

**Estudo do efeito de agrotóxico
sobre microalgas isoladas nas águas
dos rios do médio Vale do Itajaí:
I - *Chlorella* sp.**

**Vanda A. D'Aquino Rosa¹
Gabriela Brasil²**

¹ Departamento de Biologia. Centro de Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Santa Catarina.

² Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas -
Universidade Federal de Santa Catarina

Resumo

O médio vale do Rio Itajaí é uma importante região agrícola do Estado de Santa Catarina, produzindo principalmente arroz, milho e banana. Nessas plantações são usados diversos tipos de agrotóxicos, e entre eles o Round-up, com finalidade de aumentar a produtividade agrícola e diminuir a competição provocada pelas ervas daninhas que crescem no meio das culturas. O Round-up ($C_3H_8NO_3P$) é também conhecido pelos nomes de N-fosfometil-glicina ou sal isopropilamínico ou glifosato, e é usado como herbicida. Produz irritação na pele, nos olhos e nas mucosas do homem, quando em contato. A dose letal oral para 50% de uma amostra de ratos é de 4.320 mg/kg e a cutânea para coelhos é de 7.940 mg/kg. A análise da flora de microalgas nas águas dos rios estudados, mostrou-se empobrecida em alguns pontos, e em outros, contendo microalgas indicadoras de poluição por substâncias tóxicas. Os organismos aquáticos podem adquirir, acumular e transferir esses poluentes para os níveis tróficos superiores. A extensão dessa transferência depende da capacidade da microalga em tolerar altas concentrações dessas substâncias. O pH do meio, poderá influenciar ou não a toxicidade do herbicida em questão. Foi isolada a clorófitica *Chlorella* sp. dos rios que receberam o

herbicida (via escoamento superficial) e as culturas puras incubadas a diferentes valores de pH e de concentrações de Round-up. A concentração referência foi considerada aquela citada pelo fabricante.

As culturas puras que cresceram nos valores de pH 6,8 e 10,0, demonstraram um mesmo padrão de crescimento, quando em presença de diferentes concentrações de Round-up e tiveram os valores de pH modificados ambos para 7,0 e as culturas que cresceram a pH 4,0 apresentaram um crescimento bem menor quando comparados com os dois primeiros.

UNITERMOS: *Chlorella* sp., Round-up, agrotóxicos, ecotoxicologia.

Summary

The middle valley of the "Rio Itajaí" is an important agricultural region in Santa Catarina state, producing mainly rice, corn and bananas. In these farming areas several different kinds of agrottoxics are used (among them "Round-up") in order to increase productivity and decrease the competition of weeds that grow among the crops. Round-up ($C_3H_8NO_3P$) is too know by N-phosphonomethyl-glycine or isopropylaminic salt or glyphosate, and is used as herbicide. Round-up causes irritation in the skin, eyes and mucuous membrane of those who use it. A lethal oral dose for 50% of the sampling of rats is 4,320 mg/kg and a cutaneous dose for rabbits is 7,940 mg/kg. The analysis of the microalgae flora in the waters under investigation, showed very little microalgae in some places, and in others an indication of microalgae pollution by toxic substances. Aquatic organisms can acquire, accumulate and transfer these pollutants to higher trophic levels. The extent of this transfer depends on the microalgae's capacity to tolerate high concentrations of these substances. The pH in the environment may or may not influence the toxicity of the herbicide in question. Chloroficean *Chlorella* sp. was isolated from the rivers that received the herbicide (through surface draining), as well as pure incubated cultures at differnt pH values and different concentration of Round-up. The concentration reference was considered to be the one in the manufacture's instructions. The pure cultures which grew at pH values of 6.8 and 10.0, show the same growth pattern, in different

V. A. D'Aquino Rosa e G. Brasil

concentrations of Round-up. The pH values for both changed to 7.0, and the cultures that grew at 4.0 initial pH, showed a much lower growth rate, compared with the first two.

Key words: *Chlorella* sp, Round-up, agrotoxic, ecotoxicology.

Introdução

A sub-bacia IV (Fig.1), da região do médio Vale do Itajaí, é constituída pelos rios Cedro e Benedito, que juntos são afluentes do Rio Itajaí. Constitui-se numa região agrícola importante, contendo pequenos produtores de arroz, milho e banana. Nessas plantações, são usados diversos tipos de agrotóxicos conhecidos pelos nomes comerciais de Surcupur, Gramoxone, Round-up, entre outros (Assessoria Técnica de Meio Ambiente, Prefeitura Municipal de Timbó, comunicação pessoal), com a finalidade de aumentar a produtividade agrícola, e diminuir a competição provocada pelas ervas daninhas que crescem no meio das culturas. Os defensivos agrícolas deixam resíduos onde quer que sejam empregados às vezes inalterados (em sua forma química original), outras vezes sob a forma de produtos degradados - ANDEF, 1984.

O Round-up, por exemplo, produz irritação na pele, nos olhos e nas mucosas do homem, ao simples contato. A dose letal oral para 50% de uma amostra de ratos é de 4.320 mg/kg e a cutânea para coelhos é de 7.940 mg/kg (Hayes & Laws, 1991; Hutson & Roberts, 1987).

O solo e as águas superficiais nas imediações, sofrem a influência da contaminação devido a esses elementos poluentes. Embora não se tenha conhecimento da análise química deste solo, sabe-se da dissipação dos poluentes através do vento, da chuva, perdidos para os ecossistemas aquáticos (Barnett et al., 1967; in Tubea et al., 1981) ou adsorvidos ao húmus do solo e da água (Stevenson, 1972). A análise química da água realizada pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas da FURB, em pontos por nós coletados anteriormente, revela a presença de elementos como zinco, cianeto e grandes quantidades de óleos e graxas, sendo que os valores do pH, oscilam entre 6,0 e 7,0 exceto em um ponto. Tubea et al. (1981), sugerem que o pH do meio natural ou da solução nutritiva, poderá influenciar sobre a toxicidade ou não do herbicida em questão.

A análise da flora de microalgas nas águas dos dois rios, mostrou-se empobrecida em alguns pontos, e em outros, contendo microalgas indicadoras de poluição por substâncias tóxicas (Branco, 1978).

Estes fatos por si só, já são motivos de preocupação por parte da comunidade local, principalmente porque sabe-se do alto grau tóxico desses elementos a todos os organismos vivos. Um exemplo da irradiação de tais elementos é o fato da água utilizada para abastecimento das cidades da região, ser a mesma que passa pelas plantações de arroz, onde são utilizados no mínimo, três tipos de substâncias químicas, em diferentes parte da planta (raiz, caule e grãos).

Sabe-se que a presença de organismos vivos, necessariamente indica tolerância à essas condições de poluição.

Com relação às plantas superiores, tem sido demonstrada a presença de ecotipos resistentes à elementos poluentes (Grill et al., 1988). Semelhantemente com relação às microalgas, tem sido desenvolvidos trabalhos, a respeito de linhagens resistentes (Stokes et al., 1973; Lewis, 1990; Tubea et al., 1981; Monsanto Europe S.A., 1989). Wrigth, 1972 (in Tubea et al., 1981) encontrou, usando *Chlorella pyrenoidosa*, inibição de 90% de seu crescimento a 1,0 ppm de Barban e inibição de 50% de seu crescimento a 25,0 ppm de M & D 8882. Também tem se encontrado estimulação do crescimento de microalgas com difenamida (Loeppky e Tweedy, 1969, in Tubea et al., 1981). Lewis (1990) cita estimulação do crescimento de microalgas com surfactantes, os quais são utilizados na fabricação de herbicidas.

Os organismos aquáticos podem adquirir e acumular poluentes, pois as microalgas que formam a base da cadeia alimentar, são potencialmente capazes de transferir essas substâncias à níveis tróficos superiores, no momento em que servem de alimento. A extensão dessa transferência, depende da capacidade da microalga em acumular e tolerar altas concentrações dessas substâncias (Hart & Scaife, 1977).

O objetivo desse estudo será verificar a tolerância ou a interação herbicida/microalga, para se conhecer a atividade do herbicida em microalgas isoladas das águas dos rios em estudo.

Metodologia

Foram considerados dois rios para estudo, Rio dos Cedros e Rio Benedito e tomadas amostras em 4 pontos ao longo de seus percursos conforme Figura 1. As características químicas das águas nos pontos de coleta se encontram em anexo (Tab. 1).

TABELA 1 - Análise química das águas superficiais dos rios Cedros e Benedito realizada em setembro/1990 pelos autores (apenas valores de pH) e em maio/1991 pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Fundação Universidade Regional de Blumenau.

	Rib. tirolezes M/91 - S/90		Rio Cedros (Cedro Alto) S/90 Estação 1	Centro Timbó R.Cedros M/91 - S/90 Estação 2	R. Benedito Casan M/91 - S/90 Estação 3	Centro Timbó Praias Schroe-der M/91	Distr. Ind. M/90 Estação 4
pH	6.8	6.56	6.64	9.3	6.8 6.49	7.3	6.9 6.66
Cianeto mg/l	0.06	-	-	0.04	0.04	0.1	0.08
DBO mg/l	5.20	-	-	2.80	11.4	9.6	5.10
DQO mg/l	20.00	-	-	16.00	40.0	40.0	24.0
P total mg/l	0.10	-	-	0.49	Ausente	0.19	Ausente
Namoniacal	1.00	-	-	Ausente	Ausente	0.67	0.90
M org. mg/l	2.60	-	-	2.50	Ausente	-	2.70
N total mg/l	3.60	-	-	2.50	Ausente	-	3.60
Óleos e	175.7	-	-	15.9	31.4	159.0	63.6
Graxas	0.28	-	-	0.6	0.48	0.50	1.1
Zn mg/l	205.0	-	-	211.0	170.0	299.0	167.0
Resíd. total							

As amostras de água, para o isolamento das microalgas foram tomadas em setembro de 1990 e foram obtidas diatomáceas e clorofíceas após filtração em uma rede de plâncton de 25 μm . Das espécies isoladas em meio de cultura líquido e sólido, foi utilizada neste estudo, a clorofícea *Chlorella* (Beijerinck), comum nos dois rios.

Para isolamento da microalga foram usadas algumas gotas da amostra concentrada na rede de plâncton, e espalhadas sobre uma placa de ágar

com meio Bolds Basal Medium (BBM, Stokes et al., 1973). As placas foram incubadas sob iluminação contínua e as colônias que cresceram, foram examinadas ao microscópio e removidas através de um estilete para o meio líquido, sendo o procedimento repetido, até se obter culturas puras e livres de bactérias. A microalga foi cultivada até alcançar a fase de crescimento logarítmico.

Inicialmente foi realizado um pré-teste para verificação das concentrações letal, tóxica e ótima do herbicida Round-up a pH 6,8, que foi adicionado às concentrações de 24,0 - 384,0 e 768,0 mg/l.

A concentração de 24,0 mg/l de Round-up inibiu o crescimento da microalga em 65%, e portanto foram estabelecidos valores intermediários para as concentrações do experimento - teste propriamente dito.

A solução do herbicida Round-up foi preparada por diluição em água destilada e autoclavada, e foram adicionadas às concentrações de 12,0; 24,0; 48,0; 96,0 e 192,0 mg/l de meio de cultura.

Três valores de pH foram escolhidos como variáveis, sendo dois deles ocorridos durante as medições na águas naturais dos rios (Tab. 1). Esses valores de pH foram obtidos adicionando-se HCl ou NaOH à solução do meio BBM.

Os experimentos testes foram feitos em balões de fundo chato de 125,0 ml de capacidade contendo 50 ml de meio, arrolhados com algodão e agitados por um tubo de vidro aerando no fundo, sob iluminação contínua (fluorescente). A temperatura foi mantida entre 20° e 22°C.

A taxa de crescimento foi determinada por meio de contagem do número de células em câmara de Neubauer no momento da coleta, a cada 48 h. Foi tirada a média dos resultados das 3 réplicas para todos os tratamentos e os valores ajustados. A taxa de inibição do crescimento para cada concentração a diferentes valores de pH foi calculada tomando-se como referência o tratamento padrão.

Resultados e discussão

Os dados obtidos pela Monsanto Europe S.A., 1989 usando a clorofíceia *Ankistrodesmus bibrainus* B 6181, foram de 45 mg de Round-up/l de meio para inibição do crescimento menor que 10% e de 485 mg de

Round-up/l para inibição de 50%. Com a finalidade de comparar esses resultados (Tab. 2), para outra espécie de clorofícea, realizamos um pré-teste com *Chlorella* sp (Beijerinck) e obtivemos para a concentração de 24,0 mg de Round-up/l, uma inibição de 92% e para 768 mg de Round-up/l não foi observado crescimento.

TABELA 2 - Resultados obtidos para a inibição do crescimento, em experimentos realizados pela MONSANTO EUROPE S.A. (*) para *Ankistrodesmus bibravianus* e pelos autores em *Chlorella* sp. em pH 6.8, a diferentes concentrações de Round-up.

Concentração de Round-up mg/l	% de inibição do crescimento
45*	< 10
485*	50
24	65
384	92
768	não houve crescimento.

As concentrações de Round-up utilizadas nos experimentos onde variaram os valores de pH, foram determinadas a partir dos resultados do pré-teste e se encontram nas Tabelas 3, 4 e 5.

TABELA 3 - Diferentes concentrações do herbicida Round-up, em meio BBM, porcentagem de inibição do crescimento e pH final do meio de cultura em *Chlorella* sp. sob pH inicial 6.8.

Concentração de Round-up mg/l	% de inibição do crescimento	pH final do meio
12,0	56,80	7,0
24,0	75,00	7,0
48,0	87,50	7,0
96,0	94,42	7,0
192,0	93,62	7,0

TABELA 4 - Diferentes concentrações do herbicida Round-up, em meio BBM, porcentagem de inibição do crescimento e pH final do meio de cultura; em *Chlorella* sp. sob pH inicial 10.0.

Concentração de Round-up mg/l	% de inibição do crescimento	pH final do meio
12,0	57,68	7,7
24,0	75,25	7,7
48,0	89,00	7,7
96,0	94,55	7,7
192,0	95,34	7,7

TABELA 5 - Diferentes concentrações do herbicida Round-up, em meio BBM, porcentagem de inibição do crescimento e pH final do meio de cultura; em *Chlorella* sp. sob pH inicial 4.0.

Concentração de Round-up mg/l	% de inibição do crescimento	pH final do meio
12,0	20,66	6,95
24,0	61,70	6,88
48,0	79,00	6,54
96,0	77,00	5,24
192,0	94,61	4,94

É imprescindível a presença de um agente quelante do meio de cultura artificial, e frequentemente é utilizado o EDTA (STOKES et al., 1973). Em nosso estudo, tentamos cultivar a microalga sem EDTA no meio de cultura, com o objetivo de eliminar sua ação quelante sobre o herbicida, pois sabemos que no solo, o Round-up se adsorve fortemente às partículas coloidais do mesmo, perdendo sua atividade (Hertwig, 1983). Mas não foi observado crescimento algum da microalga em sua ausência.

Verificando os resultados da Tabela 3 e sua respectiva curva de crescimento (Fig. 2), podemos observar que o desenvolvimento da microalga foi inibido à diferentes concentrações do herbicida, comparado com o crescimento padrão. Parece que houve um período prolongado da fase de adaptação às concentrações de 12,0 e 24,0 mg de Round-up/l para então iniciar a fase logarítmica de crescimento. As percentagens de inibição de crescimento foram as seguintes: para 12,0 mg de Round-up/l: 56,8% e para 24,0 mg de Round-up/l: 75%. A porcentagem de inibição do crescimento para 48,0 mg/l foi 87,5%, e para as concentrações de 96,0 e 192,0 mg/l foram 94,42% e 93,62% respectivamente; sendo observado um crescimento muito reduzido durante o período de incubação de 21 dias.

No final do teste com pH inicial de 6,8 foi observado o valor médio de pH igual a 7,0.

Verificando os resultados da Tabela 4 e sua respectiva curva de crescimento (Fig. 3), pode-se observar que o herbicida agiu da mesma forma sobre o crescimento da microalga, independente do valor de pH inicialmente aplicado ao meio, ou seja, houve um prolongamento da fase de adaptação (log) em relação ao crescimento padrão, e o pH final médio do meio que se iniciou com o valor 10,0; foi para 7,7.

As porcentagens de inibição do crescimento para a microalga a pH 10,0 foram respectivamente para 12,0 mg/l - 57,68%; para 24,0 mg/l - 72,25% e para 48 mg/l - 89%. Para as concentrações de 96,0 e 192,0 mg/l as porcentagens de inibição do crescimento foram respectivamente 94,55% e 95,35%, resultando num crescimento muito reduzido, durante o período de incubação.

Parece que o atraso no início da fase logarítmica de crescimento para os dois valores de pH se deve a uma reação do próprio herbicida, quando em meio aquoso, e provavelmente à alteração de sua estrutura molecular, já que Heath, 1958 (in Audus, 1976) cita alguns inseticidas organofosforados que são hidrolisados a pH 6,0. Lewis (1990) sugere que após contato com a água por alguns dias, o herbicida se degrada e cessa o seu efeito algicida sobre as microalgas.

Foi observado um comportamento muito semelhante nas curvas de crescimento, nas porcentagens de inibição e nos valores finais de pH dos

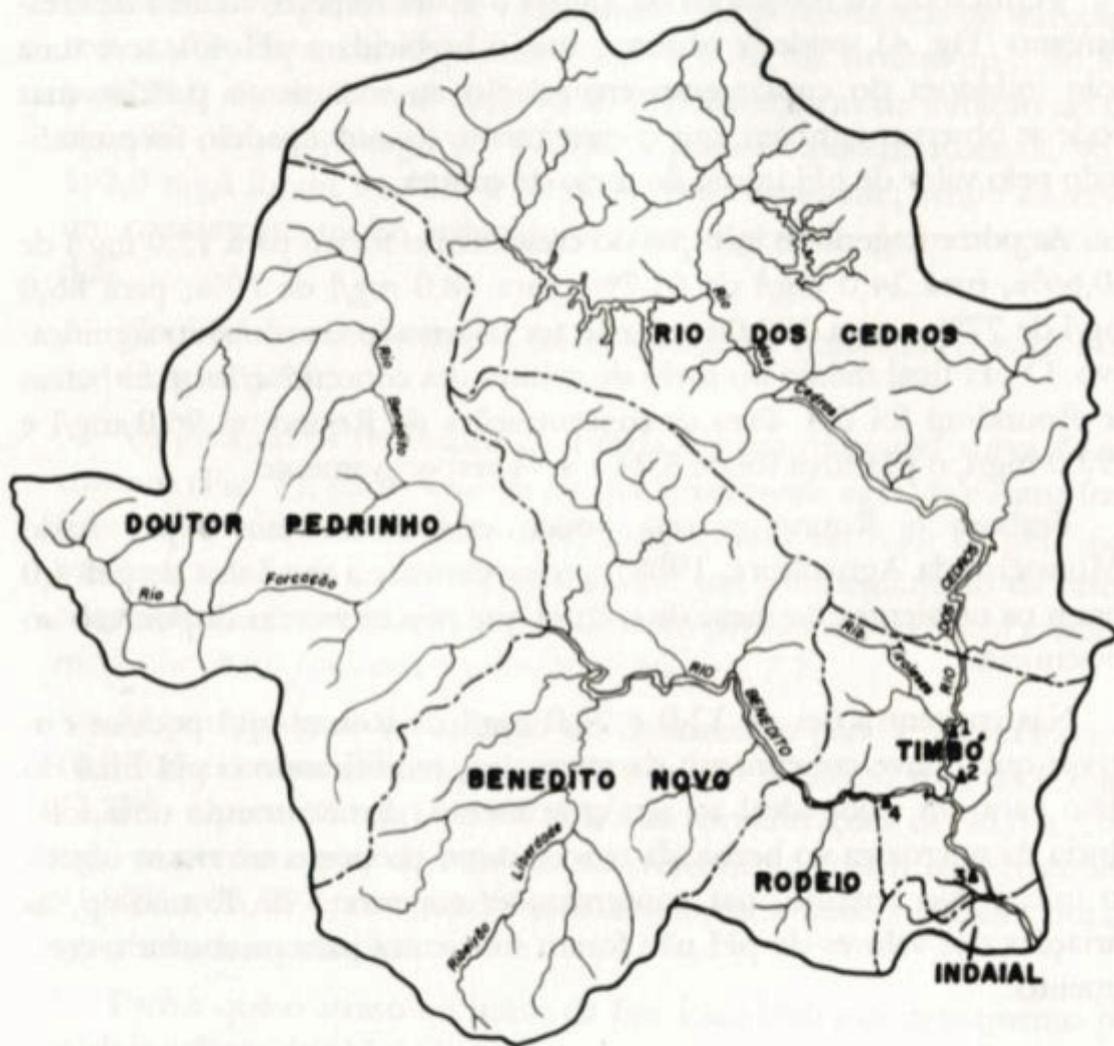
meios de cultura, quando a microalga cresceu em pH 6,8 e 10,0 fatos que nos fazem sugerir a ação da microalga de forma a modificar bioquimicamente o meio, tornando-o favorável ao seu crescimento (Toledo et al., 1982).

Verificando os resultados da Tabela 5 e sua respectiva curva de crescimento (Fig. 4), pode-se observar que o herbicida a pH 4,0, teve uma ação inibidora do crescimento em relação ao tratamento padrão, mas pode-se observar também, que o crescimento da curva padrão foi prejudicado pelo valor de pH inicial do meio de cultura.

As porcentagens de inibição do crescimento foram para 12,0 mg/l de 20,66%, para 24,0 mg/l de 61,7%; para 48,0 mg/l de 79%; para 86,0 mg/l de 77% e para 192,0 mg/l não foi observado crescimento significativo. O pH final médio do meio de cultura das concentrações mais baixas de Round-up foi 6,8. Para as concentrações de Round-up 96,0 mg/l e 192,0 mg/l, o pH final foi de 5,24 e 4,94 respectivamente.

Embora o Round-up seja pouco estável também a pH ácido (Ministério da Agricultura, 1988), provavelmente a um valor de pH 4,0 foram os nutrientes do meio de cultura que não estiveram disponíveis ao crescimento.

Nas concentrações de 12,0 e 24,0 mg/l de Round-up/l pode-se observar que houve crescimento da microalga, modificando o pH final do meio para um valor ideal ao seu crescimento, demonstrando uma tolerância da microalga ao herbicida usado, como proposto em nosso objetivo inicial. No entanto, nas concentrações superiores de Round-up, as variações dos valores do pH não foram suficientes para promover o crescimento.



CONVENÇÕES:

- Limite da Bacia
- - - Limite intermunicipal
- ▲ Ponto de amostragem

Escala Aproximada 1:280.000

Fig. 1 - BACIA DO RIO BENEDITO.

Estudo do efeito de agrotóxico

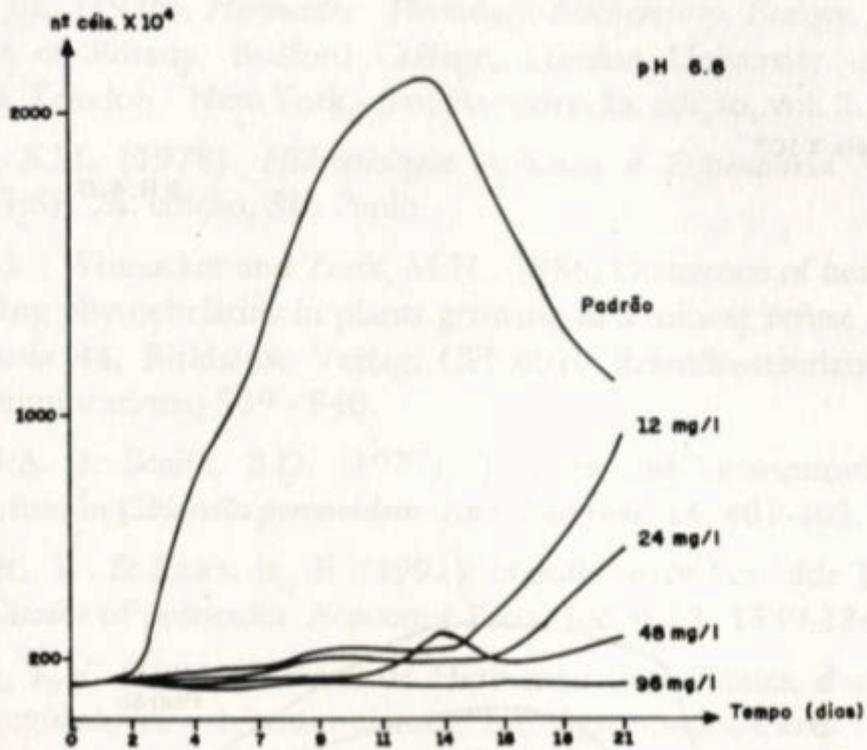


Fig. 2 - Curvas de crescimento de CHLORELLA sp. em presença de diferentes concentrações de herbicida Roundup, sob pH 6.8.

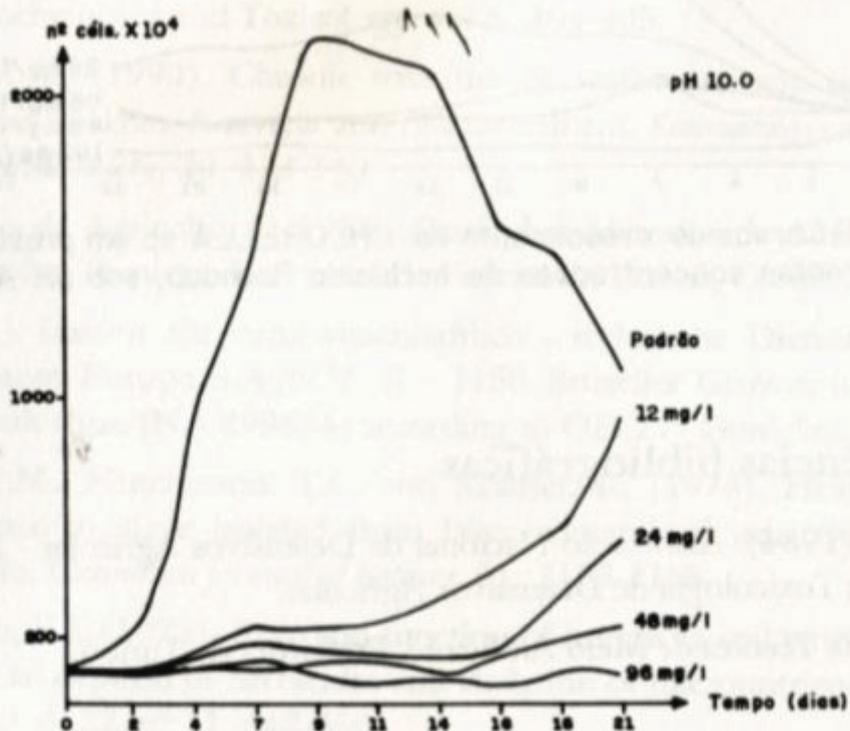


Fig. 3 - Curvas de crescimento de CHLORELLA sp. em presença de diferentes concentrações de herbicida Roundup, sob pH 10.0.

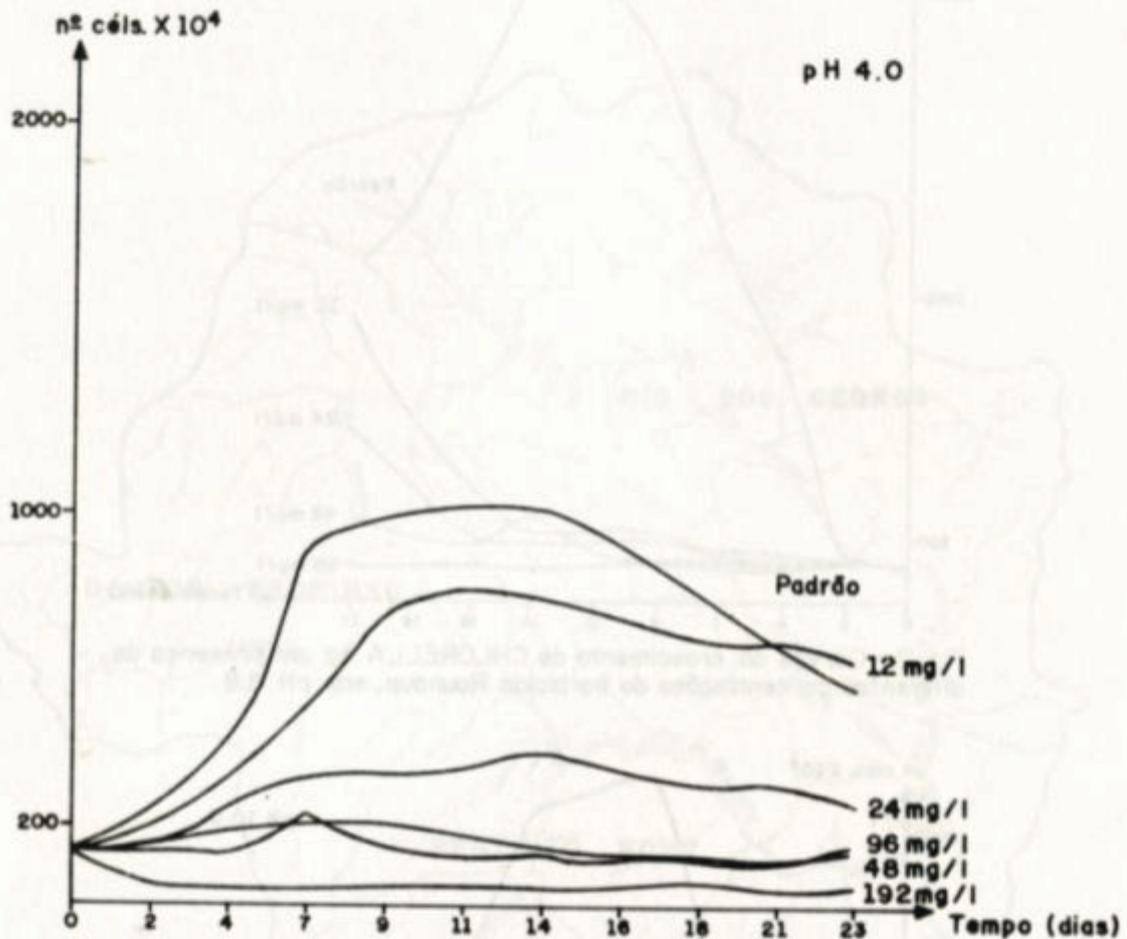


Fig. 4 - Curvas de crescimento de CHLORELLA sp. em presença de diferentes concentrações de herbicida Roundup, sob pH 4.0.

Referências bibliográficas

Andef - (1984). Associação Nacional da Defensivos Agrícolas - III Curso sobre Toxicologia de Defensivos Agrícolas.

Assessoria Técnica de Meio Ambiente, Prefeitura de Timbó.

- Audus, J.L. (1976). *Herbicides - Physiology, Biochemistry, Ecology*. Department of Botany, Bedford College, London University - Academic Press, London - New York - San Francisco 2a. edição, vol. 2.
- Branco, S.M. (1978). *Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária*. CETESB, 2a. edição, São Paulo.
- Grill, E.L.; Winnacker and Zenk, M.H., 1988. Occurrence of heavy metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44, Birkhauser Verlag, CH 4010 Basel/Switzerland (Short Communications) 539 - 540.
- Hart, B.A. & Scaife, B.D. (1977). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Env. Research*, 14: 401-403.
- Hayes, Jr., W. & Laws, Jr., E. (1991). Handbook of Pesticide Toxicology. Classes of pesticides. Academic Press, Inc. vol 3: 1339-1340.
- Hertwig, K.V. (1983). Manual de Herbicidas desfolhantes, dessecantes, fitorreguladores e bioestimulantes. Ed. Agronômica Ceres - SP, 2a. edição.
- Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (1987). Herbicides - Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology. vol 6: 304-305.
- Lewis, M.A., (1990). Chronic toxicities of surfactants and detergents builders to algae. A review and risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20, 123-140.
- Ministério da Agricultura. (1988). Pesticidas: Métodos de Análise e Informações Técnicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- NATEC - Institut für naturwissenschaftlich - technische Dienste GmbH Monsanto Europe S.A./N.V. B - 1150 Bruxelles Growth inhibition test with algae (NA 899654) according to OECD - Guideline. 1984.
- Stokes, P.M., Hutchinson, T.C. and Krauter, K. (1973). Heavy metal tolerance in algae isolated from lakes contaminated near Sudbury - Ontario. *Canadian journal of Botany*, 51: 2155-2168.
- Stevenson, F.J. (1972). Role and function of humus in soil with emphasis on adsorption of herbicides and chelation of micronutrientes. *Bioscience*, vol. 22, nº 11, 643-650.

V. A. D'Aquino Rosa e G. Brasil

Toledo, A.P.P.; D'Aquino, V.A. & Tundisi, J.G. (1982). Influence of humic acid on growth and tolerance to cupric ions in *Melosira italica* (Subsp. *subartica*) *Hidrobiologia*, 87: 247-254.

Tubea, B.; Hawxby, K.; Emehta, R. (1981). The effects of nutrients, pH e herbicide levels on algal Growth. *Hidrobiologia*, 79: 221-227.