos médios 1 e 2	15.3125	2.1875	2.935	ns
Graus de liberdade =	5	Postos médios 1 e 3	26.5625	3.7946	2.935	< 0.05
(p) Kruskal-Wallis =	0.001	Postos médios 1 e 4	17.625	2.5179	2.935	ns
R 1 =	342	Postos médios 1 e 5	24.5625	3.5089	2.935	< 0.05
R 2 =	219.5	Postos médios 1 e 6	25.4375	3.6339	2.935	< 0.05
R 3 =	129.5	Postos médios 2 e 3	11.25	1.6071	2.935	ns
R 4 =	201	Postos médios 2 e 4	2.3125	0.3304	2.935	ns
R 5 =	145.5	Postos médios 2 e 5	9.25	1.3214	2.935	ns
R 6 =	138.5	Postos médios 2 e 6	10.125	1.4464	2.935	ns
R 1 (posto médio) =	42.75	Postos médios 3 e 4	8.9375	1.2768	2.935	ns
R 2 (posto médio) =	27.4375	Postos médios 3 e 5	2	0.2857	2.935	ns
R 3 (posto médio) =	16.1875	Postos médios 3 e 6	1.125	0.1607	2.935	ns
R 4 (posto médio) =	25.125	Postos médios 4 e 5	6.9375	0.9911	2.935	ns
R 5 (posto médio) =	18.1875	Postos médios 4 e 6	7.8125	1.1161	2.935	ns
R 6 (posto médio) =	17.3125	Postos médios 5 e 6	0.875	0.125	2.935	ns

Fonte: Autor, 2021.

4.4.2 Análise de Elongação Radicular (%)

Foi possível observar um efeito significativo do herbicida na elongação radicular dos tratamentos de 250 ppm, 1000 ppm e 1500 ppm quando comparados ao controle de água filtrada realizado semanalmente (Tabela 7), com seus valores oscilando entre 25% e 45% ao longo do experimento, apresentando uma média de elongação radicular de 34,94% para 250 ppm, 36,38% para 1000 ppm e 35,65% para 1500 ppm enquanto que o controle semanal apresentou valores de elongação radicular acima de 55% ao longo de todo o experimento com exceção da semana 7, apresentando uma média de 57,31% de todo o experimento (Tabela 8). A coluna controle (0) apresentou os segundos valores mais altos de elongação radicular com exceção das semanas 2, 4 e 5, possuindo uma média de 44,83 % de elongação radicular de todo o experimento, ficando com esta média geral acima das médias gerais dos 5 tratamentos, porém abaixo do controle com água filtrada. O tratamento de 250 ppm acabou apresentando a média geral mais baixa de todos os tratamentos, sendo este valor de 34,94%, com um dos valores mais baixos entre os tratamentos sendo registrado na semana 3 (25,38%). O tratamento 500 ppm acabou destoando novamente dos outros tratamentos como observado na Germinação Relativa (%), ao apresentar uma porcentagem de Elongação Radicular mais alta que todos os tratamentos, com uma média de 42,51% (sendo o único valor abaixo dos outros registrado na semana 4, sendo de 35,77%), porém um pouco mais baixa que o do controle (0) ao longo dos experimentos.

Tabela 7. Tabela contendo os testes estatísticos de Elongação Radicular (%)

Resultados		Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
H =	23.176	Postos médios 1 e 2	19.3125	2.7589	2.935	ns
Graus de liberdade =	5	Postos médios 1 e 3	28.9375	4.1339	2.935	< 0.05
(p) Kruskal-Wallis =	0.0003	Postos médios 1 e 4	14.5625	2.0804	2.935	ns
R 1 =	348	Postos médios 1 e 5	24.8125	3.5446	2.935	< 0.05
R 2 =	193.5	Postos médios 1 e 6	26.375	3.7679	2.935	< 0.05
R 3 =	116.5	Postos médios 2 e 3	9.625	1.375	2.935	ns
R 4 =	231.5	Postos médios 2 e 4	4.75	0.6786	2.935	ns
R 5 =	149.5	Postos médios 2 e 5	5.5	0.7857	2.935	ns
R 6 =	137	Postos médios 2 e 6	7.0625	1.0089	2.935	ns
R 1 (posto médio) =	43.5	Postos médios 3 e 4	14.375	2.0536	2.935	ns
R 2 (posto médio) =	24.1875	Postos médios 3 e 5	4.125	0.5893	2.935	ns
R 3 (posto médio) =	14.5625	Postos médios 3 e 6	2.5625	0.3661	2.935	ns
R 4 (posto médio) =	28.9375	Postos médios 4 e 5	10.25	1.4643	2.935	ns
R 5 (posto médio) =	18.6875	Postos médios 4 e 6	11.8125	1.6875	2.935	ns
R 6 (posto médio) =	17.125	Postos médios 5 e 6	1.5625	0.2232	2.935	ns

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 8: Média das Elongações Radiculares (%) semanais.

Média %						
Controle	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
57,31	44,83	39,9	34,94	42,51	36,38	35,65

Fonte: Autor, 2021.

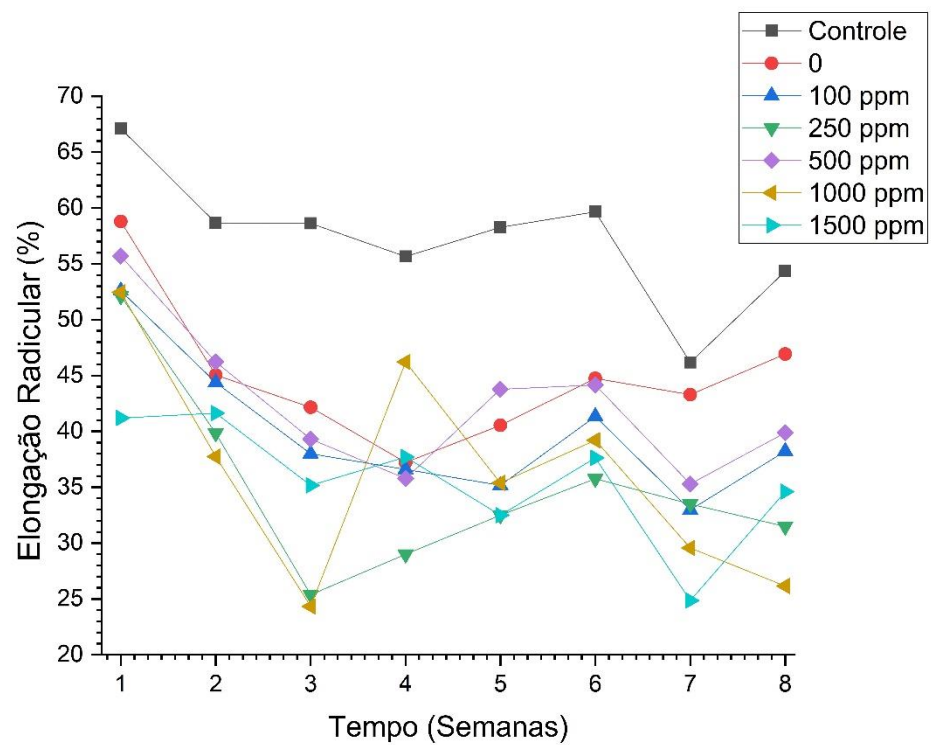
Entre as possíveis explicações para estes valores observados no tratamento 250 ppm e 500 ppm podemos discernir que a água utilizada para embeber as sementes foi retirada de uma região com maior e menor concentração do herbicida diluído respectivamente e que no tratamento 500 ppm grande parte do Tebuthiuron pode ter sido já degradada por consórcios microbianos mais eficientes que os formados nos outros tratamentos. A partir de 1000 ppm e 1500 ppm o crescimento ficou prejudicado quando comparados aos tratamentos 100 ppm, 500 ppm e aos controles semanais e coluna 0, sendo que os valores mais baixos Elongação Radicular (%) foram registrados nos tratamentos com maiores concentrações de Tebuthiuron, na semana 3 para 1000 ppm (24,33%) (com um valor muito próximo registrado para o tratamento 250 ppm) e na semana 7 (24,85%) para 1500 ppm (Tabela 9), e devido ao fato destes tratamentos apresentarem concentrações mais elevadas de Tebuthiuron diluídas na água, a probabilidade de embeber as sementes com o herbicida semanalmente eram mais altas do que nos outros tratamentos.

Por fim, visto que a coluna controle (0) apresentou valores próximos das outras colunas em alguns momentos do experimento e sua média geral (44,83%) ficou bem próxima a do tratamento 100 ppm (39,9%) e 500 ppm (42,51%) não é possível atribuir totalmente o prejuízo na Elongação Radicular a ação do Herbicida Tebuthiuron diluído na água, apesar de ser possível constatar que ocorre, pois todos os tratamentos ficaram abaixo do controle semanal de água filtrada e da coluna 0, sendo que muito provavelmente os produtos da microbiota também foram um fator responsável por afetar a Elongação Radicular, uma vez que as sementes são muito sensíveis a compostos químicos nocivos nos primeiros dias de germinação.

Tabela 9: Resultados de Elongação Radicular (%) em função do tempo

Elongação Radicular (%)							
Tempo (semanas)	Controle	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	67,1	58,8	52,59	52,11	55,7	52,46	41,19
2	58,67	45,04	44,38	39,84	46,22	37,74	41,63
3	58,62	42,15	38	25,38	39,31	24,33	35,16
4	55,65	37,22	36,6	29	35,77	46,22	37,7
5	58,27	40,54	35,16	32,5	43,77	35,38	32,5
6	59,66	44,75	41,34	35,76	44,15	39,22	37,63
7	46,17	43,29	32,98	33,5	35,29	29,57	24,85
8	54,34	46,92	38,22	31,49	39,88	26,16	34,6

Fonte: Autor, 2021.

Figura 27. Gráfico contendo os resultados de Elongação Radicular (%) em função do tempo

Fonte: Autor, 2021.

4.4.3 Análise de Índice de Germinação (%)

Através do Índice de Germinação (%) é possível analisar o fator entre a elongação da raiz e a germinação. Assim como na Germinação Relativa (%) e na Elongação Radicular (%) foi possível observar no Índice de Germinação (%) valores maiores para o controle negativo e para a coluna controle (0) do que para os tratamentos, sendo suas médias gerais respectivamente 54,49% e 41,45% (Tabela 10). Os tratamentos 250 ppm, 1000 ppm e 1500 ppm apresentaram médias gerais de 29,36%, 30,99% e 30,23% respectivamente, ficando bem abaixo dos controles, tendo seus valores mais baixos sido registrados na semana 3 para 250 ppm (18,65%) e 1000 ppm (17,91%) e na semana 7 para 1500 ppm (18,33%) estando relacionados aos valores mais baixos também registrados de Elongação Radicular (Tabela 11). Assim como nos outros testes relacionados as sementes de *L. sativa*, o tratamento 500 ppm destoou dos outros tratamentos obtendo valores mais altos e apresentando uma média geral de 37,37%, mais alta até mesmo do que a observada em 100 ppm (35,49%), porém mesmo assim, ficando abaixo dos controles.

Tabela 10: Média dos Índices de Germinação semanais (%)

Média %						
Controle	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
54,49	41,45	35,49	29,36	37,37	30,99	30,23

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 11: Resultados de Índice de Germinação (%) em função do tempo.

Índice de Germinação (%)							
Tempo (semanas)	Controle	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	64,74	57	50,83	46,27	51,04	49,84	37,81
2	54,97	40,53	39,94	36,59	40,5	31,58	34,77
3	57,71	38,6	34,83	18,65	34,11	17,91	29
4	51,95	32,48	32,4	21,93	32,6	42,65	32,04
5	53,67	35,22	28,13	26,58	37,95	30,07	28,17
6	56,6	40,76	37,22	30	39,24	34,41	32,35
7	43,86	41,78	25,84	29	30,21	23,17	18,33
8	52,43	45,3	34,8	25,87	33,32	18,31	29,41

Fonte: Autor, 2021.

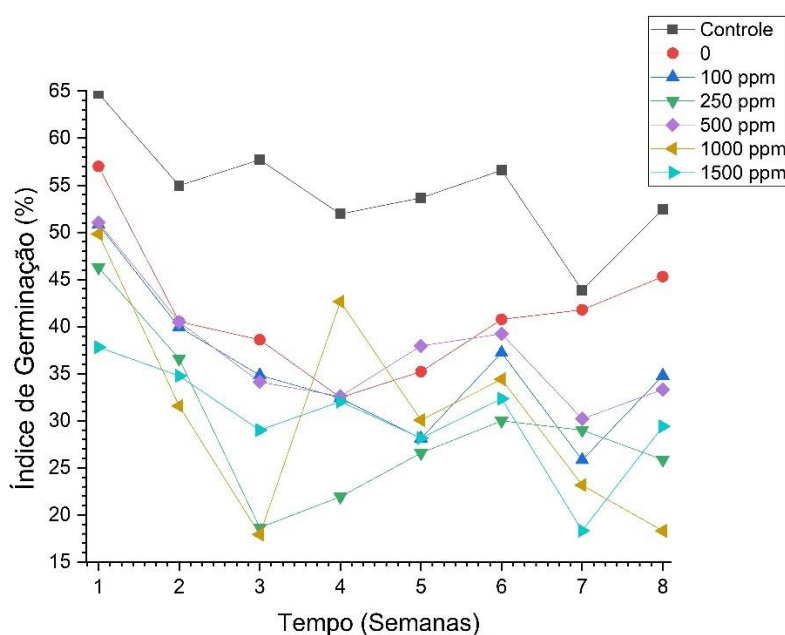
Os valores observados permitem concluir que o Herbicida Tebuthiuron foi um dos fatores que afetou a velocidade de germinação das sementes, apesar de não ser o único fator, visto que a coluna controle 0 também apresentou um Índice de Germinação (%) menor do que o observado no controle semanal realizado com água filtrada, o que indica que os micro-organismos e seus metabólitos e outros compostos químicos presentes na água também são fatores que podem estar ligados a redução da velocidade de germinação.

Tabela 12. Tabela contendo os testes estatísticos de Índice de Germinação (%)

Resultados		Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
H =	23.8199	Postos médios 1 e 2	19.375	2.7679	2.935	ns
Graus de liberdade =	5	Postos médios 1 e 3	28.9375	4.1339	2.935	< 0.05
(p) Kruskal-Wallis =	0.0002	Postos médios 1 e 4	15.625	2.2321	2.935	ns
R 1 =	352	Postos médios 1 e 5	26.125	3.7321	2.935	< 0.05
R 2 =	197	Postos médios 1 e 6	26.9375	3.8482	2.935	< 0.05
R 3 =	120.5	Postos médios 2 e 3	9.5625	1.3661	2.935	ns
R 4 =	227	Postos médios 2 e 4	3.75	0.5357	2.935	ns
R 5 =	143	Postos médios 2 e 5	6.75	0.9643	2.935	ns
R 6 =	136.5	Postos médios 2 e 6	7.5625	1.0804	2.935	ns
R 1 (posto médio) =	44	Postos médios 3 e 4	13.3125	1.9018	2.935	ns
R 2 (posto médio) =	24.625	Postos médios 3 e 5	2.8125	0.4018	2.935	ns
R 3 (posto médio) =	15.0625	Postos médios 3 e 6	2	0.2857	2.935	ns
R 4 (posto médio) =	28.375	Postos médios 4 e 5	10.5	1.5	2.935	ns
R 5 (posto médio) =	17.875	Postos médios 4 e 6	11.3125	1.6161	2.935	ns
R 6 (posto médio) =	17.0625	Postos médios 5 e 6	0.8125	0.1161	2.935	ns

Fonte: Autor, 2021.

Figura 28. Gráfico contendo os resultados de Índice de Germinação (%) em função do tempo



Fonte: Autor, 2021.

4.5 Análise de pH

Foi possível observar na semana 1 que a presença do herbicida esteve relacionada a um menor pH conforme o aumento na sua concentração, sendo 8,32 na coluna controle (0) e diminuindo até 7,76 na coluna com 1500 ppm de Tebuthiuron, sendo um efeito que pode estar correlacionado ao Herbicida devido ao seu pH ser naturalmente mais ácido que o da água (Tabela 13), visto que todas as colunas foram montadas com as mesmas quantidades de nutrientes e água coletada no mesmo dia e local e a única diferença entre estas foi a concentração do herbicida colocada, ou pode se tratar apenas de uma correlação espúria.

Tabela 13: Resultados variação de pH em função do tempo.

Variação de pH em função do tempo						
Tempo (semanas)	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	8,32	8	7,96	7,9	7,82	7,76
2	8,05	8,03	8,03	7,97	7,92	7,95
3	7,81	7,66	7,64	7,74	7,91	8,01
4	8,03	7,69	7,86	7,96	8,05	8,2
5	8,02	7,72	8,12	8,05	7,83	8,09
6	8,35	8,6	8,28	7,63	7,88	8,18
7	8,49	8,61	8,33	7,31	7,91	7,97
8	7,55	7,75	7,75	7,31	7,77	7,8

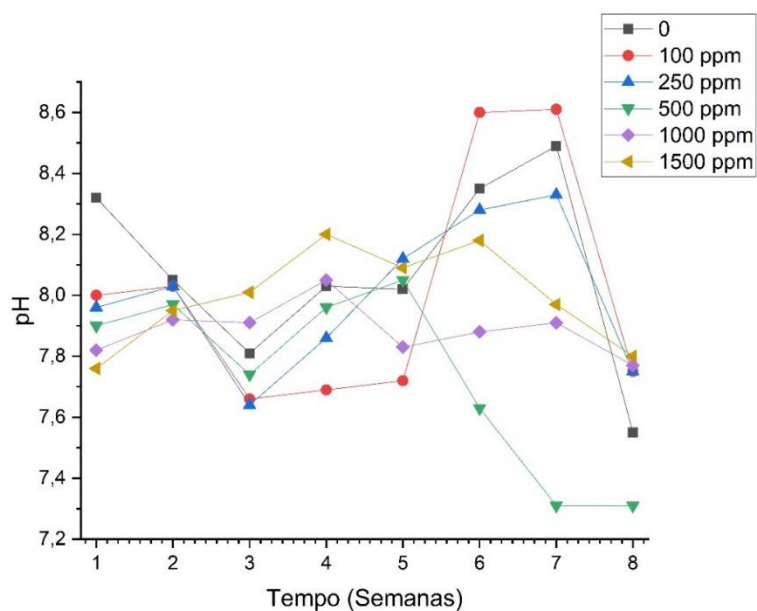
Fonte: Autor, 2021.

Apesar desta diminuição no primeiro dia de experimento, a partir da segunda semana os pHs apresentaram valores muito próximos de 8 para todas as colunas. Ao longo do experimento as colunas apresentaram um pH mais neutro oscilando com valores entre 7,6 a 8,2 até a semana 5. Na semana 6 foi possível observar um aumento dos pHs das colunas 0, 100 ppm, 250 ppm e 1500 ppm atingindo seus picos em valores mais alcalinos, sendo estes 8,35; 8,6; 8,28 e 8,18 respectivamente seguidos de quedas nas semanas 7 e 8 de experimento. A coluna 0 finalizou o experimento com o pH mais baixo, sendo este no valor de 7,55 (Figura 29).

Provavelmente as alterações no pH a partir da segunda semana de experimento se devem ao aumento da atividade microbiana na biodegradação da matéria orgânica e as próprias relações alimentares entre estes micro-organismos, visto que

o Tebuthiuron influenciou no valor de pH apenas na primeira semana, logo após a montagem das colunas no primeiro dia de experimento.

Figura 29. Gráfico contendo os resultados da variação de pH em função do tempo



Fonte: Autor, 2021.

4.6 Análise de condutividade elétrica

Foi possível observar um padrão que se repetiu para o controle e os tratamentos, no qual a condutividade elétrica cresceu até a 4ª semana e se estabilizou nas seguintes (Tabela 14).

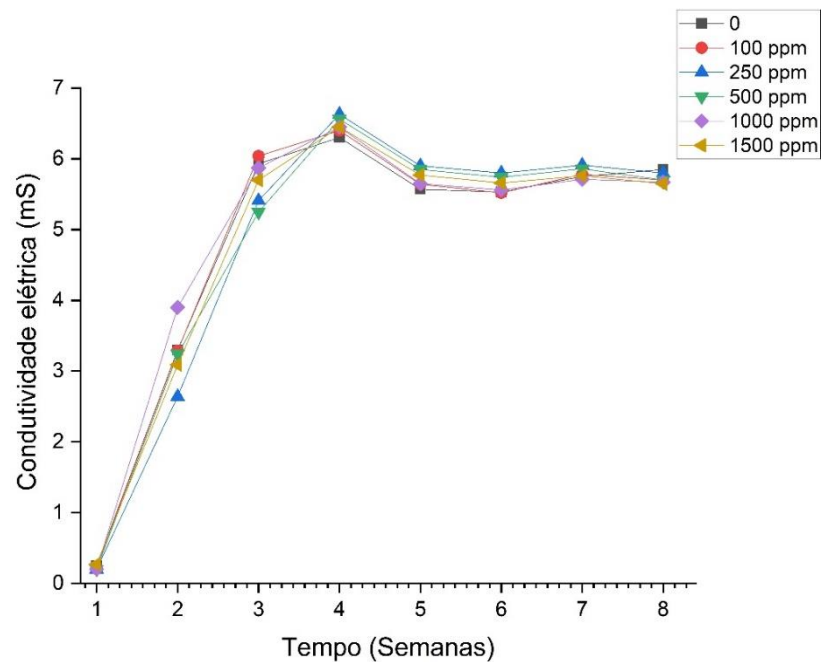
Tabela 14: Resultados variação de condutividade elétrica em função do tempo.

Variação de condutividade em função do tempo (mS)						
Tempo (semanas)	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	0,25	0,23	0,2	0,2	0,2	0,27
2	3,3	3,29	2,64	3,24	3,9	3,09
3	5,93	6,04	5,41	5,25	5,87	5,7
4	6,3	6,4	6,63	6,56	6,45	6,45
5	5,57	5,64	5,9	5,85	5,65	5,77
6	5,53	5,52	5,8	5,74	5,56	5,66
7	5,75	5,78	5,91	5,86	5,71	5,76
8	5,85	5,7	5,8	5,7	5,67	5,65

Fonte: Autor, 2021.

Após a montagem das colunas na semana 1, seu valor esteve entre 0,2 mS e 0,3 mS para todas as colunas, indicando a baixa condutividade elétrica inicial. Após uma semana todas as colunas apresentaram um aumento considerável na condutividade elétrica, sendo o valor mais baixo 2,64 mS para a coluna 250 ppm e o mais alto 3,9 mS para a coluna 1000 ppm, com as outras colunas apresentando valores entre 3 mS e 3,3 mS. Os valores de condutividade praticamente dobraram na semana 3 em relação ao valor da semana 2 e atingiram seu pico na semana 4 de experimento, na qual todas as colunas apresentaram valores de condutividade acima de 6,2 mS, com destaque para a coluna 250 ppm que obteve o valor mais elevado, 6,63 mS. Foi possível constatar uma leve queda na semana 5, seguida de estabilização do valor nas semanas seguintes até o final do experimento, no qual o valor das colunas ficou entre 5,65 mS e 5,85 mS (Figura 30).

Figura 30. Gráfico contendo os resultados da variação de condutividade em função do tempo



Fonte: Autor, 2021.

Visto que a condutividade elétrica corresponde a uma alta quantidade de elétrons livres no meio, podemos inferir que seu aumento correspondeu principalmente a dissociação química de íons na água, podendo ter uma leve influência da atividade metabólica dos micro-organismos ou ter sido puramente química. É possível que a estabilização na condutividade esteja relacionada a estabilização da comunidade microbiana visto que esta tende a ocorrer após 4 semanas na coluna de Winogradsky (SOUSA et al., 2012). Não foi possível relacionar o aumento na concentração do Herbicida Tebuthiuron nos tratamentos com o aumento na condutividade, pois este não influenciou ou alterou a condutividade nas colunas, visto que o padrão se repetiu na coluna controle e nos diferentes tratamentos.

4.7 Bactérias heterotróficas

Com exceção da coluna 250 ppm, foi possível observar nas colunas o padrão de crescimento microbiano que contém as fases de crescimento exponencial, estabilização e queda, as quais ocorreram em diferentes momentos para cada coluna ao longo do experimento. A coluna controle (0) apresentou dois momentos de crescimento exponencial ao longo do experimento, com a primeira queda ocorrendo na semana 4, seguida de novo crescimento nas semanas 5 e 6, momento que ocorreu o pico, seguido pela segunda queda nas semanas 7 e 8, apresentando uma quantidade ao final do experimento de 466.000 UFCs/mL, superior aos tratamentos com exceção do 250 ppm (Tabela 15).

Tabela 15: Resultados da quantidade de UFCs/mL em função do tempo.

Variação de Ufcs/mL em função do Tempo						
Tempo (semanas)	0	100 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm
1	304.000	127.000	73.000	169.000	65.000	47.000
2	804.000	453.000	240.000	207.000	286.000	170.000
3	846.000	774.000	448.000	279.000	400.000	292.000
4	481.000	757.000	808.000	385.000	429.000	584.000
5	672.000	1.080.000	689.000	414.000	799.000	641.000
6	994.000	671.000	715.000	398.000	717.000	320.000
7	577.000	380.000	765.000	631.000	217.000	290.000
8	466.000	235.000	778.000	363.000	277.000	315.000

Fonte: Autor, 2021.

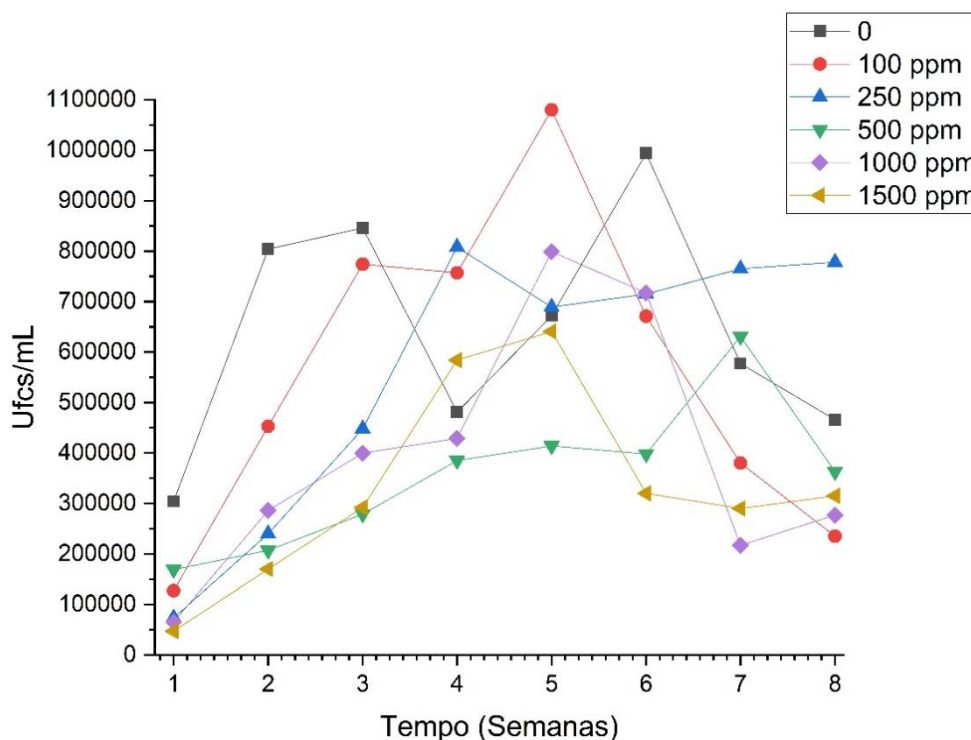
A coluna 100 ppm apresentou o maior pico de crescimento exponencial, com o valor de 1.080.000 UFCs/mL, ocorrido na semana 5, seguido de queda brusca na comunidade microbiana nas semanas seguintes, indicando uma possível competição por recursos devido ao crescimento ocorrido, finalizando o experimento com a quantidade de 235.000 UFCs/mL, a menor observada.

A coluna 250 ppm apresentou crescimento exponencial na comunidade de bactérias heterotróficas atingindo seu pico na semana 4 com 808.000 UFCs/mL, apresentando uma queda leve na semana 5 para 689.000 UFCs/mL, seguida por um período de estabilização ao longo do restante do experimento, no qual apresentou valores altos acima dos outros tratamentos, entre 715.000 a 778.000 UFCs/mL.

A coluna 500 ppm apresentou o ritmo mais lento de crescimento celular exponencial dentre os tratamentos, apresentando pico na semana 7 seguido de uma queda na semana 8. Este ritmo de crescimento mais lento pode apontar que os micro-organismos na coluna apresentaram dificuldade para formar consórcios microbianos e degradar o composto ou que houve competição intensa por recursos limitando o crescimento da comunidade microbiana.

É possível observar que as colunas 500 ppm, 1000 ppm e 1500 ppm apresentam um crescimento mais lento até a semana 4 quando comparados aos outros tratamentos e controle, apresentando menos de 600.000 UFCs/mL até o momento enquanto que já haviam sido observados os valores de 846.000 UFCs/mL na coluna controle e 774.000 UFCs/mL na coluna 100 ppm na semana 3 e 808.000 UFCs/mL na coluna 250 ppm na semana 4 (Figura 31).

Figura 31. Gráfico contendo os resultados da variação de UFCs/mL em função do tempo



Fonte: Autor, 2021.

Esses valores podem indicar uma fase lag adaptativa mais longa das comunidades microbianas mediante a presença do composto Tebuthiuron em maiores concentrações na água ou a metabólitos secundários derivados de sua biodegrada-

ção ou quimíodegradação, visto que as colunas 1000 ppm e 1500 ppm apresentaram seus picos na semana 5 do experimento atingindo 799.000 UFCs/mL e 641.000 UFCs/mL respectivamente, indicando o fim do processo de adaptação ao composto, momento em que pode passar a ser utilizado como fonte de carbono para o crescimento populacional dos consórcios microbianos selecionados. A queda populacional nos tratamentos 1000 ppm e 1500 ppm nas semanas 6, 7 e 8 pode indicar que os metabólitos secundários da biodegradação do Tebuthiuron pelos consórcios microbianos selecionados ao longo do experimento foram tóxicos para o restante da comunidade microbiana heterotrófica, visto que apresentaram uma estabilização na quantidade de UFCs/mL entre 217.000 a 320.000.

5. CONCLUSÃO

O Tebuthiuron apresenta como mecanismo de ação a inibição do Fotossistema II impedindo a fotossíntese em um amplo espectro de espécies de plantas, ocasionando necrose foliar e morte. O herbicida mesmo em baixas concentrações apresentou toxicidade na fase inicial germinativa e durante a Elongação Radicular obtidos nos resultados desse estudo. A contaminação em decorrência de lixiviação gera prejuízos eventuais para ecossistemas costeiros ou plantações que utilizem água de rios ou lagos contaminados com Tebuthiuron, podendo ser acentuados os prejuízos para locais que utilizem a pulverização aérea graças aos efeitos de deriva, visto que a cana de açúcar corresponde a 60% das pulverizações aéreas com agrotóxicos no Estado de SP (BOMBARDI, 2017). Não foi possível constatar prejuízo para o fitoplâncton em geral, mas segundo Peterson et al. (1994), alguns gêneros de algas são mais susceptíveis ao Tebuthiuron enquanto que outros são mais resistentes, podendo ter ocorrido uma seleção e crescimento de micro-organismos resistentes, reduzindo a biodiversidade e favorecendo o desequilíbrio no ecossistema, visto que algumas espécies de algas passam a secretar compostos tóxicos quando sua população aumenta, dentre estas o gênero de cianobactérias *Anabaena*, conhecido por secretar neurotoxinas, cuja espécie *inequalis* apresentou resistência ao Tebuthiuron no estudo de Peterson. A quantidade de Herbicida presente nas colunas afetou o pH apenas no início do experimento, e a condutividade aumentou ao longo das semanas conforme os micro-organismos se adaptaram ao seu meio. Os resultados nos estudos de DQO não apresentaram alterações relevantes, visto que o controle e os tratamentos com maiores concentrações do herbicida apresentaram valores próximos ao longo do experimento, indicando que o Tebuthiuron não foi o único responsável pela pouca alteração no valor da DQO ao longo do experimento. Por fim, foi possível constatar que o herbicida apresentou dificuldade em ser degradado nas concentrações de 500 ppm, 1000 ppm e 1500 ppm pelas bactérias heterotróficas até a 4ª semana do experimento, sinalizando que houve uma maior fase adaptativa da comunidade microbiana e que o Tebuthiuron possa ser prejudicial quando em quantidades superiores as estudadas, podendo se mostrar tóxico ou muito concentrado para uma biodegradação efetiva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. D.; PEREIRA, T. S. B.; BATLOUNI, S. R.; BOSCOLO, C. N. P.; ALMEIDA, E. A. D. Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 86-93, 2018.
- ANDRADE, J. D. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**. 22nd edn. American Public Health Association, Washington, DC, 2012.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE N. J.; CARVALHO A. F.; RAMOS A. M.; SILVA, C. A. S.; SILVA L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p.1940-1948, 2010.
- BABCSÁNYI, I.; MEITE, F.; IMFELD, G. Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 8, 2017.
- BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. FFLCH-USP, 2017.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. Cepea/Esalq-USP/CNA, 2020. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 20/03/2021
- CEMBRANELI, A. S.; FRIGO, E. P.; SAMPAIO, S. C.; MERCANTE, E.; REIS, R. R. D.; REMOR, M. B. Residue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in urban lake sediments. **Engenharia Agrícola**, v. 37, n. 6, p. 1254-1267, 2017.
- 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.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. & LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Dinâmica de herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar. **Piracicaba: BASF**, v 49, 2005..
- DAM, R. A.; CAMILLERI, C.; BAYLISS, P.; MARKICH, S. J. Ecological risk assessment of tebuthiuron following application on tropical Australian wetlands. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 10, n. 6, p. 1069-1097, 2004.
- DUAVI, W. C.; GAMA, A. F.; MORAIS, P. C.; OLIVEIRA, A. H.D.; NASCIMENTO, R. F.D.; CAVALCANTE, R. M. Contamination of aquatic environments by “Urban Pesticides”: The Case of Coco and Ceara Rivers, Fortaleza - Ceara, Brazil. **Quim. Nova**. 38(5):622-630, 2015;
- GRANER, C. A. F.; ZUCCARI, M. L.; PINHO, S. Z. D. Determinação da demanda química de oxigênio em águas por espectrofotometria simultânea dos íons crômio (III) e dicromato. **Eclética Química**, v. 23, p. 31-44, 1998.
- GOMES, M. A. F.; SPADOTTO, C. A.; LANCHOTTE, V. L. Ocorrência do herbicida tebuthiuron na água subterrânea da microbacia do Córrego Espreado, Ribeirão Preto-SP. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 11, 2001.
- HAIRSTON, R. V. The Winogradsky column & biofilms: models for teaching nutrient cycling & succession in an ecosystem. **The American Biology Teacher**, v. 61, n. 6, p. 453-459, 1999.

IBGE. A Geografia da cana-de-açúcar, Coordenação de Geografia. Rio de Janeiro, 2017. 172p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101436> Acesso em 15/03/2021

IBGE. Brasil: uma visão geográfica e ambiental no início do século XXI / Adma Hamam de Figueiredo, organizadora. - Rio de Janeiro: Coordenação de Geografia, 2016. 435p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=297884>. Acesso em: 15/03/2021

IBGE. Censo agropecuário 2017, Rio de Janeiro, v. 8, p.1-105, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=73096>. Acesso em 15/03/2021

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. D. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JEFFREY, S. T. & HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und physiologie der pflanzen**, v. 167, n. 2, p. 191-194, 1975.

KING, O.C.; SMITH, R.A.; MANN, R.M.; WARNE, M.St.J. Proposed aquatic ecosystem protection guideline values for pesticides commonly used in the Great Barrier Reef catchment area: Part 1–2, 4-D, Ametryn, Diuron, Glyphosate, Hexazinone, Imazapic, Imidacloprid, Isoxaflutole, Metolachlor, Metribuzin, Metsulfuron-methyl, Simazine and Tebuthiuron. 2017.

KUSSUMI, T. A.; LEMES, V. R. R.; NAKANO, V. E.; ROCHA, S. B.; KIMURA, I. D. A.; SILVA, I. C. D. Avaliação de hexaclorociclohexano em águas nas circunvizinhanças de um passivo ambiental. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 70, n. 3, p. 408-411, 2011.

LOPES, C. V. A. & ALBUQUERQUE, G. S. C. D. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. D. F. D.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.

MOHANAKRISHNA, G.; SRIKANTH, S.; PANT, D. Bioprocesses for waste and wastewater remediation for sustainable energy. In: **Bioremediation and Bioeconomy**. Elsevier, p. 537-565, 2016.

MONTEIRO, R. T. R. & DELLAMATRICE P. M. Toxicidade de Resíduos Têxteis Tratados por Microrganismos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p.63-66. 2006.

OLIVEIRA JR, R.S. Mecanismo de ação de herbicidas. **Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba: Ompipax**, p. 141-192, 2011.

OLIVEIRA, R. M. D.; BASTOS, L. H. P.; DIAS, A. E. X. D. O.; SILVA, S. A. D.; MOREIRA, J. C. Concentração residual de hexaclorociclohexano em área contaminada na Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil, após tratamento com óxido de cálcio. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 447-453, 2003.

PELAEZ, V. M.; DA SILVA, L. R.; GUIMARÃES, T. A.; DAL RI, F.; TEODOROVICZ, T. A (des) coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 14, p. 153-178, 2015.

PESSOA, M.; GOMES, M.; SOUZA, M. D.; CERDEIRA, A.; NICOLELLA, G.; MONTICELLI, A. Simulação do movimento de herbicidas utilizados no monocultivo de cana-de-açúcar em latossolos da área de recarga do Aquífero Botucatu (Guarani) em Ribeirão Preto, SP. **Embrapa Meio Ambiente- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 1999.

PETERSON, H. G.; BOUTIN, C.; MARTIN, P. A.; FREEMARK, K. E.; RUECKER, N. J.; MOODY, M. J. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. **Aquatic toxicology**, 28(3-4), 275-292, 1994.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; CECON, P. R.; PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 711-717, 2005.

ROBB, J. & MOYER, E. Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets. **Contam. Soil Sed. Water, Spring**, p. 67-71, 2001.

SILVA JUNIOR, A. C. D.; GONÇALVES, C. G.; QUEIROZ, J. R. G.; MARTINS, D. Evaluation of leaching potential of tebuthiuron using bioindicator plants. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

SOBRERO, M. C. & RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. p. 55-67. IN: ROMERO, P. R. & CANTÚ, A. M. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. **Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología**, México, D.F., 2008.

SOUSA, M.L.; MORAES, P.B.; LOPES, P.R.M; MONTAGNOLLI, R.N.; ANGELIS, D.F.; BIDOIA, E.D. Textile dye treated photoelectrolytically and monitored by Winogradsky columns. **Environmental Engineering Science**, New Rochelle, v. 29, p. 180-185, 2012.

TEIXEIRA, J. C. Modernização da agricultura no Brasil: impactos econômicos, sociais e ambientais. **Revista Eletrônica da Associação dos Geógrafos Brasileiros Seção Três Lagoas**, p. 21-42, 2005.

TEMPLE, A. J.; MURPHY, B. R.; CHESLAK, E. F. Effects of tebuthiuron on aquatic productivity. **Hydrobiologia**, v. 224, n. 2, p. 117-127, 1991.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE (2021). The Pesticide Properties Data Base (PPDB). Developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, 2006–2021. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/614.htm#none>. Acesso em 05/04/2021.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu-SP. **Eclética Química**, v. 22, p. 49-66, 1997.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda. **Pesquisa FAPESP, São Paulo, ano**, v. 19, 2018.