



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 1 • p 113-126

Estudo *in situ* do efeito de herbicidas numa microalga

A utilização de pesticidas em agroecossistemas orizícolas constitui uma ameaça à biodiversidade que sustentam, afectando organismos não alvo que habitam os sistemas aquáticos circundantes. Assim sendo, o objectivo deste estudo consistiu em efectuar a avaliação *in situ*, numa escala temporal, do efeito da aplicação de herbicidas na qualidade de um agroecossistema localizado no vale do Mondego. Neste sentido, seleccionaram-se dois locais numa vala principal, a qual atravessa a montante (L1) uma zona protegida – Paul do Taipal – e a jusante (L2) é rodeada por campos agrícolas essencialmente destinados à produção de arroz. O estudo envolveu a realização de análises físico-químicas e de ensaios *in situ* com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (células imobilizadas em esferas de alginato). Deste modo, verificou-se que ocorreu uma diminuição geral da qualidade do sistema aquático, principalmente no local mais exposto (L2) à entrada de herbicidas aquando da sua aplicação. Este cenário foi corroborado pela quantificação de herbicidas em amostras de água recolhidas em L2 (na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$), mas também pela inibição significativa do crescimento de *P. subcapitata* com o início da aplicação de herbicidas. Muito embora seja difícil estabelecer relações causa-efeito, esta abordagem evidenciou que a ocorrência de concentrações elevadas de herbicidas nos sistemas aquáticos, ainda que ocasionalmente, pode influenciar o equilíbrio de populações naturais.

Palavras-chave

arrozais
herbicidas
ensaios *in situ*
Chlorophyta

Catarina R Marques^{1*}

Ruth Pereira¹

Sara C Antunes¹

Anabela Cachada²

Armando C Duarte²

Fernando Gonçalves²

¹CESAM e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

²CESAM e Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

*crmarques@ua.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais consumido a nível mundial (Nguyen, 2002), cuja produção requer uma elevada utilização de pesticidas, principalmente, de herbicidas (Comoretto et al., 2008; Kuster et al., 2008). Este facto compromete a elevada biodiversidade sustentada por áreas orizícolas, as quais, na Europa, estão frequentemente localizadas próximas de zonas protegidas (Tarazona e Sánchez, 2006).

Em particular, a contaminação das águas de superfície nas imediações de arrozais ocorre essencialmente por dispersão aérea de herbicidas aquando da sua pulverização e/ou por escorrências superficiais a partir do solo (Boxall et al., 2002; Dabrowski et al., 2005). Desta forma, organismos aquáticos não alvo podem sofrer exposições ocasionais agudas a concentrações elevadas de herbicidas o que conduz à necessidade de se avaliar efeitos associados a este tipo de cenários de contaminação intermitente (Boxall et al., 2002; Tucker e Burton, 1999). Neste sentido, a realização de estudos no campo fornece uma avaliação mais fiel dos riscos ambientais reais, subjacentes a cenários de contaminação, que flutuam numa escala temporal e espacial (Boxall et al., 2002; Chappie e Burton, 1997; Tucker e Burton, 1999).

Os ensaios *in situ*, envolvendo a exposição directa de organismos enclausurados em câmaras colocadas no campo, constituem uma ferramenta de avaliação com elevada relevância ecológica, já que os organismos respondem à acção conjunta de diferentes factores ambientais e de contaminação (Chappie e Burton, 1997; Tucker e Burton, 1999). Este tipo de ensaios já foi aplicado com sucesso por outros autores para avaliar o impacto provocado nos sistemas aquáticos devido ao uso de pesticidas (e.g., Domingues et al., 2008; Faria et al., 2007; Phillips et al., 2004; Schulz, 2003), nomeadamente em microalgas (e.g., Moreira-Santos, 2004a; 2004b; Twist et al., 1997).

Pseudokirchneriella subcapitata é uma microalga verde (Chlorophyta) (Figura 1) que tem sido largamente utilizada em estudos ecotoxicológicos, dado o seu posicionamento na base das cadeias tróficas e a sua sensibilidade a diferentes contaminantes (EC, 2002; Hanazato, 2001; Källqvist e Romstad, 1994). Assim, qualquer alteração no seu equilíbrio afectará a manutenção das populações naturais locais, bem como a transferência de energia ao longo das cadeias tróficas (Allen et al., 1995; Källqvist e Romstad, 1994).

O presente trabalho foi desenvolvido numa área essencialmente destinada à produção de arroz (Montemor-o-Velho, próximo de Coimbra) e teve como objectivo central a avaliação do impacto de herbicidas, aplicados nos campos agrícolas, na qualidade da água de uma vala que atravessa a montante uma zona húmida protegida. Neste contexto, as questões específicas a que pretendemos responder são as seguintes:

- (i) numa escala temporal, haverá variação de parâmetros físico-químicos e biológicos na água dos canais associada à contaminação intermitente por pesticidas?
- (ii) as variações na qualidade da água são coerentes com as respostas biológicas de algas verdes expostas *in situ*?

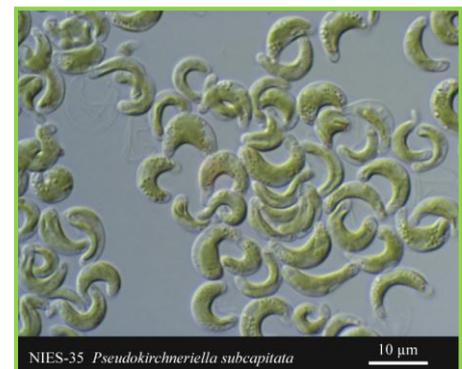


FIGURA 1: Imagem de células da microalga verde *P. subcapitata*. (<http://www.nies.go.jp/biology/mcc/images/100images/nies-0035.jpg>).

(iii) as respostas dos organismos de teste, nos ensaios *in situ* são diferentes das obtidas em laboratório?

(iv) *P. subcapitata* é sensível ao tipo de contaminação em estudo?



MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo, locais de amostragem e herbicidas aplicados

Os locais de estudo integram-se numa área utilizada intensivamente para a agricultura (15 000 ha), localizada no Vale do Baixo Mondego (centro de Portugal, próximo de Coimbra) (40° 2' N, 8° 43' W). Nesta região, a principal cultura produzida é o arroz, embora o milho seja também cultivado mas em menor extensão. Na proximidade dos campos agrícolas existem várias zonas com interesse de conservação, nomeadamente o Paul do Taipal (Figura 2), o qual até aos anos 70 foi utilizado para a produção de arroz. Em 1999, o Paul do Taipal foi classificado como Zona de Protecção Especial para aves (Dec.-Lei nº. 384-B/99, de 23 de Setembro) e, assim, foi integrado na Rede Natura 2000 (EEC, 1992; ICN, 2008) (código nº. PTZPE0040) e em 2001 este Paul passou a fazer parte da Lista Ramsar de Zonas Húmidas com Interesse Internacional (local Ramsar nº. 1107).

O sistema hidro-agrícola mantido no Vale do Baixo Mondego é composto por uma extensa rede de canais de irrigação e/ou drenagem (Lima e Lima, 2002), sendo o fluxo da água controlado por comportas. Assim sendo, o estudo realizado *in situ* foi direccionado para um canal de irrigação/drenagem com 5 km de comprimento, 6-7 m de largura e uma profundidade \approx 1-2,5 m. Neste canal que atravessa, a montante, a zona do Paul do Taipal e, a jusante, os campos agrícolas (Figura 3) seleccionaram-se dois locais de amostragem: L1 (no troço do canal que atravessa a zona protegida do Paul do Taipal) e, L2 (no troço do canal ladeado por campos agrícolas). Durante o estudo efectuado no campo, o fluxo da água revelou ser residual ($\leq 0.3 \text{ m s}^{-1}$) e a turvação elevada. A principal diferença entre L1 e L2 era devida sobretudo à densa cobertura das margens por macrófitas (principalmente caracterizada por



FIGURA 2: Paul do Taipal.

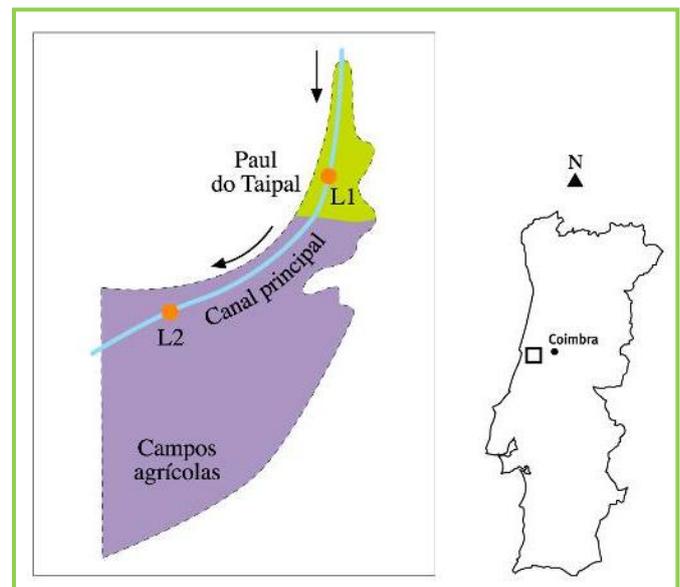


FIGURA 3: Representação esquemática da área e locais de estudo. A zona sombreada a verde representa o Paul do Taipal e a lilás os campos agrícolas.

Typha latifolia, *Scirpus lacustris* e *Phragmites australis*) em L1, o que aumentava a área de sombra naquele local.

A aplicação de agroquímicos nos arrozais ocorre, essencialmente, entre o final de Abril e Junho tanto por via terrestre como aérea. De acordo com informação fornecida pelos agricultores locais, o fertilizante aplicado na zona era sobretudo o sulfato de amónia, enquanto que entre os principais herbicidas se destacava: o Viper[®] (2.4 g penoxsulame L⁻¹), o Stam Novel Flo 480[®] (480 g propanil L⁻¹), Basagran[®] (480 g bentazona-sódio L⁻¹), Quitt[®] (400 g bentazona L⁻¹ + 60 g MCPA L⁻¹), and Facet[®] (250 g quincloraque L⁻¹). Em caso de necessidade extrema, os agricultores aplicavam como insecticidas o Quirlan[®] (24% clorfenvinfos L⁻¹) ou o Decis[®] (25 g deltametrina L⁻¹) no combate a pragas de insectos.

Organismos de teste e sua manutenção laboratorial

P. subcapitata Korshikov (Hindak) foi mantida em culturas unialgais contendo 100 mL de meio MBL¹ a 20 ± 2°C, sob um fotoperíodo de 16^L:8^E h. A renovação de culturas foi feita a partir de outras culturas em fase de crescimento exponencial (*i.e.*, com 5 – 7 dias de crescimento).

Desenho experimental

Conforme já referido, os ensaios *in situ* foram realizados ao longo de uma escala temporal definida mediante as aplicações de pesticidas nos arrozais (ver Figura 4): i) antes do início da aplicação dos herbicidas (teste preliminar com início no dia -14), ii) aquando da primeira aplicação de pesticidas (dia de teste 0), iii) 3 dias após a primeira aplicação de pesticidas (dia de teste 3), iv) 6 dias após a primeira aplicação de pesticidas (dia de teste 6). Cada período de avaliação *in situ* envolveu: a) análises físico-químicas a amostras de água, b) realização de ensaios *in situ* para avaliar a variação no crescimento da microalga verde *P. subcapitata*, c) realização de ensaios no laboratório para avaliar a variação no crescimento da microalga verde *P. subcapitata*. Os procedimentos de execução dos ensaios seguiram, sempre que possível, o estabelecido no protocolo padronizado definido para ensaios com algas (OCDE, 2002).

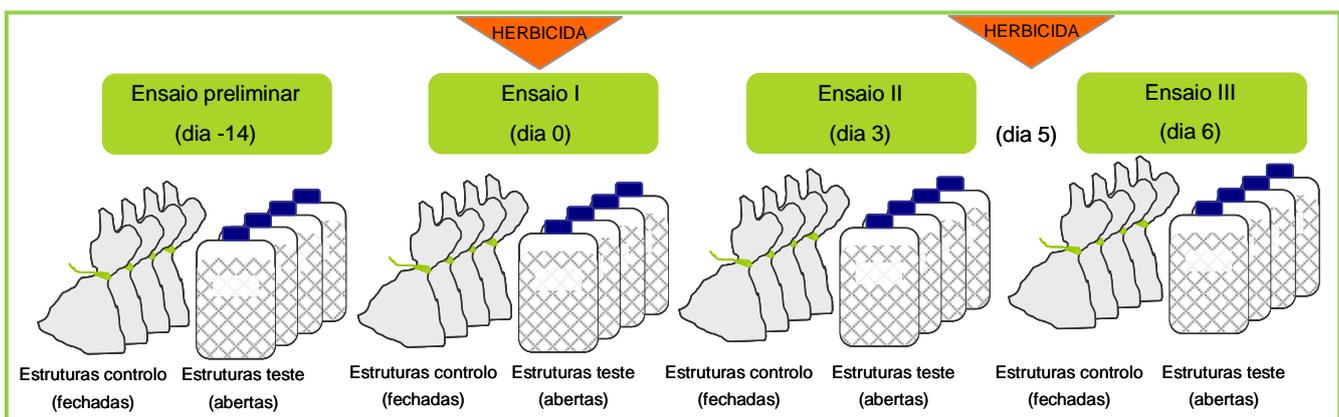


FIGURA 4: Representação esquemática do desenho experimental definido para os ensaios *in situ*, realizados ao longo do tempo, em relação aos momentos de aplicação de herbicidas pelos agricultores (triângulos laranja). São ainda representadas as estruturas utilizadas (controle e de teste) nos ensaios com as algas, bem como o número de réplicas de cada uma (4) que foi colocado em cada local de estudo.

¹ Meio de cultura de algas esterilizado constituído por macronutrientes, micronutrientes e vitaminas diluídos em água destilada (Stein, 1973).

Caracterização físico-química

Recorrendo a instrumentos portáteis foram analisados os seguintes parâmetros *in situ*: pH, temperatura, condutividade, concentração de oxigénio dissolvido ($[O_2]$) e transparência (utilizando um disco de Secchi). Além disso procedeu-se à colheita de amostras de água em cada local de estudo para analisar a concentração de clorofila *a* ($[Chl\ a]$), sólidos suspensos totais (SST), e o conteúdo em nutrientes, *i.e.*, concentração de nitratos (NO_3^- -N), nitritos (NO_2^- -N), amónia não ionizada (NH_4^+ medida como NH_3 -N), fosfatos (PO_4^{3-}) e sulfatos (SO_4^{2-}) (A.P.H.A., 1995).

TABELA I – Informação geral e características físico-químicas dos herbicidas analisados. Dados baseados em Tomlin (2000), excepto quando indicado por números.

	Penoxsulame	Quincloraque	Bentazona	MCPA	Propanil
Taxas de aplicação	2 L ha ⁻¹	2,5-3 L ha ⁻¹	3-4 L ha ⁻¹	3-3,5 L ha ⁻¹	7,5-14 L ha ⁻¹
Produto formulado	Viper [®]	Facet [®]	Basagran [®]	Quitt [®]	Stam Novel Flo 480 [®]
Empresa	Dow AgroSciences	Basf	Basf	Basf	Cequisa
Tipo de formulação	EC	SC	S	S	SC
Peso molecular (g mol ⁻¹)	483 ¹	242	240,3	200,6	218,1
Solubilidade (mg L ⁻¹)	410 (pH 7) ²	0,065 (20°C) ⁵	570 (20°C, pH 7)	734 (25°C)	130 (20°C)
Tempo de meia vida (dias)					
solo	34-118 ³	450 ⁴	12 to 45	25 ⁴	1 ⁷
água	12-38 ³	-	80 ⁴	13,5 ⁴	0,5-1 ⁷
Ecotoxicidade					
Microalgas					
72-h CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	0,47 ⁴ (<i>Anabaena flos-aquae</i>)	6,53 ⁴ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	47,3	21,96 ⁶ (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	0,031 (96-h EC ₅₀) ⁸
<i>Daphnia</i> sp.					
48-h CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	98,3 ⁴	29,8 ⁴	125	190 ⁴	3,55 - 6,72 ⁹

CE₅₀ – concentração que provoca 50% do efeito analisado (e.g., mortalidade), EC – emulsão concentrada, S - solução, SC – concentrado dispersível. ¹ Jabusch e Tjeerdema (2008), ² Roberts et al. (2003), ³ U.S.EPA (2007), ⁴ FOOTPRINT (2008), ⁵ Marchesan et al. (2007), ⁶ Ma et al. (2001), ⁷ Konstantinou et al. (2006), ⁸ Pereira et al. (2009), ⁹ Pereira et al. (2007).

Adicionalmente foi também quantificada a concentração de herbicidas [mais propriamente, o seu ingrediente activo (i.a.) respectivo] na água (por extração em fase sólida seguida de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector ultravioleta para separar e quantificar os i.a.s² presentes na amostra): penoxsulame, quincloraque, bentazona, MCPA e propanil (as principais características destes compostos estão apresentadas na tabela I).

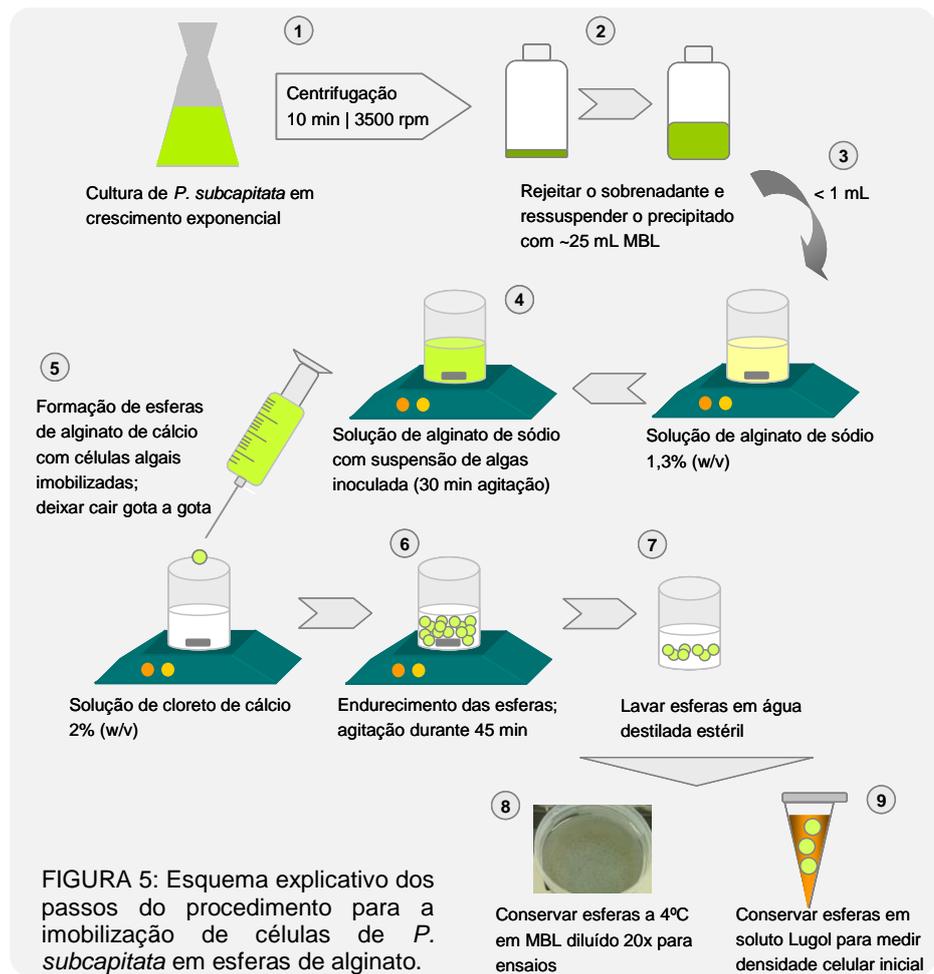
Imobilização das células algais

As células de *P. subcapitata* foram imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, de acordo com a técnica desenvolvida por Moreira dos Santos et al. (2002) e Moreira-Santos et al. (2004a; 2004b) (Figura 5). Para o efeito, preparou-se uma solução de alginato de sódio 1,3% (w/v) (Fluka BioChemika 71238, N° CAS: 9005-38-3) em água destilada morna previamente esterilizada (autoclavada 15 min a 120°C). Posteriormente, centrifugou-se (durante 5 min a 3500 rpm) uma alíquota da cultura de algas em crescimento exponencial

² Substância com actividade física, química e/ou biológica que ao interagir com um determinado local/estrutura alvo origina uma dada resposta desencadeada por um ou vários modos de acção.

(Figura 5-1). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado final foi ressuspensionado num volume reduzido de MBL (ca. 25 mL), de modo a obter-se uma suspensão concentrada (Figura 5-2).

Aproximadamente 1 mL desta suspensão foi adicionada à solução de alginato, conseguindo-se assim, obter uma densidade celular inicial de $\approx 10^6$ células mL⁻¹ (Figura 5-3). A suspensão de alginato - células algais foi agitada durante ca. de 30 min (Figura 5-4). De seguida, preparou-se uma solução de cloreto de cálcio 2% (w/v) (Merck 1.02382, N° CAS: 10043-52-4), deixando-se a agitar durante 15 min. De seguida, utilizando uma seringa de 20 mL e uma agulha de 0,8 mm fez-se cair gota a gota da suspensão alginato - células algais (de uma altura de ≈ 15 cm) na solução de cloreto de cálcio



de cálcio (em agitação permanente) (Figura 5-5). Este passo permite a formação e endurecimento das esferas de alginato, as quais devem permanecer em agitação na solução de cloreto de cálcio por um período aproximado de 45 minutos (Figura 5-6). As esferas formadas foram lavadas em água destilada (Figura 5-7) e conservadas numa solução de MBL 20x diluída em água destilada, a 4°C e no escuro, até um máximo de 15 dias antes da sua utilização (Figura 5-8). O diâmetro das esferas foi medido num lupa binocular, através da utilização de ocular micrométrica e de um micrómetro objectivo (para converter o número de divisões determinado com a ocular micrométrica em mm) a fim de se calcular o volume das esferas de alginato. No final dos ensaios, a contagem do número de células algais nas esferas de alginato, requer que estas sejam previamente desagregadas. Para isso, cada grupo de 3 esferas foi mergulhado em 1 mL de solução de citrato de trissódio 3% (w/v) (Riedel-de Hæn 25116, N° CAS: 6132-04-3) agitando-se suavemente. A contagem celular é então realizada com uma câmara de Neubauer num microscópio (Figura 6). Este último procedimento foi também efectuado no início dos ensaios para determinar a densidade celular inicial efectiva, utilizando-se 3 esferas de alginato previamente conservado em soluto de Lugol (Figura 5-9).

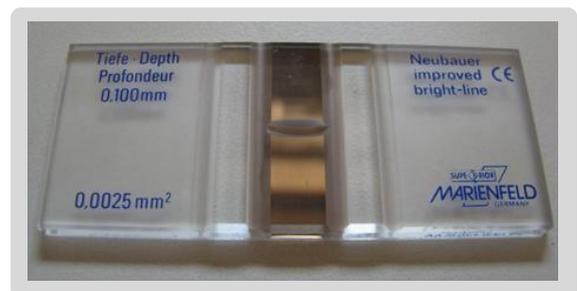


FIGURA 6: Câmara de Nuebauer para contagem de células algais microscópicas.

Ensaio *in situ*

As estruturas *in situ* construídas para os ensaios de crescimento de algas tiveram por base as que foram desenvolvidas por Moreira dos Santos et al. (2002) e Moreira-Santos et al. (2004a, 2004b). Estas eram compostas por uma microplaca de plástico, onde eram colocadas as esferas de alginato (Figura 7 – A, B) e um recipiente exterior coberto a rede, que protegia e reduzia a acumulação de detritos na microplaca (Figura 7 – C, D). Assim, retiraram-se os fundos de 4 poços da placa, os quais foram cobertos com rede de nylon com 55 µm de poro (colada com cola silicone a quente) (Figura 7 – A), para permitir o contacto das células algais, imobilizadas nas esferas de alginato de cálcio (Figura 7 - B), com a água do canal ou com o meio controlo. No topo, os 4 poços da microplaca foram também cobertos por uma rede de 55 µm de poro. O desenho experimental *in situ* envolveu assim a utilização de estruturas “controlo” (não permitiam o contacto com o meio circundante, sendo a placa introduzida num saco de plástico hermeticamente fechado contendo MBL, o qual, por sua vez, era introduzido num saco de rede com 5 mm de poro; Figura 7 – C) e de “teste” (permitia o contacto com o meio circundante; consistia num garrafão de plástico de 5 L com aberturas transversais em dois lados, as quais foram cobertas com rede de nylon com 0,5 mm de poro; Figura 7– D).

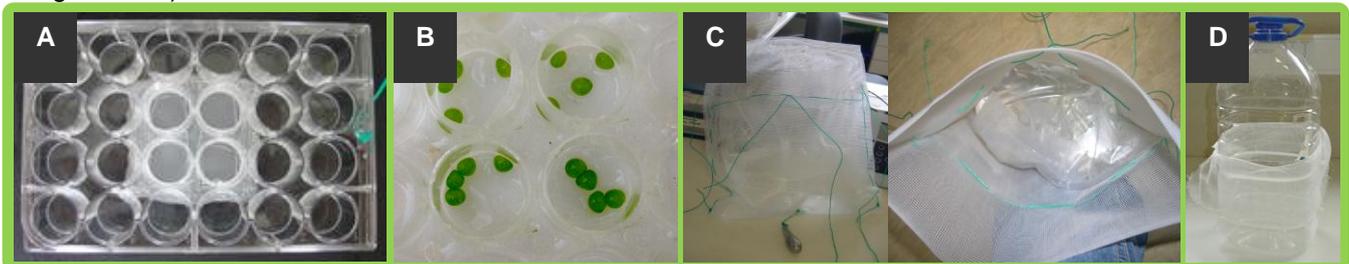


FIGURA 7: Câmara (A, B) e estruturas controlo (C) e de teste (D) para ensaios *in situ* com algas imobilizadas em esferas de alginato (b).

Em cada local foram colocadas 4 estruturas controlo (réplicas) e 4 estruturas de teste (réplicas), estando todas amarradas a uma corda principal fixa às margens por meio de estacas (Figura 8). As estruturas foram submersas a uma profundidade que permitisse a entrada de luz solar. Após 9 dias de exposição *in situ*, as estruturas foram removidas de cada local e as esferas de alginato foram conservadas em soluto de Lugol até se proceder à contagem do número de células em laboratório (ver descrição anterior), a partir da qual foi determinada a taxa de crescimento de *P. subcapitata*. No sentido de assegurar a validade do ensaio foram considerados dois critérios de validade, de acordo com o protocolo para ensaios laboratoriais (OCDE, 2002): (i) a densidade celular dos controlos deverá aumentar 16 vezes em relação à densidade celular inicial e (ii) o coeficiente de variação³ da média da taxa de crescimento no controlo deve ser $\leq 20\%$.



FIGURA 8: Colocação das câmaras controlo e de teste nos ensaios *in situ*.

³ Equivale à razão entre o desvio padrão e a média, podendo o coeficiente de variação ser ainda multiplicado por 100 para ser expresso em percentagem.

Ensaio laboratoriais

Os ensaios laboratoriais foram desenvolvidos em simultâneo com os ensaios de campo. Estes tiveram como objectivo avaliar se a resposta da alga era de facto devida à contaminação química da água ou a outro factor ambiental (e.g., intensidade luminosa devido a cobertura de macrófitas, turvação elevada da água, variação da temperatura, limitação de nutrientes) (Mayer et al., 1998; Moreira-Santos et al., 2004b), cujo efeito possa ser minimizado sob condições laboratoriais. Os ensaios de laboratório foram também realizados com células de *P. subcapitata* imobilizadas em esferas de alginato, embora com uma duração de apenas 96h, tal como previsto nos protocolos padronizados (U.S.EPA, 2002; OCDE, 2002). As amostras de água colhidas em L1 e L2 foram filtradas por filtros com 1 µm de poro. A filtração teve como objectivo eliminar células algais provenientes do canal. No ensaio laboratorial consideraram-se apenas três réplicas por tratamento (amostra de água local e controlo de MBL) contendo 4 esferas de alginato cada uma (densidade celular inicial ca. 10⁶ células mL⁻¹). Os ensaios decorreram sob constante agitação (≈100 rpm num agitador orbital) e às mesmas condições descritas para a manutenção destes organismos. No final do ensaio, conservaram-se as esferas de alginato em soluto de Lugol, até ser possível proceder à contagem de células, de acordo com o descrito anteriormente.

Análise dos dados

Os dados gerados nos ensaios *in situ* e no laboratório foram expressos como percentagem dos respectivos controlos, de modo a minimizar potenciais diferenças associadas às estruturas experimentais, à condição fisiológica dos organismos de teste (Chappie e Burton, 1997) e/ou a factores ambientais. A taxa de crescimento (TC, dia⁻¹) médio das algas foi determinada de acordo com a expressão:

$$TC = (\ln x_f - \ln x_i) / t,$$

em que $\ln x_f$ é o logaritmo natural da densidade celular no final do ensaio, $\ln x_i$ é o logaritmo natural da densidade celular no início do ensaio e t é o período de duração do ensaio em dias.

Tendo os dados tratados procedeu-se à sua análise estatística. Recorreu-se para isso ao teste de análise de variâncias (ANOVA) unifactorial e bifactorial para verificar qual dos factores (*i.e.*, períodos de realização de testes e/ou diferenças entre locais L1 e L2) exercia uma influência mais significativa sobre as variações no crescimento das algas. Além disso, testou-se também diferenças nas respostas das algas nos ensaios no campo *versus* nos ensaios laboratoriais pela aplicação de um teste de *t*-Student [(para explicação pormenorizada ver Zar (1996)].



RESULTADOS

Na tabela II são apresentados os dados físico-químicos determinados aquando da colocação dos ensaios *in situ*. Ao longo destes ensaios registou-se o aumento da temperatura da água e a diminuição da concentração de oxigénio dissolvido. Concomitantemente, observou-se uma maior concentração de clorofila *a* ([Chl *a*]) em L1, comparativamente com L2, onde a [Chl *a*] diminuiu consideravelmente nos momentos de aplicação de pesticidas (dias 0 e 5). Por outro lado, as concentrações de nutrientes sofreram, geralmente, um aumento gradual ao longo dos ensaios *in situ* em L2, enquanto que em L1 se verificou uma maior oscilação nos valores determinados. As concentrações mais elevadas de herbicidas foram quantificadas em

L2, principalmente nos dias correspondentes à sua aplicação (dias 0 e 5), tendo sido observada uma diminuição da sua quantidade nos dias intercalares aos testes.

TABELA II – Parâmetros físico-químicos determinados na coluna de água aquando da realização dos ensaios *in situ* nos locais 1 (L1) e 2 (L2). A sombreado são indicados os dias de aplicação de pesticidas.

Dias de teste	-14		0		3		5		6	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2
Locais	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2
pH	7,7	7,8	7,4	7,6	7,5	7,6	7,5	7,4	7,5	7,5
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	422	492	508	475	561	563	535	479	503	530
[O ₂] (mg L ⁻¹)	8,9	12,6	6,4	7,8	4,4	6,1	4,9	5,2	3,2	4,6
Temperatura (°C)	16,0	16,9	18,9	19,7	19,5	19,5	21,8	22,5	22,4	22,3
Transparência (m)	0,6	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
SST (mg L ⁻¹)	0,89	0,94	0,96	0,97	0,84	0,81	0,82	0,76	0,81	0,77
[Chl a] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10,7	9,8	22,7	5,9	11,9	9,10	16,3	3,9	10,3	15,5
[Nutrientes] (mg L ⁻¹)										
NH ₃ -N	0,23	0,40	0,45	0,49	0,71	0,66	0,43	0,66	0,74	0,70
NO ₃ ⁻ -N	2,90	0,90	0,70	1,80	0,80	1,40	1,00	1,50	0,90	1,40
NO ₂ ⁻ -N	4,00	1,00	2,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,03	0,01	0,02
PO ₄ ³⁻	0,16	0,06	0,14	0,25	0,17	0,35	0,32	0,59	0,12	0,36
SO ₄ ²⁻	28	19	15	20	16	20	31	26	24	29
[Pesticidas] ($\mu\text{g L}^{-1}$)										
Penoxsulame	alq	alq	0,096	0,31	alq	0,099	0,084	2,3	0,0	0,86
Quincloraque	alq	alq	alq	0,18	alq	0,081	0,056	0,088	alq	0,053
Bentazona	alq	alq	alq	0,84	0,11	0,52	0,089	0,74	alq	1,1
MCPA	alq	alq	alq	0,37	0,20	2,5	alq	3,5	alq	3,0
Propanil	alq	alq	alq	2,4	alq	0,74	alq	0,62	alq	0,23

[O₂] – concentração de oxigénio dissolvido, SST – sólidos suspensos totais, [Chl a] – concentração de chlorofila a, [Nutrientes] – concentração de nutrientes, [Pesticidas] – concentração de pesticidas, alq – abaixo do limite de quantificação.

Os resultados dos ensaios *in situ* e laboratoriais com *P. subcapitata* foram de encontro aos critérios de validação definidos. As taxas de crescimento de *P. subcapitata* mais elevadas ocorreram durante os ensaios preliminares (com início no dia -14, i.e. catorze dias antes da primeira aplicação de pesticidas) em ambos os locais de estudo (Figura 9). Contudo, em cada local, observou-se uma redução geral do crescimento algal ao longo dos períodos de teste, em paralelo com a aplicação de herbicidas (Figura 9,

Tabela II). Enquanto em L1 se registou uma inibição significativa da taxa de crescimento algal nos dias de teste 0, 3 e 6, em L2, esse resultado foi restrito aos dias 3 e 6. Por outro lado, não foram registadas diferenças significativas no crescimento de *P. subcapitata* exposta a L1 ou a L2. De um modo geral, verificou-se que a resposta de *P. subcapitata* nos ensaios *in situ* foi semelhante à obtida nos ensaios laboratoriais com amostras de água colhidas em L1 e L2 (Figura 9), sendo a variação do crescimento das algas, ao longo do tempo, explicada sobretudo pelos momentos de aplicação de herbicidas.

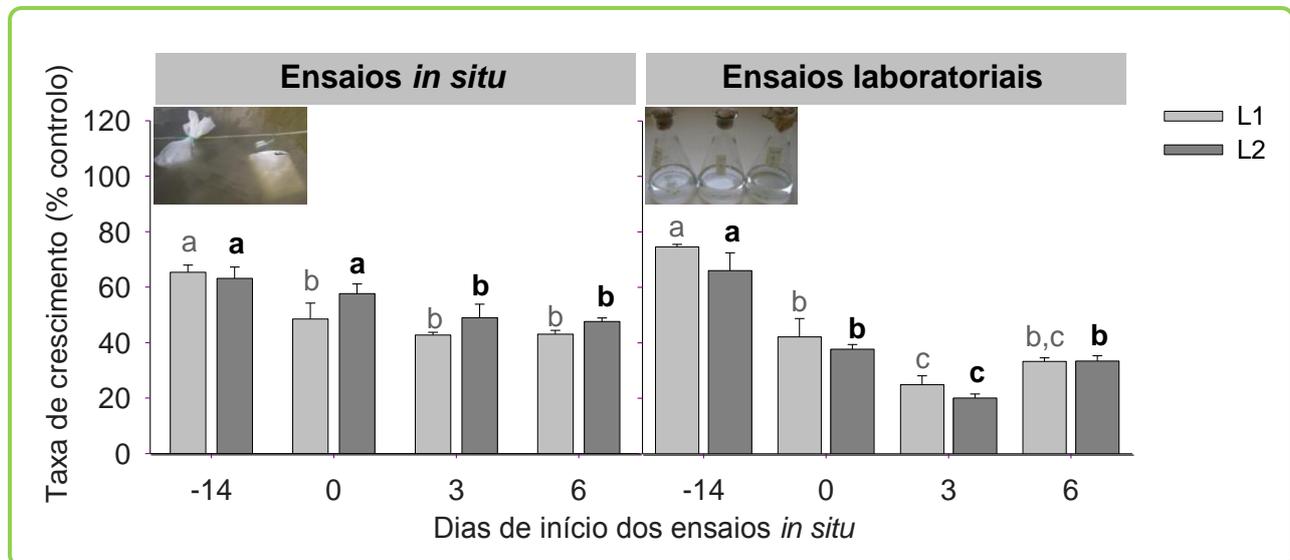


FIGURA 9: Taxa de crescimento de *P. subcapitata* expressa em percentagem do controlo, para os ensaios realizados *in situ* e no laboratório em diferentes períodos de teste nos locais L1 e L2. As barras de erro representam o erro padrão da média calculada para cada tratamento. As diferentes letras apresentadas no gráfico indicam diferenças significativas entre os ensaios realizados em diferentes períodos em L1 (letras a cinza claro) ou L2 (letras a cinza escuro). Ou seja, nos ensaios em que o crescimento das algas foi significativamente diferente, essa diferença é indicada pela colocação de uma letra diferente sobre as barras respectivas. Note-se que se devem comparar apenas as barras da mesma cor entre si.

DISCUSSÃO

Em paralelo com a aplicação intermitente de herbicidas pelos agricultores foi observada uma redução geral da qualidade da água da vala em estudo, traduzida quer pela degradação do estado físico-químico desse sistema (e.g. aumento do conteúdo em nutrientes), quer pela inibição do crescimento de *P. subcapitata*. Contudo, os parâmetros físico-químicos apresentaram valores geralmente abaixo dos limites máximos admissíveis (excepto para $[O_2]$ em L1 no dia de teste 6, ver tabela II), estabelecidos na legislação nacional (Dec. Lei nº236/98, de 1 de Agosto) para a qualidade de águas de superfície e de irrigação (MA, 1998). Por outro lado, o conteúdo em compostos azotados (*i.e.*, amónia não ionizada, nitratos e nitritos) e em fosfatos (tabela II) em L1 e L2 indicou que o canal se encontrava num estado trófico avançado⁴.

As concentrações individuais de herbicidas detectados em L2, desde o dia 0 em diante ultrapassaram geralmente o limite máximo admissível pela mesma legislação ($< 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) (MA, 1998), sendo notória a ocorrência de concentrações elevadas de herbicidas na água do canal nos dias da sua aplicação nos arrozais (dias de teste 0 e 5), enquanto que nos dias intercalares essas concentrações decresceram

⁴ Estado trófico avançado – significa que existe uma elevada concentração de nutrientes compostos por azoto e fósforo, o que pode conduzir ao crescimento excessivo de algas, comprometendo assim o equilíbrio do ecossistema por alteração de factores ambientais preponderantes (e.g., decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido).

consideravelmente. Este facto confirma a rápida degradação destes compostos sob dadas condições ambientais (e.g., luz solar, temperatura elevada, acção microbiana) (ver tempo de meia vida dos compostos na tabela I) (e.g., Santos et al., 2000; Marchesan et al., 2007; Comoretto et al., 2008; Kuster et al., 2008). Embora L1 se localize numa área protegida onde não são aplicados pesticidas, a sua proximidade relativa aos campos de arroz pode conduzir à sua exposição a esses contaminantes, ainda que em concentrações extremamente reduzidas (Tabela II). Tal exposição pode ocorrer, nomeadamente, por deposição atmosférica dos compostos químicos, aquando da aplicação de herbicidas, o que pode ser promovido por determinadas condições meteorológicas (e.g., vento e precipitação).

Os herbicidas são geralmente considerados de baixo risco para a integridade dos agro-ecossistemas quando utilizados mediante as taxas de aplicação recomendadas, dada a sua rápida degradação ambiental (Santos et al., 2000). Contudo, este estudo e outros anteriores demonstraram que pela sua actividade química e biológica activas, juntamente com o seu uso abundante, estes compostos podem induzir efeitos negativos em organismos aquáticos não alvo (Barata et al., 2007). Deste modo, torna-se relevante avaliar os efeitos que poderão ocorrer *in situ*, devido à utilização de herbicidas.

Tendo em conta que as taxas de crescimento de *P. subcapitata* nas câmaras controlo (fechadas) expostas *in situ* apresentaram valores superiores ao critério de validação estabelecido no protocolo pode-se afirmar que o desenvolvimento e colocação *in situ* daquelas câmaras foi efectuado com sucesso, e que a inibição registada nas estruturas de tratamento não esteve associada às câmaras. Além disso, *P. subcapitata* demonstrou ser sensível ao tipo de contaminação a que foi exposta, tal como será de seguida discutido.

A inibição significativa da taxa de crescimento de *P. subcapitata* exposta *in situ* a L1 (nos ensaios iniciados nos dias 0, 3 e 6 de teste; Figura 9) não foi de encontro ao esperado, uma vez que este local não está directamente sujeito a pesticidas. Entre as potenciais explicações para o sucedido aponta-se a diminuição drástica dos níveis de oxigénio em L1 ao longo dos ensaios, o aumento da concentração de amónia (e.g., Abeliovich e Azov, 1976; Källqvist e Svenson, 2003) e a possível presença de substâncias alelopáticas⁵ libertadas pelas macrófitas que cobrem as margens da vala naquele local (ver Material e Métodos) (Ervin e Wetzel, 2003).

Em L2, por outro lado, a diminuição da taxa de crescimento desta alga foi significativa apenas nos ensaio *in situ* colocados nos dias de teste 3 e 6 (Figura 9). Este local esteve sujeito a concentrações de herbicidas mais elevadas do que L1, o que poderá ser uma explicação para os resultados observados, ainda que os valores obtidos estejam abaixo das concentrações que provocam efeitos tóxicos nas algas (Tabelas I e II). No entanto, deve ser tido em conta que sob exposições directas *in situ* podem interagir vários factores de confusão (Chappie e Burton, 1997; Moreira-Santos et al., 2004b). Entre as variáveis ambientais que podem eventualmente limitar o crescimento algal para além da contaminação local, salienta-se a intensidade luminosa, o conteúdo em nutrientes e a temperatura (e.g., Mayer et al., 1998; Moreira-Santos et al., 2004a; 2004b).

Para despistar a influência destas variáveis nos resultados realizaram-se ensaios laboratoriais com amostras de água de L1 e L2. Obteve-se então um padrão de resposta semelhante ao determinado *in situ*,

⁵Substâncias produzidas nomeadamente por plantas macrófitas e algas que podem afectar negativamente o crescimento de outras plantas, algas ou outros organismos.

apesar da inibição das taxas de crescimento nos ensaios de laboratório ser mais forte do que no campo (Figura 9). Esta discrepância pode estar associada às diferentes durações dos ensaios (*in situ*: 9 dias, laboratoriais: 4 dias), e não a variações de luz e temperatura. Sob exposições *in situ* é possível que um efeito na resposta dos organismos a um dado episódio de contaminação por agroquímicos seja atenuado ao longo do tempo devido, por exemplo, à degradação dos pesticidas.



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A abordagem metodológica levada a cabo neste trabalho demonstrou, com eficiência, que ocorreu degradação da qualidade de um sistema aquático adjacente a uma zona de produção agrícola extensiva. Em particular, a utilização de uma espécie autóctone sensível (a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*) autóctone constituiu uma mais valia no sentido em que aumentou a relevância ecológica do estudo. Desta forma é possível adquirir uma noção mais abrangente e real dos riscos a que as populações naturais não alvo possam estar potencialmente expostas, aquando da aplicação de pesticidas. Evidentemente que neste tipo de estudos que envolvem exposição directa às condições de campo não é fácil estabelecer relações causa-efeito claras, podendo a análise de apenas alguns parâmetros monitorização físico-química (*e.g.*, nutrientes, oxigénio dissolvido, pH) não ser suficiente robusta para interpretar as respostas biológicas dos organismos, na medida em que muitas são as variáveis ambientais que não são controladas, reforçando a necessidade de se considerar análises biológicas complementares (*e.g.*, estudo de comunidades). Todavia, os resultados que se obtém correspondem à integração dessas mesmas diversas variáveis que ocorrem em simultâneo durante o período de exposição, e que podem contribuir para reduzir ou aumentar o efeito tóxico dos pesticidas, assim como de outros contaminantes. Assim sendo, recomenda-se a aplicação ou adaptação de ensaios *in situ* de tal metodologia para avaliar com maior realismo os impactos/riscos em noutras zonas semelhantes à descrita, no sentido de colmatar a falta de informação ecotoxicológica que existe ao nível do contexto nacional.

De futuro, este estudo poderá ser uma base de trabalho para o desenvolvimento de planos de redução mitigação de riscos associados a práticas agrícolas, como forma de gerar medidas de conservação de *habitats* e da biodiversidade por eles sustentada, principalmente em áreas com um carácter de protecção especial, com um elevado valor ecológico nacional e internacional.

agradecimentos • Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) no âmbito da bolsa de Doutoramento atribuída a Catarina R Marques.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeliovich A, Azov Y (1976). Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied Environmental Microbiology* 31: 801-806.
- Allen Y, Calow P, Baird DJ (1995). A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(9): 1625-1630.
- A.P.H.A. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington.

- Barata C, Damásio J, López MA, Kuster M, Alda ML, Barceló D, Riva MC, Raldúa D (2007). Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(2): 370-379.
- Boxall ABA, Brown CD, Barrett KL (2002). Review - Higher-tier laboratory methods for assessing the aquatic toxicity of pesticides. *Pest Management Science* 58: 637-648.
- Chappie DJ, Burton GA (1997). Optimization of *in situ* bioassays with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(3): 559-564.
- Comoretto L, Arfib B, Talva R, Chauvelon P, Pichaud M, Chiron S, Hohener P (2008). Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): field study and modelling. *Environmental Pollution* 151(3): 486-493.
- Dabrowski JM, Bollen A, Schulz R (2005). Combined effects of discharge, turbidity, and pesticides on mayfly behavior: experimental evaluation of spray-drift and runoff scenarios. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(6): 1395-1402.
- Domingues I, Guilhermino L, Soares AMVM, Nogueira AJA (2008). Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. *Chemosphere* 69(1): 145-154.
- EC (European Commission) (2002). Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology, in the Context of the Council Directive 91/414/EEC. Working Document. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. SANCO/3268/2001 - rev. 4 (final), 17 October 2002, 39 pp.
- EEC (European Economic Commission) (1992). Council Directive 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora, in: Communities, OJ L 206, 22.7.92.
- Ervin GN, Wetzel RG (2003). An ecological perspective of allelochemical interference in land-water interface communities. *Plant and Soil* 256(1): 13-28.
- Faria MS, Nogueira AJA, Soares AMVM (2007). The use of *Chironomus riparius* to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 218-226.
- FOOTPRINT PPDB (The FOOTPRINT Pesticide Properties Database) (2008). FOOTPRINT: creating tools for pesticide risk assessment and management in Europe. Research Project in the 6th Framework Program for Research and Technological Development. [Online]. Retrieved on August from: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>.
- Hanazato T (2001). Review - Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution* 112: 1-10.
- ICN (Instituto para a Conservação da Natureza) (2008). Sistema de Informação do Património Natural, Áreas Classificadas: Rede Natura 2000. Instituto de Conservação da Natureza. [Online]. Acedido em 04.08.2008 a partir do endereço: <http://www.icn.pt/sipnat/sipnat4.html>.
- Jabusch TW, Tjeerdema RS (2008). Chemistry and fate of triazolopyrimidine sulfonamide herbicides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 193: 31-52.
- Källqvist T, Romstad R (1994). Effects of agricultural pesticides on planktonic algae and cyanobacteria - examples of interspecies sensitivity variations. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 13: 117-131.
- Källqvist T, Svenson A (2003). Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*. Chlorophyta. *Water Research* 37: 477-484.
- Konstantinou IK, Hela DG, Albanis TA (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece, Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution* 141: 555-570.
- Kuster M, Alda MJL, Barata C, Raldúa D, Barceló D (2008). Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 75: 390-401.
- Lima MIP, Lima JLMP (2002). Precipitation and the hydrology of the Mondego catchment: a scale-invariant study. In: MA Pardal, JC Marques, MA Graça (eds.), *Aquatic Ecology of the Mondego River Basin Global Importance of Local Experience*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- MA (Ministério do Ambiente) (1998). Decreto-Lei nº. 236/98 de 1 de Agosto. Diário da República I Série A, 176, 3676-3722.
- Ma J, Liang W, Xu L, Wang S, Wei Y, Lu J (2001). Acute toxicity of 33 herbicides to the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66(4): 536-541.
- Marchesan E, Zanella R, de Avila LA, Camargo ER, Machado SLD, Macedo VRM (2007). Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia Agricola* 64(2): 131-137.
- Mayer P, Frickmann J, Christensen ER, Nyholm N (1998). Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(6): 1091-1098.

- Moreira dos Santos M, Moreno-Garrido I, Gonçalves F, Soares AMVM, Ribeiro R (2002). An *in situ* bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(3): 567-574.
- Moreira-Santos M, Soares AMVM, Ribeiro R (2004a). An *in situ* bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 164-173.
- Moreira-Santos M, Soares AMVM, Ribeiro R (2004b). A phytoplankton growth assay for routine *in situ* environmental assessments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(6) : 1549-1560.
- Nguyen VN (2002). FAO Rice Information, Vol. 3. The Secretariat of the International Rice Commission Crop and Grassland Service Plant Production and Protection Division, Agriculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) (2002). Freshwater Algal and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test - test guideline 201. OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, France.
- Pereira JL, Mendes CD, Gonçalves F (2007). Short- and long-term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 386-396.
- Pereira JL, Antunes SC, Castro BB, Marques CR, Gonçalves AMM, Gonçalves F, Pereira R (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18(4): 455-463.
- Phillips BM, Anderson BS, Hunt JW, Nicely PA, Kosaka RA, Tjeerdema RS, de Vlaming V, Richard N (2004). *In situ* water and sediment toxicity in an agricultural watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(2): 435-442.
- Roberts DW, Knuteson JA, Jackson R (2003). The dissipation of penoxsulam in flooded rice fields. *In: Pesticides in Air, Plant, Soil & Water Systems, XII Symposium Pesticide Chemistry, Piacenza, Italy. Institute of Agricultural and Environmental Chemistry of the Catholic University, Piacenza, pp. 349-357.*
- Santos TCR, Rocha JC, Barceló D (2000). Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibril acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 879: 3-12.
- Schulz R (2003). Using a freshwater amphipod *in situ* bioassay as a sensitive tool to detect pesticide effects in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(5): 1172-1176.
- Stein JR (1973). Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. London, p 7–24.
- Tarazona JV, Sánchez P (2006). Development of an innovative conceptual model and a tiered testing strategy for the ecological risk assessment of rice pesticides. *Paddy Water Environment* 4: 53-59.
- Tomlin CDS (2000). The Pesticide Manual, twelfth ed. British Crop Protection Council, Surrey.
- Tucker KA, Burton GA (1999). Assessment of nonpoint-source runoff in a stream using *in situ* and laboratory approaches. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(12): 2797-2803.
- Twist H, Edwards AC, Codd GA (1997). A novel *in situ* biomonitor using alginate immobilised algae (*Scenedesmus subspicatus*) for the assessment of eutrophication in flowing surface waters. *Water Research* 31(8): 2066-2072.
- U.S.EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2002). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. EPA-821-R-02-01. Office of Water, Washington, D.C.
- U.S.EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2007). Penoxsulam. Human Health Risk Assessment for Proposed Uses on Fish and Shellfish. PC Code: 119031, Petition no.5F7012, DP Num: 325461. U.S.EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C. 20460.
- Zar JH (1996). Biostatistical Analysis, third ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, pp. 662.