

RODRIGO SOARES MACEDO

**EFEITO DO HERBICIDA BENTAZON SOBRE O CRESCIMENTO E
A PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA DA DIATOMÁCEA
*Skeletonema costatum***

CURITIBA

2007

RODRIGO SOARES MACEDO

**EFEITO DO HERBICIDA BENTAZON SOBRE O CRESCIMENTO E
A PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA DA DIATOMÁCEA**

Skeletonema costatum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Conservação

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

Co-orientadora:

Dra. Claudia Yuki Omachi

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

Ana Teresa Lombardi e Claudia Yuki Omachi que nos curtos períodos em que trabalhamos juntos forneceram todo o apoio e dedicação para a realização deste trabalho, sempre sugerindo discussões e considerações.

Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Hedda Kolm e Luciano Felício Fernandes que ajudaram na complementação do trabalho propondo implementações no trabalho e discussões sempre pertinentes

Leonardo Rubi Rörig como ex-orientador e amigo gentilmente disponibilizou a estrutura e equipamentos do laboratório de Microbiologia Aplicada da Univali

Donnat-Peter Hader e Peter Richter pela oportunidade de participação no “International Advanced course in Marine Biology” que possibilitou a utilização de equipamento de alta tecnologia neste trabalho.

Colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da UFPR

Magda, Vicente e Diego, apoio incondicional de família

Este trabalho é dedicado à Pricila de Souza, com quem tenho compartilhado os momentos mais felizes. TE AMO!

RESUMO

O ensaio de inibição de crescimento algal é utilizado há algumas décadas como o ensaio padrão para se avaliar a toxicidade de químicos e amostras de ambientes poluídos sobre o fitoplâncton. Entretanto, na ecotoxicologia atual vem ganhando importância a utilização de biomarcadores pois são capazes de detectar a presença de contaminantes em quantidades ínfimas e fornecem informações sobre o estado fisiológico dos organismos expostos à poluição. Este trabalho foi feito para determinar a toxicidade do herbicida bentazon, de utilização comum na atividade da rizicultura desenvolvida nas planícies costeiras do sul do Brasil, sobre o crescimento e o estado fisiológico (performance fotossintética) da diatomácea marinha *Skeletonema costatum*. O efeito do herbicida sobre o crescimento da alga foi medido através do ensaio convencional de inibição de crescimento algal e o efeito sobre a performance fotossintética (Fv/Fm) através da medição da fluorescência variável da clorofila *a* e um fluorímetro convencional e um fluorímetro de pulso de amplitude modulada (PAM). Após a exposição da alga a diversos tratamentos com o herbicida bentazon foi observada uma inibição tanto no crescimento como na Fv/Fm da espécie alvo. A toxicidade do bentazon foi detectada anteriormente, logo no momento da adição do herbicida, sobre a Fv/Fm e apenas após 24 horas de experimento sobre o crescimento da alga. Os valores de concentração de efeito não observado (CENO), concentração de efeito observado (CEO) e concentração efetiva mediana (CE₅₀) foram de 11,25, 22,5 e 24,00 mg.L⁻¹ e 1,41, 2,81 e 13 mg.L⁻¹ para os parâmetros crescimento e Fv/Fm, respectivamente. Assim, a Fv/Fm foi considerada mais sensível do que o crescimento algal para a avaliação da toxicidade do bentazon sobre o fitoplâncton. O monitoramento da Fv/Fm também permitiu uma avaliação mais detalhada no comportamento do efeito tóxico ao longo do experimento. Com isto pode se observar uma tendência de recuperação do estado fisiológico da espécie nos tratamentos de concentração mais baixas. Os valores de Fv/Fm foram distintos entre as duas metodologias utilizadas para sua medição, entretanto os percentuais de inibição obtidos (toxicidade medida) foram semelhantes. Assim, ambos os fluorímetros utilizados nos experimentos de monitoramento da Fv/Fm mediram a toxicidade do bentazon sobre *S. costatum* de forma eficiente.

Palavras-chave: Basagran, toxicologia, microalgas, arroz irrigado, estuário.

ABSTRACT

The algal inhibition growth test is used has some decades as the standard assay to evaluate the toxicity of chemicals and polluted environmental samples on freshwater and marine phytoplankton. However, in the current ecotoxicology it comes gaining importance the use of biomarkers capable to detect the presence of toxic substances in lowermost amounts and to supply information on the physiological state of the exposed organisms. This work was conducted to determine the toxicity of herbicide bentazon, of common use in agricultural activities (rice fields) developed in coastal plains of the southern brazillian coast, on the growth and physiological state (photosystem II maximum quantum yield) of marine diatom *Skeletonema costatum*. Bentazon effects on growth were measured by conducting the conventional algal growth inhibition test and its effects on photosystem II maximum quantum yield (Fv/Fm) by measuring the chlorophyll *a* variable fluorescence in conventional and pulse amplitude modulated (PAM) fluorometers. After the exposition of the algae to different bentazon treatments, it was observed an inhibition in the algae growth and Fv/Fm. Bentazon toxicity was detected previously, with bentazon addition, on the Fv/Fm whereas algal growth was affected just after 24 hours of exposure. The ecotoxicological parameters no observed effect concentration (NOEC), observed effect concentration (OEC) and median effective concentration (EC₅₀), were 11,25, 22,5 e 24,00 mg.L⁻¹ and 1,41, 2,81 e 13 mg.L⁻¹ for algal growth and Fv/Fm monitoring, respectively. Fv/Fm was considered a more sensitive parameter than algal growth to be used in the evaluation of bentazon toxicity on phytoplankton. The Fv/Fm analysis also allowed a more detailed evaluation on the behavior of the toxic effect during the experiment. Thus, it was possible to observe trends of recovery in the species physiological state in the lower exposure concentrations. The values of Fv/Fm were distinct between the two methodologies used for its measurement, however the inhibition percentages on Fv/Fm (measured toxicity) were similar. Thus, both fluorometers used in the Fv/Fm experiments measured the toxic effects of bentazon on *S. costatum* efficiently.

Keywords: Basagran, toxicology, microalgae, irrigated rice, estuary.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Contextualização	01
1.2. Bioensaios toxicológicos	02
1.2.1. Bioensaios toxicológicos convencionais	02
1.2.2. Utilização de biomarcadores em bioensaios toxicológicos	03
1.2.3. A máxima performance fotossintética do fotossistema II como ferramenta de avaliação do estado fisiológico de organismos fotossintetizantes	04
1.2.4. A Fv/Fm como biomarcador de exposição e efeito	05
1.2.4.1. Determinação da Fv/Fm	06
1.3. Utilização de organismos fitoplanctônicos na ecotoxicologia	10
1.4. Características da substância-teste	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Obtenção e manutenção da cepa de <i>Skeletonema costatum</i>	15
3.2. Realização dos experimentos	15
3.2.1. Ensaio de inibição do crescimento algal (ISO, 1989)	16
3.2.2. Experimento para determinação da Fv/Fm	20
3.3. Análise dos dados	24

4. RESULTADOS	27
4.1. Variação do pH durante os experimentos	27
4.2. Efeito do herbicida bentazon no crescimento da microalga	28
4.3. Efeito do bentazon na máxima performance fotossintética do FSII da microalga	33
5. DISCUSSÃO	43
5.1. Variação do pH durante o experimento	43
5.2. Efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento da microalga	43
5.3. Efeito do herbicida bentazon sobre a máxima performance fotossintética do FSII da microalga	47
5.4. Comparação dos diferentes parâmetros monitorados quanto a sua sensibilidade para a detecção dos efeitos do herbicida bentazon	49
5.5. Aplicabilidade da Fv/Fm para o estudo da toxicidade do bentazon em organismos fitoplanctônicos	51
5.6. Considerações Finais	53
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

As regiões estuarinas e costeiras estão constantemente recebendo uma ampla variedade de agentes poluentes que são deliberadamente ou acidentalmente disponibilizados via ação antrópica. Nestas regiões há geralmente grande concentração populacional e o desenvolvimento de atividades industriais, portuárias e urbanas que descartam consideráveis quantidades de dejetos no meio aquático. Além disso, as regiões de planície próximas às desembocaduras fluviais são geralmente áreas férteis que propiciam o desenvolvimento da agricultura que, na maioria dos casos, utiliza pesticidas, os quais acabam atingindo as águas (French, 1997; Kennish, 1997; Billen *et al.*, 2001).

Os estudos do impacto ambiental ocasionado por essas atividades agrícolas verificando o efeito dos pesticidas sobre organismos não-alvo, ou seja, a biota das áreas agrícolas e dos ecossistemas adjacentes, são de grande interesse ecológico e importantes no sentido de gerar informações básicas para que essas atividades sejam desenvolvidas de modo sustentável. Na bacia do Rio Itajaí-Açú desenvolve-se um projeto através da Empresa de Pesquisa e Extensão Agrícola de Santa Catarina (EPAGRI) em integração com a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) sobre o monitoramento da bacia do rio Itajaí-Açú e estudo do impacto das práticas de cultivo do arroz irrigado sobre os organismos aquáticos. Como parte do monitoramento, avalia-se a toxicidade dos pesticidas de utilização mais comum sobre o fitoplâncton e zooplâncton límnicos e marinhos.

A preocupação com a conservação dos ambientes naturais vem crescendo desde o surgimento e desenvolvimento da ecologia há décadas. Passou-se de uma abordagem onde uma única espécie era estudada individualmente até o entendimento de que todas estão intimamente relacionadas, entre si e com o ambiente. Sabe-se que a sobrevivência de uma espécie depende da manutenção deste sistema de inter-relações e que os distúrbios ocasionados ao ecossistema podem comprometer a integridade de uma espécie ou de toda a comunidade (Groom *et al.*, 2006).

À medida que os conhecimentos da ecologia são aprimorados, desenvolve-se a biologia da conservação, uma ciência voltada para a conservação de espécies e ecossistemas. Grande parte das técnicas clássicas da biologia da conservação envolve

conhecimentos de ecologia de ambientes terrestres e são utilizadas para solucionar problemas como a fragmentação e perda de habitat (Groom *et al.*, 2006). No entanto, tais metodologias convencionais adotadas na área da ecologia são, na maioria das vezes, inadequadas ou insuficientes para lidar com os problemas oriundos da poluição em ecossistemas aquáticos (Chapman, 2002). Neste caso, é necessário um monitoramento contínuo das características físico-químicas da água, da estrutura das comunidades, da carga e toxicidade dos poluentes que atingem o ambiente aquático. O biomonitoramento contínuo do ambiente envolve, necessariamente, o conhecimento metabólico da espécie que se avalia e uma abordagem comumente utilizada para esses estudos é a avaliação ecotoxicológica (Landis e Yu, 2003).

1.2. Bioensaios toxicológicos

A ecotoxicologia é uma área de conhecimento relativamente recente, inter e multidisciplinar que estuda a distribuição, o comportamento e o efeito dos poluentes nos ecossistemas e na biota. As avaliações ecotoxicológicas são baseadas na condução de bioensaios que permitem a caracterização do efeito da poluição sobre os organismos em termos qualitativos (tipo de efeito provocado) e quantitativos (intensidade do efeito). Normalmente os bioensaios são conduzidos em laboratório, sob condições controladas, mas podem também ser executados em maior escala (meso e macrocosmos), no campo ou mesmo em laboratório (Kennedy *et al.*, 2003; Landis e Yu, 2003). Os bioensaios toxicológicos são exigidos há algum tempo pelas legislações ambientais de diversos países (Macek, 1980; Zagatto, 2006).

1.2.1. Bioensaios toxicológicos convencionais

O fundamento de um bioensaio ecotoxicológico é a submissão dos organismos a um gradiente de concentrações da(s) substância(s) tóxica(s) por um período de tempo específico e a avaliação qualitativa e quantitativa dos efeitos observados durante a exposição. Destes, determina-se a concentração de efeito observado (CEO) que é a menor concentração testada na qual observa-se algum efeito, a concentração de efeito não observado (CENO) que corresponde à maior concentração testada onde não é observado efeito algum e a concentração efetiva mediana (CE₅₀) que é a concentração que gera algum

efeito em 50% dos indivíduos submetidos ao teste (Rand e Petrocelli, 1985; Adams e Rowland, 2003; Chasin e Azevedo, 2003). Estes parâmetros são utilizados como medidas padrão para a comparação de resultados obtidos em experimentos ecotoxicológicos desenvolvidos em diferentes laboratórios e em diferentes localidades, já que geralmente há diferenças nas condições em que são realizados esses experimentos, e mesmo diferenças nas linhagens das espécies-alvo.

Os ensaios ecotoxicológicos, na sua forma mais básica, envolvem apenas a observação sobre a mortalidade dos organismos expostos a um agente tóxico (Lovett-Doust e Lovett-Doust, 2001). Em se tratando de fitoplâncton, o experimento convencional utilizado em ecotoxicologia é denominado ensaio de inibição de crescimento algal o qual é protocolado pela International Organization for Standardization (ISO) e utilizado a mais de uma década em avaliações ecotoxicológicas, pareceres e estudos de impacto ambiental. Como o próprio nome sugere, este tipo de experimento detecta o efeito de uma substância tóxica sobre o crescimento e no caso a biomassa de uma cultura de fitoplâncton mantida em laboratório, não detectando os efeitos fisiológicos anteriores à morte das células.

1.2.2. Utilização de biomarcadores em bioensaios toxicológicos

Com o desenvolvimento da biologia molecular, bioquímica e instrumentação laboratorial, também é possível mensurar os efeitos dos agentes tóxicos sobre a fisiologia dos organismos expostos. Estes parâmetros fisiológicos que podem ser monitorados e são sensíveis a agentes estressantes são chamados de biomarcadores de efeito (Lovett-Doust e Lovett-Doust, 2001; Ferrat *et al.*, 2003). A importância da utilização de biomarcadores reside no fato do efeito medido ser uma alteração fisiológica detectada em curto prazo, antes do aparecimento dos efeitos mais drásticos sobre as estruturas, o crescimento, o comportamento e a reprodução do organismo (Ferrat *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2006; Cajaraville *et al.*, 2006).

A detecção e medição de efeitos sub-letais (uso de biomarcadores) vêm sendo favorecidas em relação à medição da mortalidade dos organismos em ensaios toxicológicos já que, na maioria dos ambientes, a exposição crônica aos agentes poluentes é significativa quanto aos efeitos sobre a biodiversidade e ocorre com maior frequência do que a mortalidade (Lovett-Doust e Lovett-Doust, 2001).

Em relação às pesquisas com microalgas, organismos base de cadeias alimentares nos ecossistemas aquáticos e, por isso, importantes no monitoramento ambiental, desde os anos 90 vêm sendo conduzidos estudos que utilizam biomarcadores para detectar a presença de substâncias químicas em quantidades ínfimas utilizando, para isso, estruturas algais como cloroplastos e tilacóides isolados (Purcell *et al.*, 1990; Ernst *et al.*, 1994; Laberge *et al.*, 1999; Giardi *et al.*, 2001). O acompanhamento da funcionalidade do aparato fotossintético, juntamente com os processos enzimáticos, síntese de metabólitos secundários, estresse oxidativo e/ou mecanismos de detoxificação são atualmente os principais biomarcadores utilizados em vegetais aquáticos (Ferrat *et al.*, 2003).

1.2.3. A máxima performance fotossintética do fotossistema II como ferramenta de avaliação do estado fisiológico de organismos fotossintetizantes

A fotossíntese é um processo de fundamental importância pois é a principal via de entrada de material orgânico novo em muitos ecossistemas (Margalef, 1989), sendo desenvolvida por algas, vegetais superiores e algumas bactérias, tipicamente classificados como organismos produtores primários (Lee, 1999). O processo fotossintético ocorre a nível celular em organelas especializadas denominadas cloroplastos onde ocorrem a captação da energia luminosa e as reações responsáveis pela sua transformação em energia química utilizável pelo organismo (Lee, 1999).

Essas reações ocorrem em centros de reação associados com complexos de pigmentos conjugados com proteínas especializadas na captação da luz e macromoléculas especializadas no transporte de elétrons. O processo fotossintético é tipicamente dividido em duas partes, as reações da fase clara e as reações da fase escura. Em uma das reações da fase clara o hidrogênio é carregado da molécula de água, por uma série de transportadores de elétrons, até o NADP formando NADPH_2 , enquanto que na outra reação, há a liberação de oxigênio das moléculas de água. O conjunto de macromoléculas especializadas no transporte de elétrons associadas com a redução do NADP, é designado como fotossistema II (FSII), enquanto que o fotossistema I (FSI) corresponde ao conjunto de transportadores de elétrons associado com a liberação do oxigênio da água. Juntamente com o transporte de elétrons há a formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. O NADPH_2 formado

na fase clara é usado para reduzir o CO₂ ao nível de carboidrato (reações da fase escura) através da energia suprida pela quebra do ATP também produzido na fase clara (Kirk, 1994).

Em estudos fisiológicos de organismos fotossintetizantes, algumas técnicas disponíveis permitem avaliar o processo fotossintético, reposta do organismo que se relaciona com seu estado de saúde. Avanços na tecnologia de fluorescência da clorofila *a* permitem acessar rapidamente a máxima performance fotossintética do fotossistema II (Fv/Fm), que tem sido utilizada como um indicador do estado fisiológico de organismos fotossintetizantes (Waring *et al.*, 2006; Rennenberg *et al.*, 2006; Mobin e Khan, 2006; Marchand *et al.*, 2006; Slama *et al.*, 2007). O acompanhamento da Fv/Fm vem sendo considerado fundamental para o diagnóstico precoce da influência dos fatores ambientais sobre o fitoplâncton. Alguns dos trabalhos pioneiros nesta área explicam detalhadamente essa metodologia, verificando a influência dos nutrientes na Fv/Fm desses organismos (Vincent, 1980; Parkhill *et al.*, 2001; Warner e Madden, 2006). Outros trabalhos enfocam o comportamento desse parâmetro no fitoplâncton exposto à radiações UV (Okada *et al.*, 1976; Vass *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2006).

1.2.4. A Fv/Fm como biomarcador de exposição e efeito

Sabe-se que algumas macromoléculas do fotossistema II (FSII) ligam-se a alguns grupos de pesticidas, metais tóxicos e outras substâncias químicas que interferem na sua atividade. Utilizando o FSII como biomarcador é possível testar a inibição da reação de Hill e mudanças na fluorescência da clorofila *a* em células vegetais submetidas às mais diversas condições (Giardi *et al.*, 2001).

A Fv/Fm vem sendo utilizada como biomarcador na área da ecotoxicologia, pois é sensível ao efeito ocasionado por diversas substâncias tóxicas (Thompson, 1997; Karavaev *et al.*, 1998; Lovett-Doust e Lovett-Doust, 2001; Schreiber *et al.*, 2002). Foi demonstrada a sensibilidade deste parâmetro fisiológico em resposta a várias substâncias tóxicas como pesticidas (Haynes *et al.*, 2000; Ralph, 2000; Macinnis Ng e Ralph, 2003; Frankart *et al.*, 2003; Geoffroy *et al.*, 2004), metais tóxicos (Danilov e Ekelund, 2001; Giardi *et al.*, 2001;

Nikookar *et al.*, 2005), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Bennet *et al.*, 2000) e amostras de efluentes e sedimentos contaminados (Thompson, 1997).

1.2.4.1. Determinação da Fv/Fm

- Embasamento teórico

A obtenção da Fv/Fm está baseada na bioenergética do fotossistema II e na cinética de indução da fluorescência da clorofila *a* (efeito Kautsky) em uma amostra previamente adaptada ao escuro. Sabe-se que a energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila *a* passa por três processos: uma parte pode ser usada para a fotoquímica, o excesso de energia pode ser dissipado na forma de calor, ou pode ser re-emitido como fluorescência da clorofila *a*. Tais processos ocorrem em competição, de modo que o aumento na eficiência de um deles implica em uma perda de rendimento dos outros dois. Dessa forma, medindo-se a eficiência da fluorescência da clorofila *a* pode-se obter informações sobre as mudanças na eficiência fotoquímica e na dissipação pelo calor (Maxwell e Johnson, 2000).

A indução da fluorescência ou excitação da clorofila *a* pela luz é um processo que ocorre naturalmente durante a fase clara do processo fotossintético e foi observado pela primeira vez por Kautsky *et al.* (1960). Ao absorver a energia luminosa, as moléculas de clorofila *a* atingem um estado transitório de maior energia e repassam elétrons através da sequência de reações de oxi-redução do FSII em direção ao FSI, onde ocorre a conversão em energia fotoquímica. Após este nível máximo de fluorescência ser atingido, há um decaimento na fluorescência até esta atingir o nível basal, onde as moléculas de clorofila *a* estão menos energizadas e novamente aptas a absorver a energia luminosa. Este fenômeno é chamado de dissipação da energia de excitação e pode ser explicado de duas formas. Primeiramente, há um aumento na taxa em que os elétrons são transportados para fora do FSII, processo que está associado à ativação, mediada pela luz, de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono. Tal dissipação da fluorescência é chamada de extinção fotoquímica da energia de excitação (qP). Ao mesmo tempo há um aumento na eficiência em que a energia é convertida em calor. Este último processo é chamado de extinção não fotoquímica da energia de excitação (qN e NPQ) (Maxwell e Johnson, 2000; Müller *et al.*,

2001; Baker e Rosenqvist, 2004). As mudanças nestes dois processos se completam em aproximadamente 15 a 20 minutos até atingir um equilíbrio, embora este tempo possa variar entre as espécies (Johnson *et al.*, 1990).

A medição da F_v/F_m depende da medição dos níveis mínimo (com os centros de reação do FSII totalmente oxidados) e máximo (com os centros de reação do FSII totalmente saturados) de fluorescência da clorofila *a*. Para realizar a medição dos níveis mínimo e máximo da fluorescência é necessário que o FSII esteja momentaneamente fora de atividade, garantindo que toda a fluorescência remanescente da clorofila *a*, originária do processo fotossintético desenvolvido até então, tenha se dissipado (extinção fotoquímica e não fotoquímica) e que os centros de reação estejam totalmente oxidados, ou seja, com potencial de realizar a máxima fotoquímica. Daí a necessidade da adaptação da amostra ao escuro.

Após o período de adaptação ao escuro e com os centros de reação totalmente oxidados a maior parte da energia luminosa absorvida é utilizada para a fotoquímica, uma pequena parcela é emitida como fluorescência remanescente da clorofila *a* (fluorescência mínima) e outra pequena parcela é dissipada na forma de calor. Em seguida, é medida a fluorescência da clorofila *a* após a completa saturação dos centros de reação do FSII. Com isso, não ocorre o processo fotoquímico e, assumindo que a taxa de dissipação pelo calor permanece constante, toda a energia é emitida como fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* que não conseguem repassar a energia captada (fluorescência máxima) (Figura 02). A fluorescência variável (diferença entre a fluorescência mínima e máxima) é uma medida aproximada da quantidade de energia luminosa que foi absorvida pelo FSII e que seria utilizada no processo fotoquímico (Schreiber, 1997; Lazár, 1999; Lichtenthaler *et al.*, 2005).

A F_v/F_m indica a eficiência em que a energia luminosa, captada pelo complexo antena e pelas moléculas de clorofila *a* do centro de reação P_{680} , é encaminhada em direção ao restante do desenvolvimento do processo fotoquímico (Maxwell e Johnson, 2000; Schreiber *et al.*, 2002). De forma análoga à eficiência de uma máquina, a performance ou eficiência fotossintética é função da diferença entre o máximo (F_m) e o mínimo de energia (F_o) utilizada para realizar trabalho (Equação 1) (Schreiber, 1997 e Lichtenthaler *et al.*, 2005).

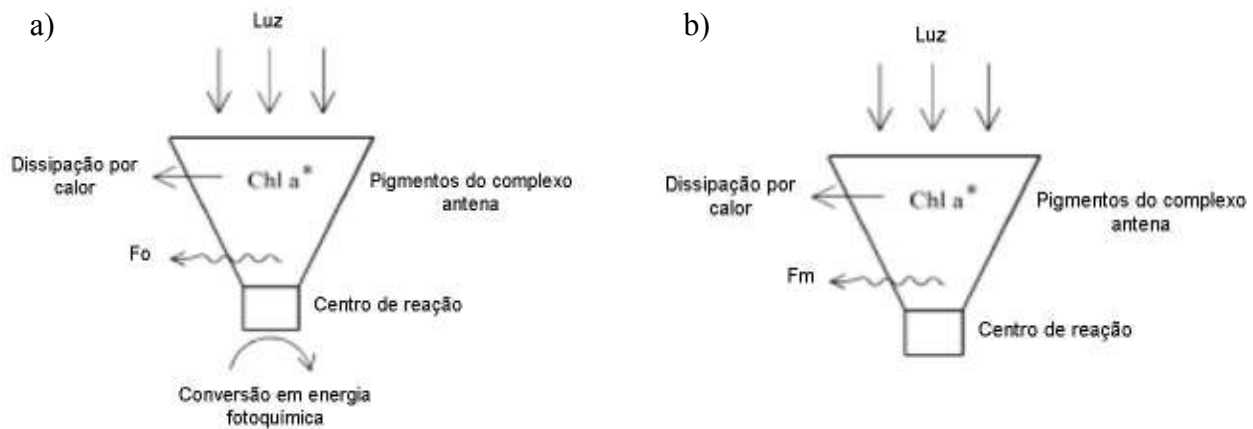


Figura 02 – Cinética de indução da fluorescência da clorofila *a* resultada das componentes da energia captada no FSII: fotoquímica, dissipação pelo calor e fluorescência. Com o FSII desbloqueado a energia captada pelo complexo antena é utilizada para a realização da fotoquímica e a fluorescência emitida pela clorofila *a* é mínima (F_o). Com o bloqueio do FSII não há a fotoquímica, as moléculas de clorofila *a* permanecem energizadas e emitem uma fluorescência máxima (F_m) (Schreiber, 1997).

$$\text{Equação 1: } \frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

Onde:

$$\frac{F_v}{F_m} = \text{performance fotossintética;}$$

F_m = fluorescência máxima medida com a indução do bloqueio do FSII;

F_o = fluorescência mínima medida com o FSII desbloqueado.

- Indução da fluorescência máxima da clorofila *a*

Originalmente as técnicas de medição da fluorescência variável da clorofila *a*, a partir da qual é obtida a F_v/F_m , foram desenvolvidas utilizando fluorímetros convencionais e a substância 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) para a indução da fluorescência máxima da clorofila *a*. O DCMU liga-se ao primeiro aceptor de elétrons do fotossistema II (Q_A), bloqueando o fluxo de elétrons através da seqüência de

transportadores, o que inibe totalmente o processo fotoquímico e causa a indução da fluorescência máxima da clorofila *a* (Hsu *et al.*, 1986).

A medição da Fv/Fm com o uso do DCMU, entretanto, é uma técnica invasiva, sendo necessário matar o fitoplâncton para se obter a medição da Fv/Fm. Outras desvantagens desta técnica são a necessidade de haver um período de adaptação dos organismos ao escuro, consumindo tempo experimental, e a necessidade dos experimentos serem conduzidos *in vitro* o que impossibilita que as medições sejam feitas diretamente no ambiente natural.

Recentemente, a medição da fluorescência variável da clorofila *a* é realizada usando-se fluorímetros de pulso de amplitude modulada (PAM fluorometer). É cada vez mais freqüente a aplicação dos “métodos de pulso de saturação” em estudos sobre a fisiologia de organismos fotossintetizantes (Oxborough e Baker, 1997; Schreiber *et al.*, 2002; Küsten e Altenburger, 2007; Tukaj *et al.*, 2007). Tais métodos permitem a determinação de diversos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, de forma rápida e não invasiva, os quais podem ser usados com sucesso para detectar alterações metabólicas em diversas espécies (Baker e Rosenqvist, 2004).

O fluorímetro PAM é atualmente utilizado em diversos estudos de monitoramento da produtividade primária em ecossistemas terrestres e aquáticos (Jakob *et al.*, 2005; Lugomela *et al.*, 2005; Maechetti *et al.*, 2006) e de algas nocivas (Schofield *et al.*, 1998; Evens *et al.*, 2001; Warner e Madden, 2006). Existem no mercado vários tipos de fluorímetros de pulso de amplitude modulada, para uso em diferentes tipos de estudo (Walz, 2006). Recentemente, desenvolveu-se um fluorímetro PAM para uso em bioensaios toxicológicos com limite de detecção, para compostos com toxicidade similar à do herbicida diuron (DCMU), menor do que $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Schreiber *et al.*, 2002).

O PAM é equipado com um sensor que capta a fluorescência da clorofila *a* e uma lâmpada que emite um forte pulso de luz que, de forma análoga ao DCMU, ocasiona o bloqueio do FSII. No momento do pulso de luz ocorre a total saturação dos transportadores de elétrons do FSII ocasionando o seu bloqueio e, conseqüentemente, impedindo a ocorrência do processo fotoquímico e induzindo a máxima fluorescência da clorofila *a* (Schreiber, 2002; Walz, 2006).

Uma das grandes vantagens do fluorímetro PAM em relação ao convencional, além da maior praticidade nas medições, é a possibilidade de se obter medições de fluorescência da clorofila *a* em amostras adaptadas a um estado predeterminado de luz. Com isto, é possível diferenciar entre os coeficientes de extinção fotoquímico (qP) e não fotoquímico (qN e NPQ) o que possibilita a determinação de outros parâmetros fluorimétricos de importante significado biológico como a performance fotossintética efetiva do FSII (F_v'/F_m'), a taxa de decréscimo na fluorescência da clorofila *a* (R_{Fd}), entre outros (Krause e Weis, 1991; Oxborough e Baker, 1997). Estes parâmetros são extensivamente utilizados de forma integrada em diversos estudos buscando um melhor entendimento da ação dos fatores ambientais sobre a fisiologia do FSII e a identificação dos parâmetros fluorimétricos de maior sensibilidade para cada situação (Lichtenthaler *et al.*, 2005).

Apesar das limitações inerentes a cada metodologia, ambas são consideradas eficientes para a medição da máxima performance fotossintética em experimentos de laboratório e há elevada correlação entre os resultados obtidos por qualquer uma delas (Parkhill *et al.*, 2001).

1.3. Utilização de organismos fitoplanctônicos na ecotoxicologia

A aplicação do fitoplâncton na ecotoxicologia e no monitoramento de ambientes aquáticos assume importância quando consideramos que tais organismos formam a base de cadeias alimentares e, portanto, assumem papel fundamental na manutenção do equilíbrio ecológico nesses ecossistemas. Devido ao seu ciclo reprodutivo curto, o fitoplâncton responde rapidamente às modificações ambientais. Assim, nos ensaios ecotoxicológicos é possível detectar o efeito tóxico rapidamente se comparado aos ensaios realizados com organismos de níveis tróficos superiores que geralmente respondem em uma escala de tempo maior (McCornick e Cairns, 1994). Além disso, os ensaios ecotoxicológicos com fitoplâncton são sensíveis e apresentam um custo relativamente baixo (Sosak-Swidarska *et al.*, 1998 *apud* Rioboo *et al.*, 2002). Através do monitoramento da poluição aquática utilizando o fitoplâncton pode-se prever um eventual efeito tóxico antes que este atinja os níveis tróficos superiores, e assim, rapidamente gerar medidas que possam minimizar eventuais danos.

A diatomácea marinha *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (1878) é uma espécie cosmopolita frequentemente encontrada em águas neríticas e lagoas costeiras. Dentre os organismos do fitoplâncton, é uma das espécies mais utilizadas em estudos científicos, na maricultura e na ecotoxicologia por sua relevância ecológica e facilidade com que é encontrada no ambiente natural e com que pode ser mantida em ambiente de laboratório.

A cepa de *S. costatum* utilizada neste trabalho tem mostrado boa sensibilidade a diversos contaminantes, como amostra de efluentes (Rorig et al., 2004), amostras de águas superficiais e sedimentos de ambientes poluídos (Macedo et al., 2005), pesticidas (Correia et al., 2005), além de diversas substâncias de referência utilizadas em experimentos padrões de ecotoxicologia (Cloutier-Mantha e Brown, 1980; Fisher e Frood, 1980; Walsh et al., 1988; Kusk e Nyholm, 1991).

1.4. Características da substância-teste

No Brasil, as áreas destinadas ao cultivo do arroz irrigado são geralmente baixas e alagadiças, circunvizinhas aos cursos de água, lagoas e estuários que, portanto, estão sujeitos à contaminação pelos pesticidas aplicados no cultivo. Considerando que os estuários são áreas com grande susceptibilidade à poluição, estudos sobre a ação das substâncias potencialmente tóxicas que ocorrem nestas áreas devem ser desenvolvidos tanto para a geração de conhecimentos de seus efeitos ambientais, como também para o estabelecimento das concentrações admissíveis destas substâncias no ambiente e como auxiliar na gestão do uso de ecossistemas costeiros.

Um dos defensivos agrícolas mais comumente utilizados no cultivo do arroz irrigado nas planícies costeiras do sul do Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, é o herbicida bentazon (EMBRAPA, 2004). O seu uso é regulamentado em diversos países da Europa, na Austrália, Canadá, Índia, Filipinas, Nova Zelândia, Tanzânia, África do Sul e no Brasil. Na Noruega o seu uso é severamente restrito desde 1998. Em diversos países da África e nos Estados Unidos o herbicida bentazon não é registrado para uso (Pesticide Action Network, 2006).

O herbicida bentazon ($C_{10}H_{12}N_2O_3S$), conhecido comercialmente como Basagran 600, é um composto sintético, comercializado em uma solução com concentração de 600 g.L⁻¹, apresenta pressão de vapor de $5,4 \cdot 10^{-6}$ Pa a 20°C, solubilidade maior do que 1000

g.L⁻¹ na água, coeficiente de partição octanol/água ($\log P_{OW} = -0,46$ em pH 7,0) e constante de dissociação ($Pk_a = 3,28$ a 26°C) (Montgomery, 1993; FAO, 1999).

O uso do bentazon é caracterizado principalmente por aplicação em pós emergência, via pulverização sobre a lavoura (BASF, 2006). Seu modo de ação dá-se sobre o fotossistema II (FSII) impossibilitando a realização da fotossíntese pelo vegetal. O herbicida compete com a quinona B (Q_B) pelo sítio de ligação no complexo da plastoquinona impedindo o fluxo de elétrons proveniente da quinona A (Q_A) inibindo a sua reoxidação (Mine e Matsunaka, 1975; Nimbal *et al.*, 1996).

Além do bloqueio do FSII, o herbicida bentazon mata as células vegetais por desencadear efeitos secundários em diversas vias metabólicas. Com o bloqueio do FSII, há um aumento no coeficiente de extinção não fotoquímico da energia de excitação que chega ao FSII (qN e NPQ) e a formação moléculas de clorofila em seus estados energizados (*Cl^a e *Cl^b), bem como a formação de radicais superóxido (¹O₂) (Schödel *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001; Asada, 2006). Tanto as moléculas de clorofila *a* excitadas como os radicais superóxido causam dano oxidativo às proteínas e membranas do cloroplasto, podendo levar à morte da célula (Demmig *et al.*, 1987; Porra *et al.*, 1997). Também vêm sendo reportados outros efeitos inerentes à exposição ao herbicida bentazon como inibição de outros processos fisiológicos como as sínteses de RNA, proteínas e lipídios (Al-Mendoufi e Ashton, 1984; Han e Wang, 2002).

O bentazon é classificado pela portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como um produto perigoso ao ambiente (classe toxicológica III) com alto potencial de deslocamento nos solos e é altamente persistente. Uma pesquisa realizada na França confirmou o alto potencial de deslocamento do composto em diferentes tipos de solo. O estudo revelou que de 0,11 a 2,40% da quantidade total de bentazon aplicada no campo é perdida por drenagem, resultado que os autores atribuíram ao baixo coeficiente de adsorção do herbicida (Dousett *et al.*, 2004). Um outro estudo conduzido no vale do Rio Sacramento, no sudoeste dos Estados Unidos, mostrou a alta persistência do composto em águas subterrâneas. Mesmo passados alguns anos após a proibição do uso do bentazon na Califórnia, seus resíduos foram encontrados em 71% de amostras de água subterrânea em níveis que variaram de 0,01 a 20 µg.L⁻¹ (California Environmental Protection Agency, 1999; Dawson, 1997), o que demonstra e confirma sua persistência ambiental.

As informações quanto à degradação do bentazon no ambiente natural são poucas e controversas. Alguns estudos afirmam que o herbicida aparenta ser estável em águas superficiais, não sofrendo hidrólise (Villars e Delvigne, 2001 *apud*. Bol *et al.*,1992). Entretanto, parece apresentar rápida fotodegradação com meia-vida de menos de 24 horas (U.S. Environmental Protection Agency, 1985).

A maioria das informações disponíveis sobre o comportamento do bentazon no ambiente e nos sistemas biológicos, refere-se a estudos conduzidos nos Estados Unidos e Europa. Não foram encontradas informações sobre a ocorrência do bentazon em águas brasileiras e seus efeitos toxicológicos sobre organismos nativos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Neste trabalho foi avaliado o efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento e a máxima performance fotossintética do fotossistema II da diatomácea nerítica *Skeletonema costatum*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Foi testado o efeito do herbicida bentazon sobre a biomassa de uma cultura de *S. costatum* mantida em laboratório, através do ensaio padrão de inibição de crescimento algal.

2.2.2. Foi verificado o efeito do herbicida bentazon sobre a máxima performance fotossintética do fotossistema II da microalga medindo-se a fluorescência variável da clorofila *a* em experimentos de indução da fluorescência da clorofila *a* através de métodos invasivos (em fluorímetro convencional) e não invasivos (em fluorímetro de pulso de amplitude modulada).

2.2.3. Foram determinados os parâmetros tipicamente adotados em ecotoxicologia aquática para fazer uma abordagem sobre a toxicidade do herbicida e comparar os resultados obtidos com resultados reportados na literatura sobre o efeito toxicológico desse e de outros herbicidas.

2.2.4. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram comparados quanto à sua sensibilidade, tempo de execução e aplicabilidade em bioensaios toxicológicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manutenção da cepa de *Skeletonema costatum*

A cepa de *S. costatum* foi isolada em fevereiro de 2003 a partir de águas superficiais da praia da Armação do Itapocoroy, município de Penha, no litoral centro-norte de Santa Catarina, Brasil. Desde então é mantida no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Vale do Itajaí em cultivo unialgal em frascos erlenmeyer sob condições controladas (luminosidade de $80 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$).

As culturas foram mantidas em meio F/2 (Guillard e Ryther, 1962; Guillard, 1975) tendo como base água do mar natural filtrada em filtros de fibra de vidro com $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro (Whatman GF/F, Alemanha) e salinidade ajustada para 31. Esta água foi esterilizada em autoclave (121°C por 20 minutos), após a qual foram adicionados os macronutrientes, micronutrientes e vitaminas. A cultura estoque foi mantida em fase de crescimento exponencial através de repiques a cada 7 dias, feitos sob fluxo de ar estéril em cabine de fluxo laminar. Todo o material e vidraria que fossem entrar em contato com a microalga, eram previamente esterilizados.

3.2. Realização dos experimentos

Foram feitos três tipos de experimentos, um para a determinação do efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento e outros dois para a determinação do seu efeito sobre a máxima performance fotossintética do FSII (Fv/Fm) da diatomácea *Skeletonema costatum*.

O efeito sobre o crescimento da microalga foi medido através de ensaio padrão de inibição do crescimento algal no qual foi feito o acompanhamento da biomassa algal através da quantificação da concentração de clorofila-*a* (via fluorescência) e determinação da densidade celular (contagem ao microscópio óptico).

O efeito sobre a Fv/Fm foi medido via fluorescência variável da clorofila-*a*. Diferentemente da fluorescência da clorofila-*a* medida no ensaio de inibição de crescimento algal, nesse caso mede-se a fluorescência mínima e máxima da clorofila-*a*

quando os contros de reação do FSII das células fitoplanctônicas estão totalmente oxidados e totalmente reduzidos, respectivamente. A relação entre as fluorescências medidas é um indicador da máxima eficiência do aparato fotossintético, refletindo o estado fisiológico do organismo.

3.2.1. Ensaio de inibição do crescimento algal (ISO, 1989)

3.2.1.1. Preparação do experimento

Os experimentos foram feitos em frascos erlenmeyer de borosilicato, com capacidade para 250 mL, com 150 mL de volume final de meio nutritivo ao qual foi acrescida a substância-teste e o inóculo algal. As concentrações da substância-teste às quais às células foram expostas foram definidas a partir do valor de CE_{50} (10 mg.L^{-1}) para o efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento de *S. costatum* (EPA, 2000).

A partir da solução original de bentazon (600 g.L^{-1}) foi feita uma solução de 100 mL na concentração de $6,75 \text{ g.L}^{-1}$. Esta foi diluída progressivamente (fator de diluição 0,5), em diferentes frascos, até a concentração de $0,11 \text{ g.L}^{-1}$. Um volume de 1,0 mL de cada diluição foi transferido para os frascos erlenmeyer contendo o meio de cultivo. Assim, as concentrações finais do herbicida bentazon utilizadas nos bioensaios foram 0,70, 1,41, 2,81, 5,62, 11,25, 22,50, 45,00 e $90,00 \text{ mg L}^{-1}$. Os frascos controle continham apenas meio de cultivo, sem a adição da substância-teste. Cada tratamento com o herbicida foi feito com três réplicas, enquanto que quatro réplicas foram feitas para o controle.

Os bioensaios foram inoculados com 1,0 mL de cultura de *S. costatum* em crescimento exponencial. O inóculo foi adicionado em cada frasco apenas no momento da leitura inicial de fluorescência, procedimento adotado para minimizar o efeito de aumento progressivo na fluorescência que ocorre com a adição da substância-teste (efeito de indução da fluorescência da clorofila-*a*). Foram feitas as leituras iniciais de biomassa algal e então os frascos foram incubados sob agitação constante (790 rpm) e nas mesmas condições em que a alga era mantida no laboratório. As leituras subseqüentes de biomassa foram feitas 06, 12, 24, 48 e 72 horas após o contato da alga com o herbicida.

No início e no final do tempo de exposição quantificou-se o pH de cada frasco. O monitoramento do pH é necessário pois as variações neste parâmetro podem acarretar em alterações tanto na especiação da substância-teste, como também em processos de superfície em microalgas, e.g., adsorção e carga superficial (Sterling *et al.*, 1990).

3.2.1.2. Efeito sobre o crescimento da microalga

A biomassa algal foi estimada via fluorescência da clorofila-*a* e através de estimativa da densidade celular. A fluorescência da clorofila-*a* é diretamente relacionada com a concentração de clorofila-*a* na amostra, que por sua vez tem relação direta com a biomassa algal (Parsons *et al.*, 1989; Littlepage, 1998). No momento da leitura de fluorescência, cada frasco foi levemente agitado para homogeneização da cultura. Uma amostra de 4,0 mL foi transferida para uma tubo de ensaio de 1,0 cm de diâmetro, e a fluorescência da clorofila-*a in vivo* foi quantificada em um fluorímetro Turner Designs TD-700 equipado com filtro de excitação de 460 nm e filtro de emissão de 670 nm (Figura 01) (Turner Designs, 1997; Littlepage, 1998).

Para verificar possíveis interferências na fluorescência medida, que pode ser causada por fluorescência inerente à substância-teste ou à alguma partícula presente no meio de cultivo (fluorescência de fundo), foi feita uma correção considerando esta fluorescência de fundo. Para a obtenção deste valor, as medições foram repetidas após a remoção das células algais através da filtração das amostras em filtro Millipore (diâmetro de poro 0,2 µm). Assim, os valores de fluorescência da clorofila-*a* de cada réplica foram corrigidos subtraindo-se os valores de fluorescência de fundo.

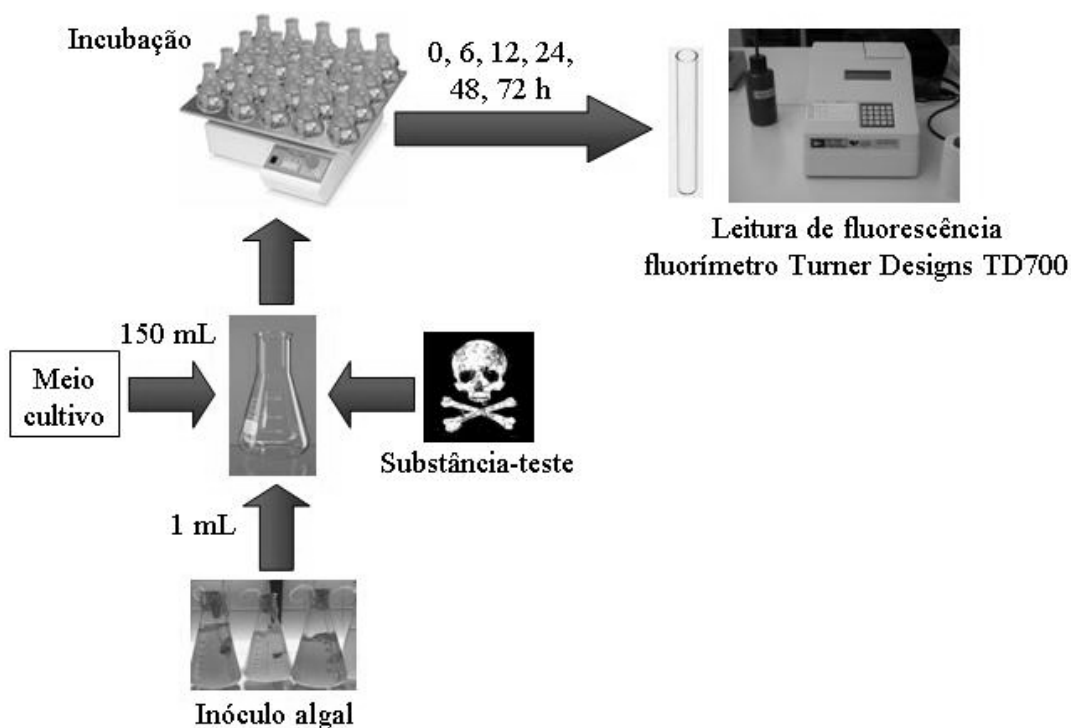


Figura 01 – Procedimentos realizados no ensaio de inibição de crescimento algal.

A densidade celular foi determinada através de contagem das células em uma câmara de contagem (Sedgewick-Rafter S50, Inglaterra) conforme recomendações da APHA (1966). Para tanto retirou-se uma amostra da cultura homogeneizada (5,0 mL) que foi fixada com lugol para posterior contagem de células.

Com os dados de densidade celular e fluorescência da clorofila-*a* em cada tempo experimental, a taxa de crescimento (Equação 2) e o percentual de inibição do crescimento algal (Equação 3) foram calculados. Este último é uma medida do quanto a taxa de crescimento da microalga é inibida nos diferentes tratamentos em relação à taxa de crescimento obtida no controle (ISO, 1989).

$$\text{Equação 2: } \mu = \frac{\ln N_n - \ln N_o}{tn}$$

Onde:

μ = taxa de crescimento celular;

N_o = leitura da densidade celular ou fluorescência inicial;

N_n = leitura da densidade celular ou fluorescência no tempo n;

tn = tempo decorrido desde a leitura inicial.

$$\text{Equação 3: } I\mu_i = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

Onde:

$I\mu_i$ = percentual de inibição para o teste na concentração i;

μ_c = taxa de crescimento média no controle;

μ_i = taxa de crescimento média para o teste na concentração i.

Com os dados de taxas de crescimento celular e percentuais de inibição de crescimento algal foram determinados os parâmetros ecotoxicológicos CENO, CEO e CE₅₀.

3.2.2. Experimento para determinação da Fv/Fm

3.2.2.1. Indução da fluorescência máxima com o DCMU:

- Preparação do experimento

A obtenção da Fv/Fm através da metodologia de indução da Fm com o DCMU seguiu os procedimentos descritos em Thompson (1997) e Parkhill *et al.* (2001). Os bioensaios foram preparados de acordo com o descrito em *Ensaio de inibição de crescimento algal* (ISO, 1989) neste trabalho. A única diferença foi relativa à concentração do herbicida bentazon, cuja concentração máxima utilizada para os experimentos de indução da fluorescência máxima com o DCMU foi de 45,00 mg.L⁻¹.

No momento da medição foi retirado de cada réplica dos bioensaios um volume de 20 mL. Destes, duas alíquotas de 4,0 mL foram transferidas para “vials” com capacidade de 10 mL. O restante foi filtrado em filtro Millex (diâmetro de poro de 0,2 µm), para quantificar a fluorescência de fundo. Do filtrado, duas alíquotas de 4,0 mL foram transferidas para “vials” iguais aos mencionados anteriormente. As amostras, filtradas e não filtradas (com células algais), foram utilizadas para a medição das fluorescências mínima (Fo), máxima (Fm), mínima da amostra filtrada (Fof) e máxima da amostra filtrada (Fmf).

Os “vials” foram deixados em adaptação ao escuro por um período de 40 minutos, para que ocorresse a total extinção da energia de excitação das moléculas de clorofila-*a* e a máxima abertura dos centros de reação do FSII. Considerando que o tempo entre a primeira e a última medição foi de 55 minutos, os tempos de adaptação ao escuro mínimo e máximo foram de 40 minutos e 95 minutos, respectivamente. Todos os procedimentos, incluindo as medições, foram feitos em ambiente escuro.

- Medição da fluorescência variável da clorofila-*a* e determinação da Fv/Fm

Primeiramente foram feitas as leituras de Fo para as amostras com células algais e amostras filtradas. A amostra adaptada ao escuro e previamente homogeneizada no “vial” foi transferida para um tubo de ensaio de 1,0 cm de diâmetro e levada para medição no fluorímetro Turner Designs TD-700. Em seguida procedeu-se à quantificação da fluorescência máxima (Fm). Nesta, a amostra era previamente homogeneizada no “vial” e

transferida para um tubo de ensaio contendo 25 μL de DCMU (diluído em etanol), na concentração final de $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, e levada para medição no fluorímetro. Para cada réplica foram feitas cinco medições de fluorescência. Para garantir resultados sem interferências entre as amostras, um novo tubo de ensaio era utilizado para cada tipo de fluorescência medida (Figura 03). Entre cada medição da F_0 , o tubo de ensaio era lavado com água destilada. Os tubos de ensaio utilizados para a medição da F_m eram lavados com etanol 96% para eliminar o DCMU e enxaguados três vezes com água destilada. Antes do início das medições e entre as medições de cada fluorescência, o fluorímetro era calibrado com um branco constituído de água MilliQ.

A F_v/F_m foi calculada substituindo-se os valores de F_0 e F_m na equação 1, apresentada em *Determinação da F_v/F_m (item 1.3.2.1.)*.

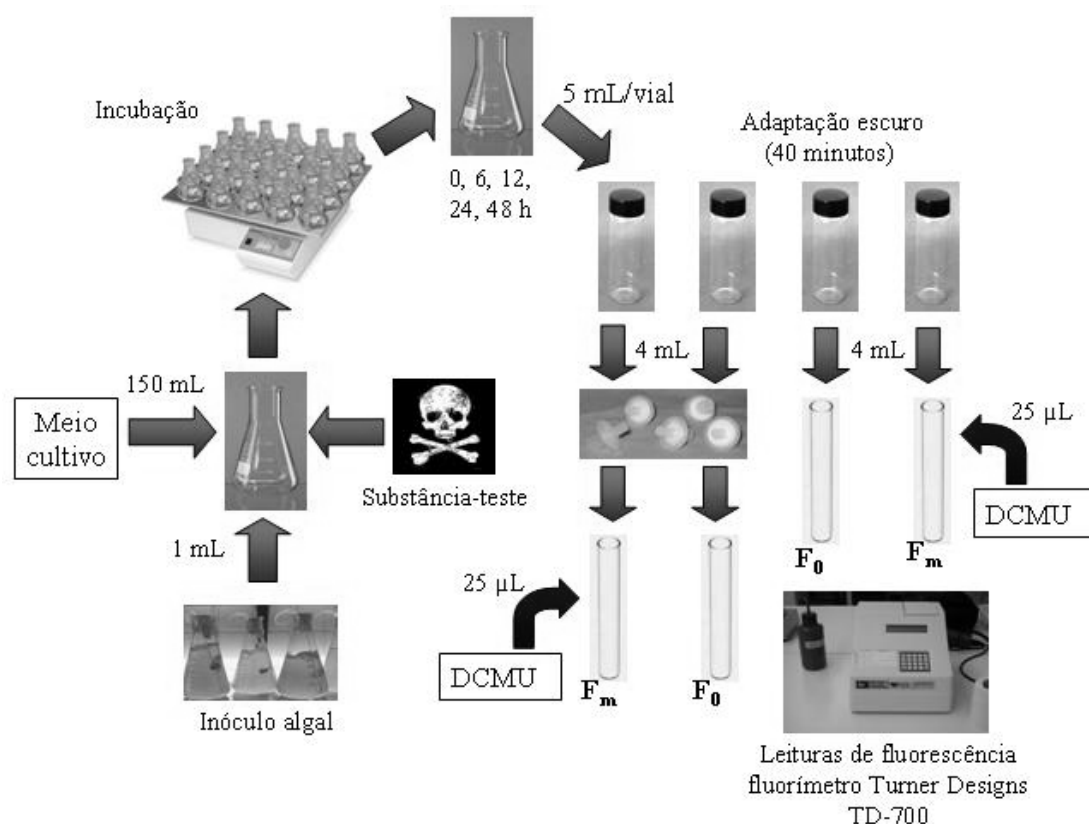


Figura 03 – Procedimentos feitos para a medição da F_v/F_m , utilizando a metodologia de indução da fluorescência máxima com o DCMU (fluorímetro convencional).

3.2.2.2. Fv/Fm através da indução da Fm com o PAM

- Preparação do experimento

Este experimento seguiu o procedimento descrito em Schreiber (1997) e Parkhill *et al.*, (2001). Os bioensaios foram realizados de acordo com o descrito em *Ensaio de inibição de crescimento algal* (ISO, 1989) neste trabalho. Os frascos foram incubados por 48 horas, sob agitação constante (790 rpm) e nas mesmas condições em que a alga foi mantida no laboratório. Após inoculada a microalga, a cultura foi levada para incubação na ausência da substância teste, que foi adicionada somente 48 horas depois. Este procedimento foi necessário para que, logo na primeira medição, houvesse quantidade suficiente de células algais para gerar um sinal de fluorescência da clorofila-*a* detectável pelo equipamento.

Neste experimento as concentrações de exposição ao herbicida bentazon foram a CENO, CEO e CE₅₀ determinadas no ensaio de inibição de crescimento algal. Os tratamentos foram feitos adicionando-se 1,0 mL por frasco de uma solução de bentazon nas concentrações de 11,25 (CENO), 22,50 (CEO) e 24,00 mg L⁻¹ (CE₅₀), sempre utilizando três réplicas para cada tratamento. Para o controle foram utilizadas quatro réplicas e não foi adicionado o contaminante.

Foi utilizado um fluorímetro de pulso de amplitude modulada PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Alemanha) para obter as medições de fluorescência variável. Este fluorímetro é específico para realizar medições de parâmetros fluorimétricos em macroalgas e plantas superiores, sendo necessária, no caso de microalgas, uma amostra com elevada densidade celular para que seja detectado o sinal de fluorescência da clorofila-*a*. A sensibilidade necessária para fazer as medições neste experimento foi obtida concentrando-se as células fitoplanctônicas intactas em um filtro de fibra de vidro e então as medições foram feitas diretamente sobre as células coletadas no filtro (Geoffroy *et al.*, 2004).

As medições foram feitas antes (0 hora), no momento da adição da substância-teste (0,03 horas), e nos tempos de 01, 03, 05, 10 e 24 horas de exposição. No momento da medição, uma amostra de 5,0 mL de cada frasco foi cuidadosamente filtrada em um filtro de fibra de vidro de 25 mm de diâmetro com tamanho de poro de 0,45 µm acoplado a uma seringa. Após a filtração, os filtros foram imersos em uma fina película de meio de cultivo para evitar a dessecação das células e mantidos no escuro por 40 minutos.

- Medição da fluorescência variável da clorofila-*a* e determinação da Fv/Fm

Após o período de adaptação ao escuro, foram feitas as medições de fluorescência. O sensor do equipamento foi posicionado próximo à superfície do filtro em uma inclinação de aproximadamente 45°. O aparelho mediu a F_0 da clorofila-*a* e poucos instantes depois, no momento do pulso de luz, a F_m . Neste experimento também foram feitas cinco medições de F_0 e cinco medições de F_m para cada réplica. Todos os dados de fluorescência e o valor calculado de Fv/Fm são visualizados instantaneamente através do programa computacional que acompanha o aparelho (Figura 04). O branco de procedimento constou de meio de cultura antes do ser inoculado com as células algais. Este foi filtrado em filtro de fibra de vidro de 25 mm de diâmetro com tamanho de poro de 0,45 μm acoplado a uma seringa e os filtros mantidos imersos em meio de cultivo. As medições foram feitas da mesma forma descrita acima.

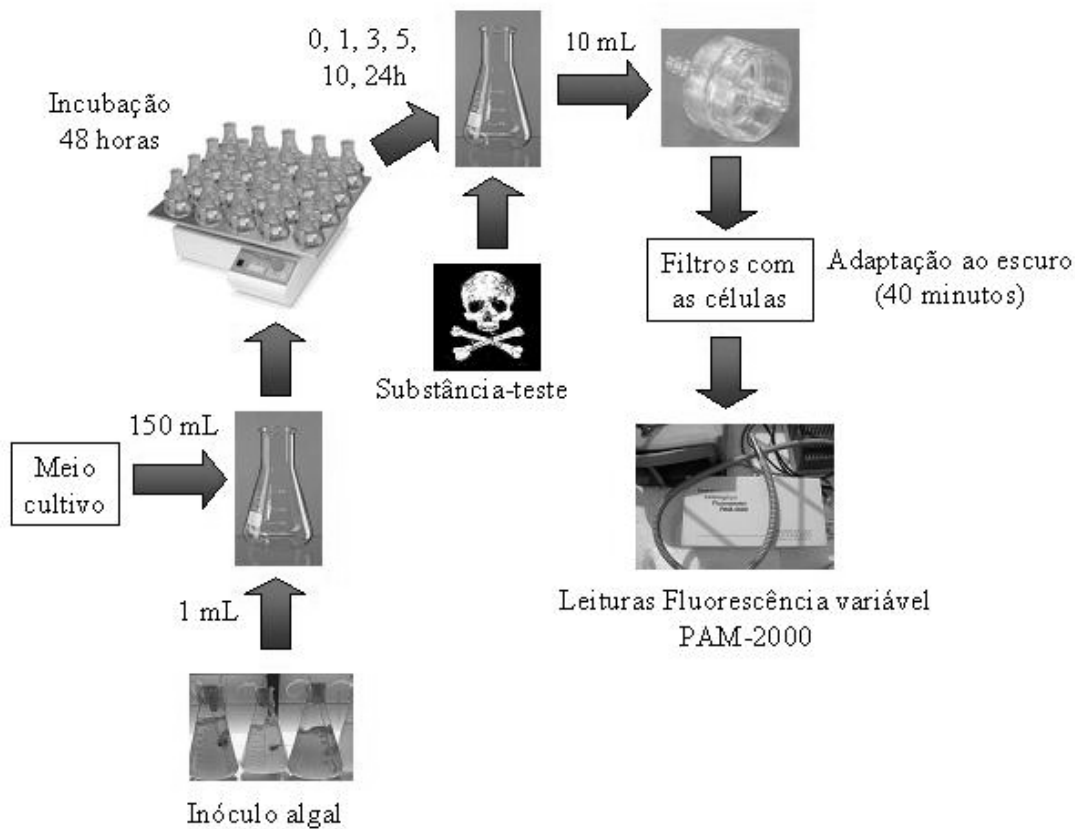


Figura 04 - Procedimentos feitos para a medição da Fv/Fm utilizando a metodologia de indução da fluorescência máxima com o fluorímetro de pulso de amplitude modulada (PAM-2000).

Os percentuais de inibição da F_v/F_m nos tratamentos em relação à F_v/F_m do controle foram calculados segundo a *Equação 4* a partir dos valores médios da F_v/F_m obtidos nos tratamentos e no controle.

$$\text{Equação 4: } I \frac{\overline{F_v}}{F_m} i = \frac{\overline{F_v}_c - \overline{F_v}_i}{\frac{\overline{F_v}_c}{F_m}}$$

Onde:

$I \frac{\overline{F_v}}{F_m} i$ = Percentual de inibição da máxima performance fotossintética do FSII na concentração i ;

$\frac{\overline{F_v}}{F_m} c$ = Média da máxima performance fotossintética do FSII no controle;

$\frac{\overline{F_v}}{F_m} i$ = Média da máxima performance fotossintética do FSII na concentração i .

3.3. Análise dos dados

3.3.1. Influência do pH na toxicidade:

Para verificar se as diferentes concentrações de bentazon provocaram alteração na concentração de íons hidrogênio, o que poderia interferir na toxicidade da substância-teste, o pH quantificado no final do tempo de exposição foi comparado com o pH inicial através do teste t de student.

3.3.2. Efeito sobre o crescimento da espécie:

O efeito tóxico é expresso por um aumento no percentual de inibição no crescimento algal conforme aumenta a concentração de exposição da substância-teste. Para verificar a ocorrência do efeito tóxico, foi feita análise de regressão linear entre o percentual de inibição de crescimento algal e a concentração da substância-teste (Zar, 2000;

Zagatto, 2006). Para atender às premissas da análise de regressão linear de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk), os dados de concentração da substância-teste passaram por transformação logarítmica.

Para a determinação da concentração efetiva mediana (CE_{50}) foram utilizados apenas os dados referentes aos tratamentos de 11,25, 22,50 e 45,00 mg L⁻¹, onde a relação entre concentração da substancia-teste e efeito observado foi linear. A partir da equação da reta obtida na análise de regressão linear foi calculada a concentração da substância-teste correspondente a um efeito de inibição de crescimento algal de 50% (Figura 05). Para determinar as concentrações onde foi observado efeito tóxico (CENO e CEO), foram comparadas as médias das taxas de crescimento da espécie obtidas nos diferentes tratamentos com a média das taxas de crescimento obtidas no controle utilizando análise de variância (ANOVA).

A equação da reta obtida na análise de regressão linear entre o percentual de inibição de crescimento algal e a concentração da substancia-teste, após transformação logarítmica é do tipo:

$$y = a + bx$$

Onde:
y = % Inibição de crescimento algal;
x = log concentração da substancia teste

$$\% \text{ Inibição de crescimento algal} = a + b (\log \text{ concentr. subst. teste})$$

Obtendo o valor de CE_{50} :

$$50 = a + b (\log \text{ concentr. subst. teste})$$
$$\log \text{ concentr. subst. teste} = \frac{50 - a}{b} \longrightarrow CE_{50} = 10^{\left(\frac{50 - a}{b}\right)}$$

Figura 05 – Cálculo da concentração efetiva mediana (CE_{50}) a partir da equação da reta obtida na análise de regressão linear entre o percentual de inibição de crescimento algal e a concentração da substância-teste.

3.3.3. Efeito sobre a Fv/Fm da microalga:

Foi feita uma análise de regressão linear entre a concentração da substância-teste e o percentual de inibição da Fv/Fm para verificar a ocorrência do efeito tóxico. Os valores de concentração de bentazon passaram por transformação logarítmica. A concentração efetiva mediana (CE_{50}) foi determinada da mesma forma como descrita no ítem 3.3.2. através da equação da reta obtida na análise de regressão linear entre a concentração da substância-teste e o percentual de inibição da Fv/Fm. Para verificar as concentrações de exposição onde foram observados efeitos tóxicos (CENO e CEO), foram comparadas as médias da Fv/Fm obtidas nos diferentes tratamentos com a média da Fv/Fm obtida no controle através de análise de variância (ANOVA).

4. RESULTADOS

4.1. Variação do pH durante os experimentos

Houve um aumento significativo do pH no controle e nas menores concentrações de exposição, até a concentração de $11,25 \text{ mg.L}^{-1}$, causado pelo crescimento da alga. A partir da concentração de $22,50 \text{ mg.L}^{-1}$, onde a alga não cresceu devido à toxicidade causada pela substância-teste, não foi detectada variação do pH final em relação ao pH inicial (Figura 06). Nos bioensaios realizados sem a presença do inóculo algal (brancos), o aumento da concentração da substância-teste não influenciou no pH ($r^2 = 0$; $F_{1,5} = 0$; $P > 0,05$).

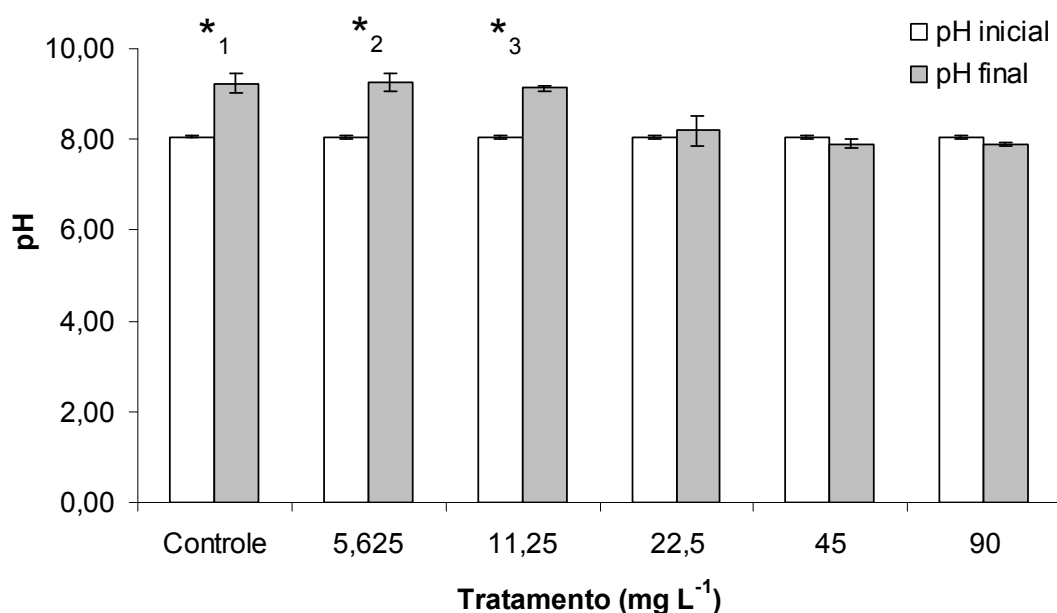


Figura 06 – Valores de pH inicial e pH final, durante o tempo experimental, nos tratamentos com o herbicida benzon. Os asteriscos assinalados com números indicam os tratamentos onde houve variação entre o pH medido no início do experimento, e em 72 horas de exposição, segundo o teste-t Student. *1 = ($t = 9,8$; $n = 6$; $P < 0,05$); *2 = ($t = 10,76$; $n = 6$; $P < 0,05$); *3 = ($t = 24,32$; $n = 6$; $P < 0,05$).

4.2. Efeito do herbicida bentazon no crescimento da microalga

O herbicida bentazon inibiu o crescimento da diatomácea *Skeletonema costatum*. O efeito de inibição do crescimento algal aumentou com o aumento da concentração da substância-teste. Os percentuais de inibição de crescimento algal (72 h de exposição), obtidos através das estimativas de biomassa algal via fluorescência da clorofila-*a* e através de determinação da densidade celular, coincidiram (Figura 07).

O efeito de diminuição na biomassa algal (medida via fluorescência da clorofila-*a*) foi detectado a partir das 24 horas de exposição nos tratamentos de 45,00 mg.L⁻¹ e 90,00 mg.L⁻¹ de bentazon, onde foram observadas inibições de 37,39 e 50,82% no crescimento algal, respectivamente. A concentração de efeito observado (CEO) foi de 45,00 mg.L⁻¹ enquanto que a concentração de efeito não observado (CENO) foi de 22,50 mg.L⁻¹ (Figura 08).

Em 72 horas de exposição, a concentração de 22,50 mg.L⁻¹ de bentazon (CEO) inibiu em 48,89% o crescimento algal, já a CENO foi de 11,25 mg.L⁻¹ (Figura 09). A concentração mais alta testada (90,00 mg.L⁻¹ de bentazon) ocasionou 100% de inibição no crescimento algal. A concentração que provocou 50% de inibição de crescimento algal em 72 h de exposição (CE_{50;72h}) foi de 24,00 mg.L⁻¹ (Figura 10). No monitoramento da biomassa algal através da densidade celular foram encontrados esses mesmos valores para os parâmetros ecotoxicológicos CENO, CEO e CE₅₀.

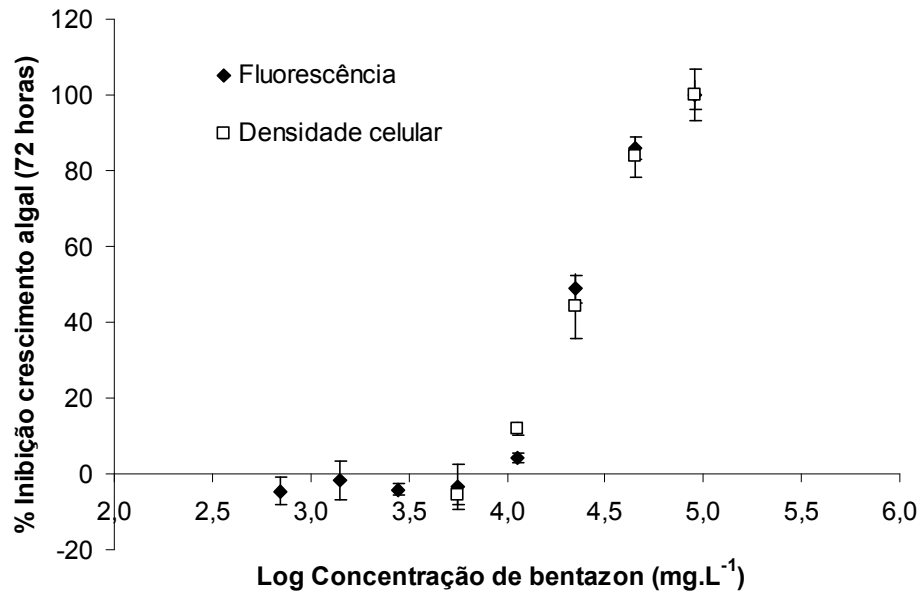


Figura 07 – Percentual de inibição do crescimento da diatomácea *Skeletonema costatum* (média \pm desvio padrão) em função da exposição ao herbicida bentazon, calculado através das estimativas de biomassa algal via fluorescência da clorofila-*a* e densidade celular, após 72 horas de exposição.

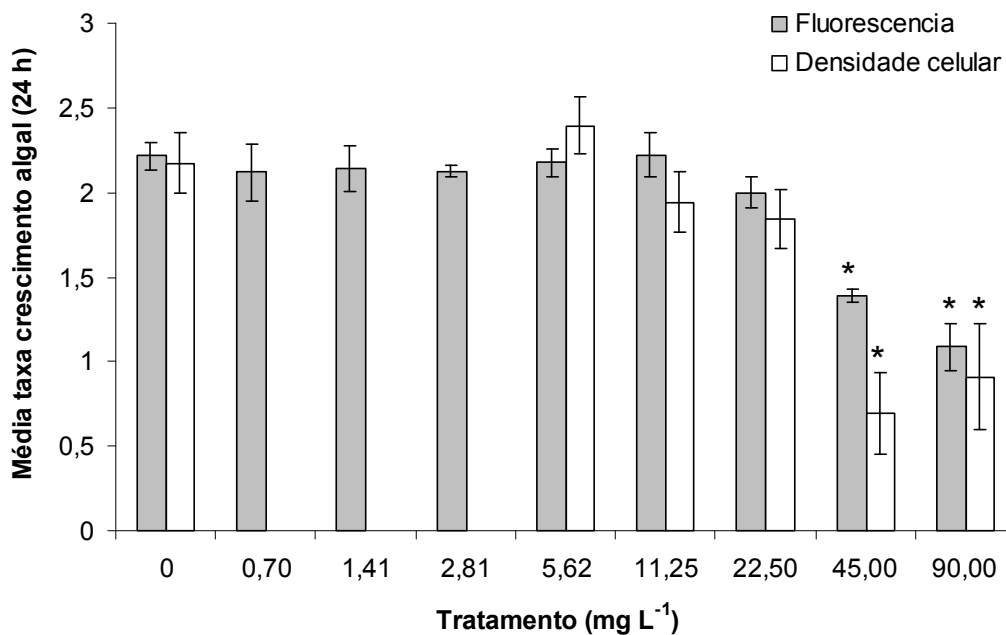


Figura 08 – Média da taxa de crescimento (24 horas) da diatomácea *S. costatum* nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon. (*) = tratamentos onde foi observado efeito tóxico conforme mostrado pelas análises de variância ($\alpha = 0,05$) aplicadas para taxas de crescimento médias obtidas através das medições de fluorescência da clorofila-*a* ($r^2 = 0,95$; $F_{27;8} = 44,31$; $P < 0,05$) e estimativa da densidade celular ($r^2 = 0,93$; $F_{5,17} = 46,2$; $P < 0,05$).

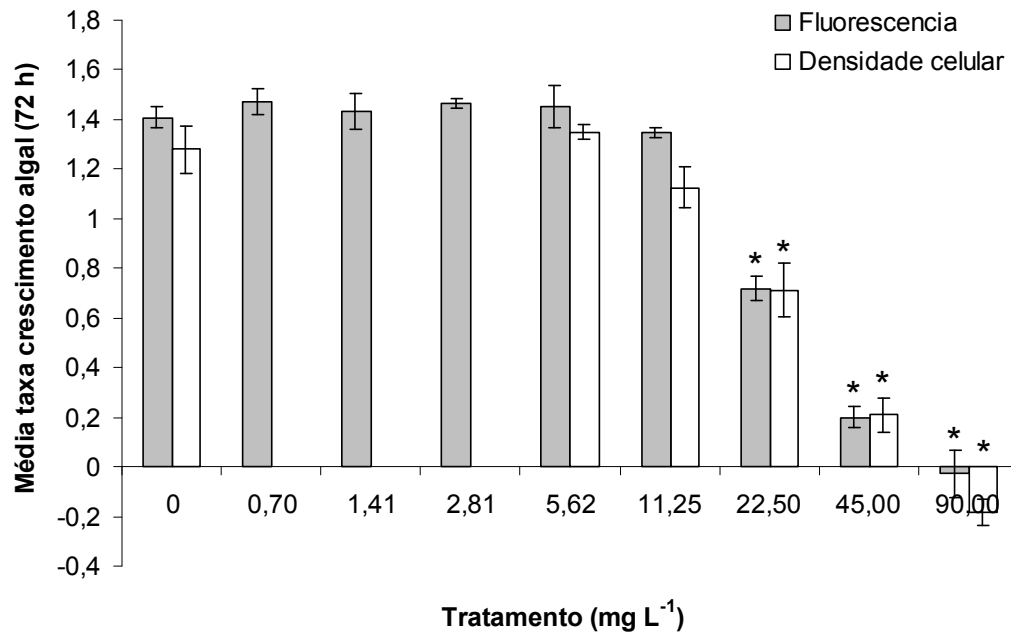


Figura 09 – Média da taxa de crescimento (72 horas) da diatomácea *S. costatum* nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon. (*) = tratamentos onde foi observado efeito tóxico conforme mostrado pelas análises de variância ($\alpha = 0,05$) aplicadas para taxas de crescimento médias obtidas através das medições de fluorescência da clorofila-*a* ($r^2 = 0,99$; $F_{8,27} = 322,74$; $P < 0,05$) e estimativa da densidade celular ($r^2 = 0,98$; $F_{5,17} = 232,78$; $P < 0,05$).

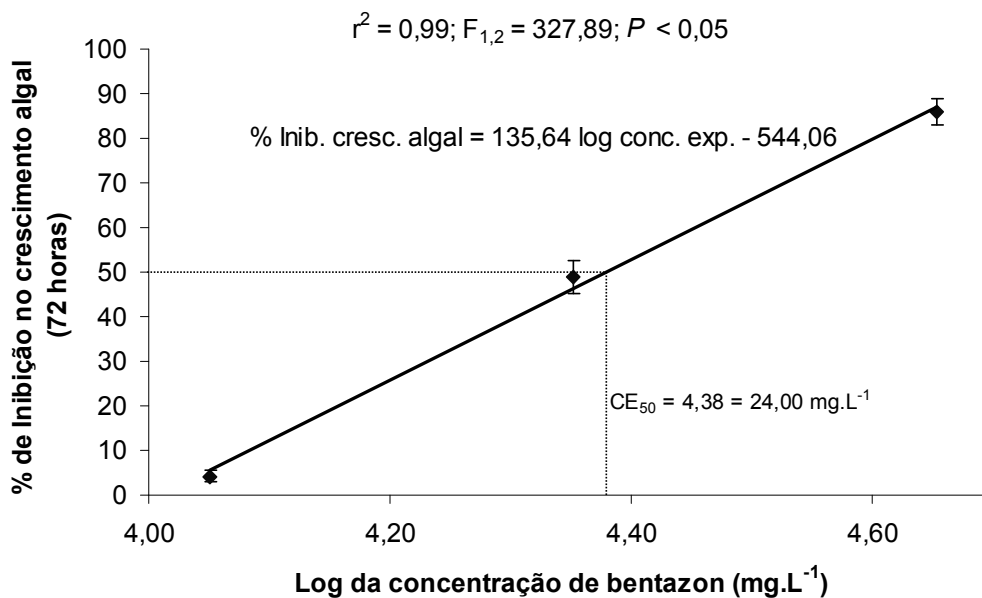


Figura 10 – Relação entre o log da concentração de bentazon e o percentual de inibição de crescimento algal (média \pm desvio padrão), obtido a partir dos dados de fluorescência da clorofila-*a*, nos tratamentos de 11,25; 22,50; 45,00 mg.L^{-1} de bentazon. A CE_{50} foi determinada através da equação da reta obtida na análise de regressão linear.

Os valores obtidos para a fluorescência de fundo (média \pm desvio padrão) foram de $0,48 \pm 0,20$ e $0,27 \pm 0,16$ unidades padrão de fluorescência (upf) no início e no final do experimento, respectivamente. Após correção, considerando a fluorescência de fundo, os valores de fluorescência da clorofila-*a* e, conseqüentemente, os percentuais de inibição de crescimento algal, praticamente não foram alterados (Tabela 01).

Tabela 01 – Valores de percentuais de inibição de crescimento algal (média \pm desvio padrão) corrigidos e não corrigidos pela fluorescência de fundo.

Tratamento (mg L⁻¹)	% Inibição corrigido	% Inibição não corrigido
Controle	0	0
5,63	$-1,32 \pm 0,26$	$-0,79 \pm 0,49$
11,25	$5,75 \pm 0,44$	$5,72 \pm 0,56$
22,50	$33,63 \pm 3,87$	$33,32 \pm 3,93$
45,00	$126,55 \pm 6,85$	$126,7 \pm 6,47$
90,00	$170,37 \pm 8,46$	$170,42 \pm 8,28$

Até a concentração de $11,25 \text{ mg.L}^{-1}$, após 48 horas de exposição, houve um aumento nos valores de fluorescência da clorofila-*a*, que atingiram níveis superiores aos medidos no controle. Nas concentrações de exposição superiores, os valores de fluorescência foram, em alguns casos mais baixos e, em outros, semelhantes aos obtidos no controle (Figura 11). A partir de 24 horas de experimento, houve um decréscimo na fluorescência nas concentrações de exposição mais altas. No tempo de exposição de 06 horas foi observado um incremento na média dos valores de fluorescência que, na concentração mais alta testada, atingiu 10 upf a mais do que àquela do controle. As fluorescências iniciais (0 horas de exposição) em todos os tratamentos foram semelhantes às obtidas no controle (Figura 12).

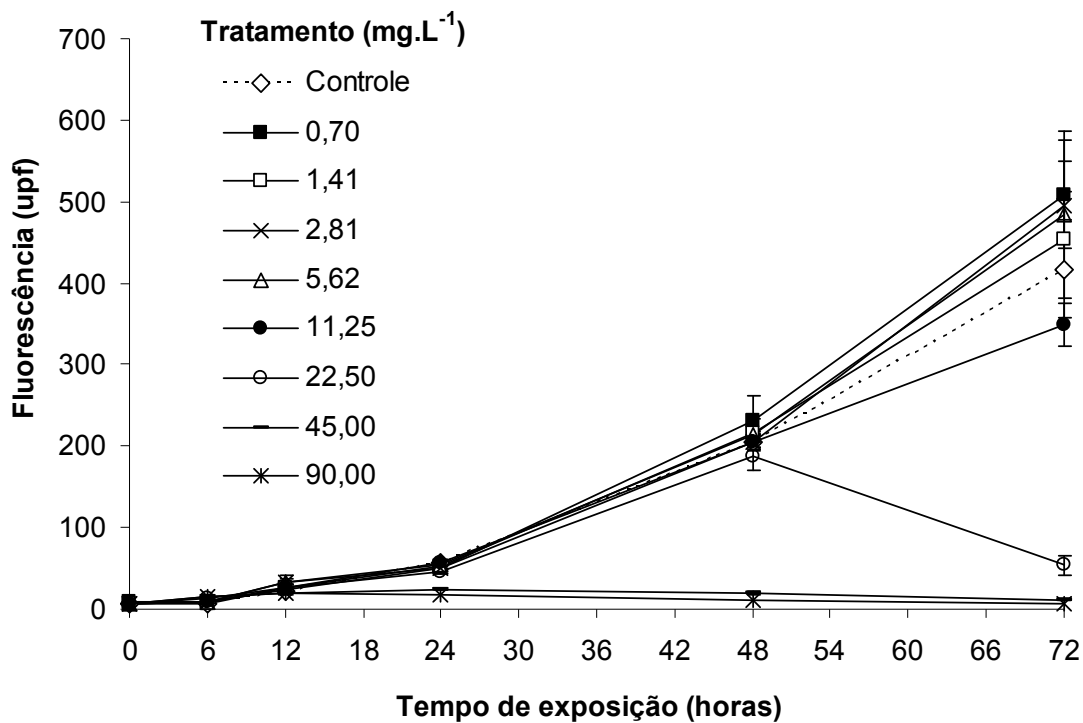


Figura 11 – Fluorescência da clorofila-*a* (média ± desvio padrão) durante o tempo experimental em cada tratamento com o herbicida bentazon. Controle em linha tracejada e tratamentos em linha contínua.

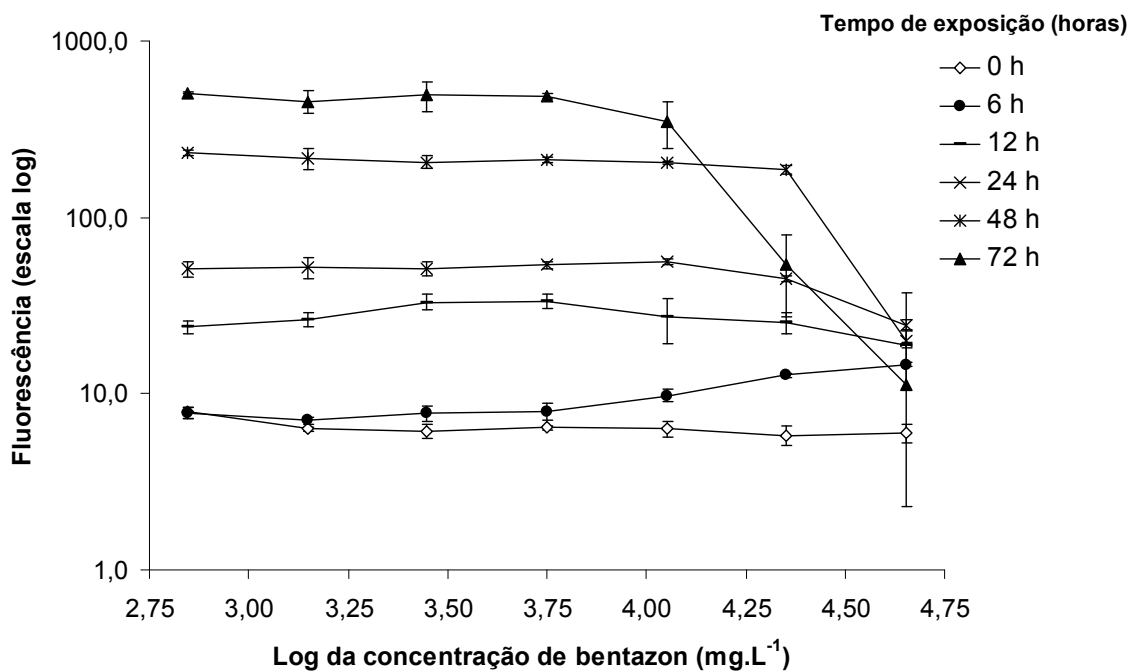


Figura 12 – Fluorescência da clorofila-*a* (média ± desvio padrão), em escala logarítmica, nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon em cada tempo de exposição.

4.2. Efeito do bentazon na máxima performance fotossintética do FSII da microalga

4.2.1. Indução da máxima fluorescência da clorofila-*a* com o DCMU

O comportamento da máxima performance fotossintética do FSII (Fv/Fm) em função da concentração do herbicida bentazon é mostrado na Figura 13. Observa-se que o aumento da concentração do herbicida bentazon inibiu a Fv/Fm da diatomácea *Skeletonema costatum*. A figura 14 mostra a Fv/Fm da microalga exposta aos tratamentos do herbicida, em função do tempo experimental. A Fv/Fm da microalga, foi afetada logo no momento da adição do bentazon. Os resultados mostraram que, apesar da Fv/Fm diminuir com o aumento da concentração do agente tóxico, seu comportamento foi semelhante considerando o tempo de exposição.

Após 48 horas de exposição, a Fv/Fm obtida no controle (média \pm desvio padrão) foi de $0,63 \pm 0,08$. A menor concentração testada ($0,70 \text{ mg.L}^{-1}$) causou uma inibição de aproximadamente 5% na Fv/Fm média, que foi de $0,60 \pm 0,07$. A maior inibição da Fv/Fm (75,11%) foi obtida na concentração de $45,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de bentazon. A concentração do herbicida que gerou 50% de inibição na Fv/Fm média (CE₅₀), após 48 horas de exposição, foi de $12,80 \text{ mg.L}^{-1}$. As concentrações de efeito não observado (CENO) e de efeito observado (CEO) foram de $1,41$ e $2,81 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente (Figura 15).

Nas concentrações mais baixas de bentazon, o percentual de inibição da Fv/Fm foi maior no momento da adição do bentazon e diminuiu com o aumento do tempo de exposição. Na concentração mais baixa testada ($0,70 \text{ mg.L}^{-1}$), por exemplo, o percentual de inibição da Fv/Fm atingiu 14% no momento da adição do bentazon e 0,26% em 48 horas de exposição.

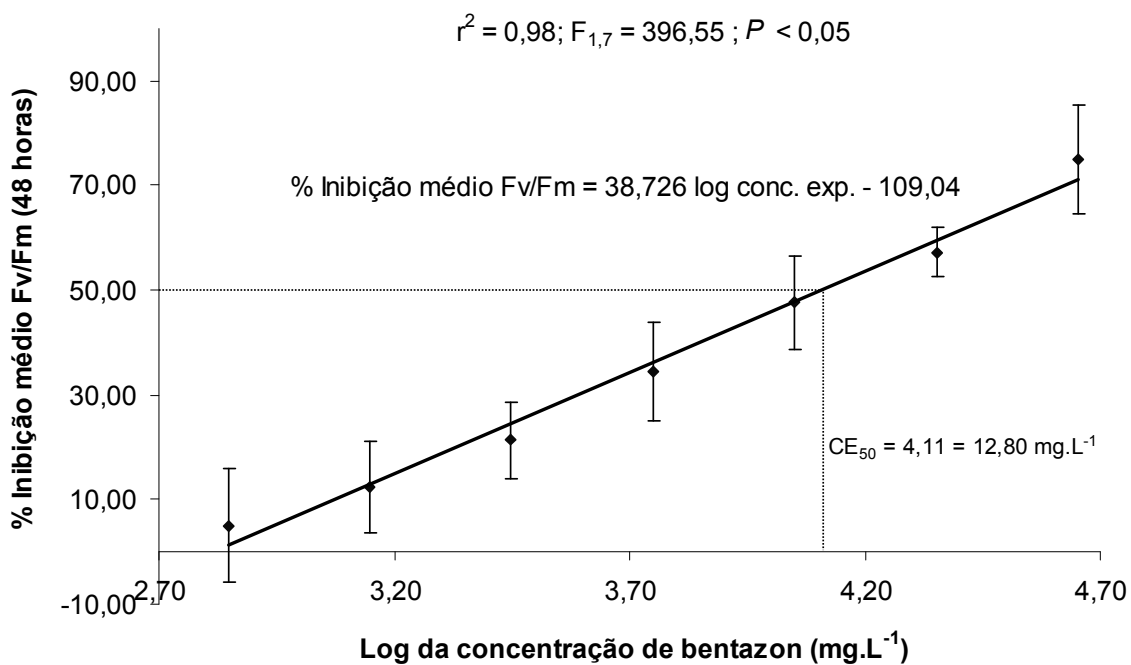


Figura 13 – Percentual de inibição da Fv/Fm (média \pm desvio padrão) de *S. costatum* em função da concentração do herbicida bentazon no experimento de indução da fluorescência máxima com o DCMU.

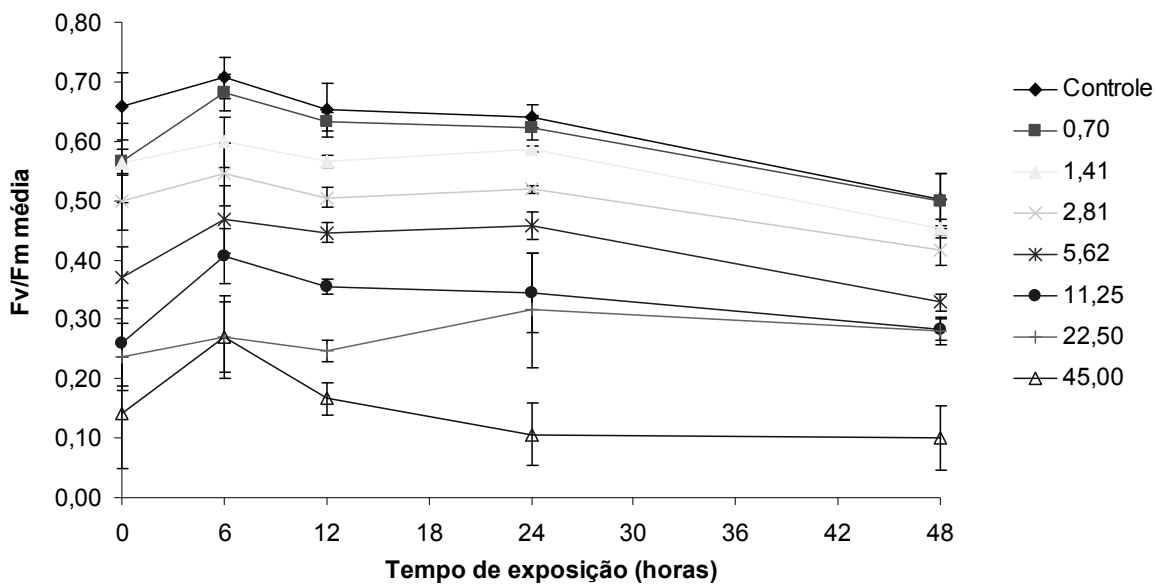


Figura 14 – Média da Fv/Fm (média \pm desvio padrão) de *S. costatum* nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon durante o experimento de indução da fluorescência máxima com o DCMU.

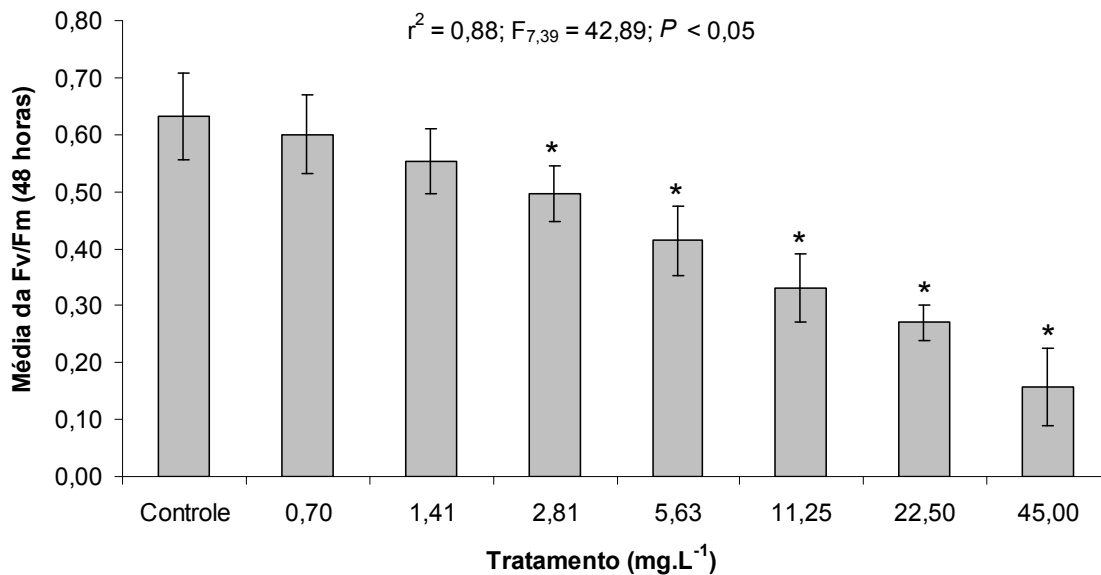


Figura 15 – Valores médios de Fv/Fm da diatomácea *S. costatum* exposta a diferentes concentrações do herbicida bentazon durante 48 horas, no experimento com o DCMU. (*) = tratamentos onde, através da análise de variância (ANOVA), o efeito observado foi significativamente diferente do obtido no controle para $\alpha = 0,05$.

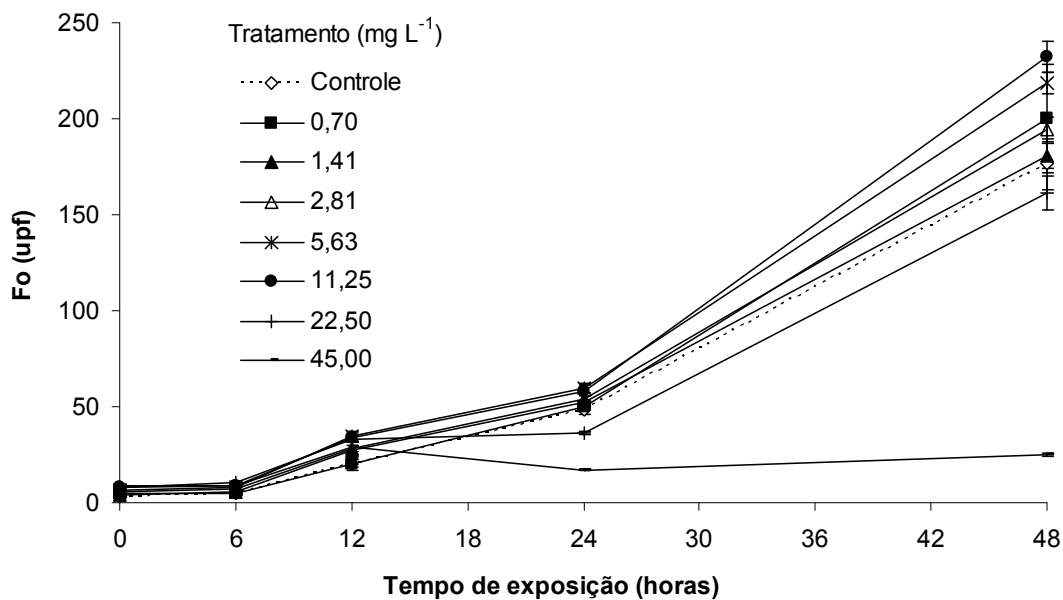
Houve um aumento nas médias da Fo e Fm conforme aumentou o tempo de exposição exceto nos tratamentos de 22,50 e 45,00 mg.L⁻¹ onde estas permaneceram praticamente estáveis. A partir da concentração de 2,81 mg.L⁻¹ observou-se uma diminuição da distância entre as curvas de Fo e Fm e uma consequente diminuição na Fv/Fm. No tratamento de 45,00 mg.L⁻¹ as médias da Fo e Fm quase coincidiram e a Fv/Fm permaneceu em níveis baixos durante todo o tempo de exposição (Figura 16).

A Fo foi maior no início do tempo de exposição e nas concentrações de bentazon mais baixas, quando não houve efeito sobre a biomassa algal, e diminuiu nas maiores concentrações onde a biomassa algal diminuiu. Já a Fm diminuiu com o aumento da concentração de bentazon. A média da Fm apresentou um padrão de variação semelhante ao da Fo, considerando o tempo experimental, e manteve-se sempre em níveis mais altos (Figura 17). A sequência de leituras de Fo e Fm (média ao longo do tempo em cada tratamento) estiveram fortemente correlacionadas ($r = 0,97$; $n = 40$, $P < 0,05$).

Os valores de fluorescência de fundo, ou seja, fluorescência mínima da amostra filtrada (Fof) e fluorescência máxima da amostra filtrada (Fmf), nos diferentes tratamentos,

foram baixos. O valor de Fof (média \pm desvio padrão) foi de $0,94 \pm 0,16$ upf, que representou 1,7% da média da Fo, e o valor de Fmf foi de $0,86 \pm 0,17$ upf, representando 0,9% da média de Fm.

a)



b)

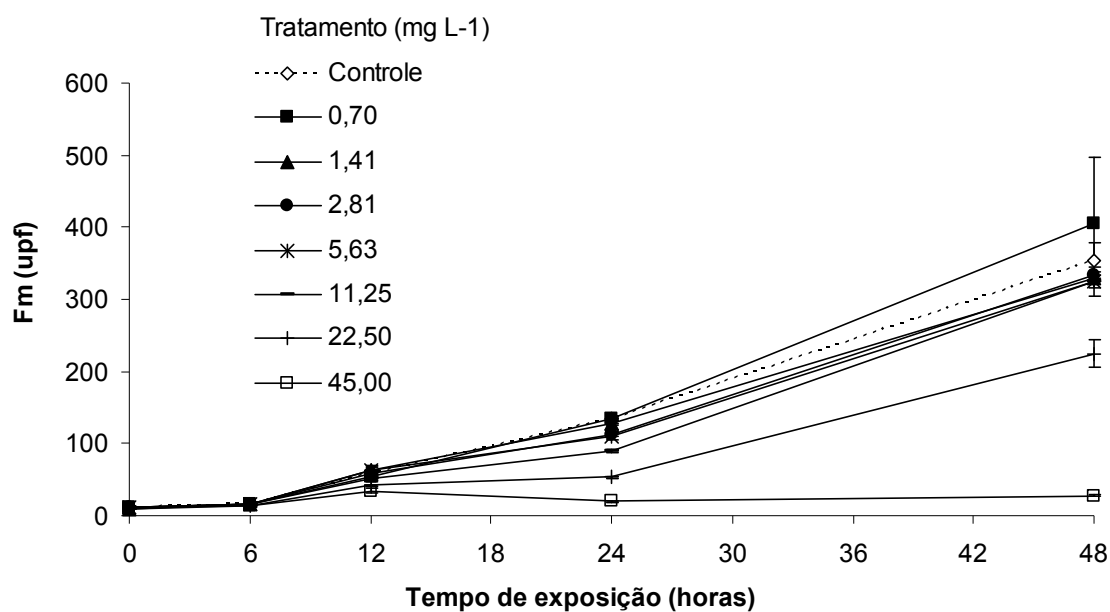
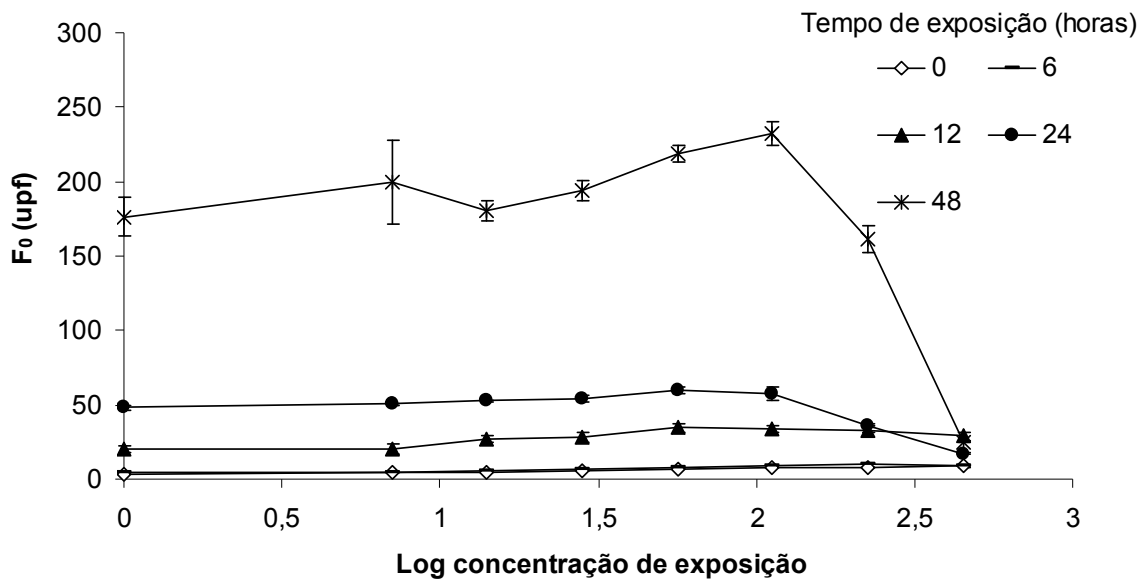


Figura 16 – Média dos valores de Fo (a) e Fm (b) para *S. costatum* durante o tempo de exposição, em cada tratamento com o herbicida bentazon.

a)



b)

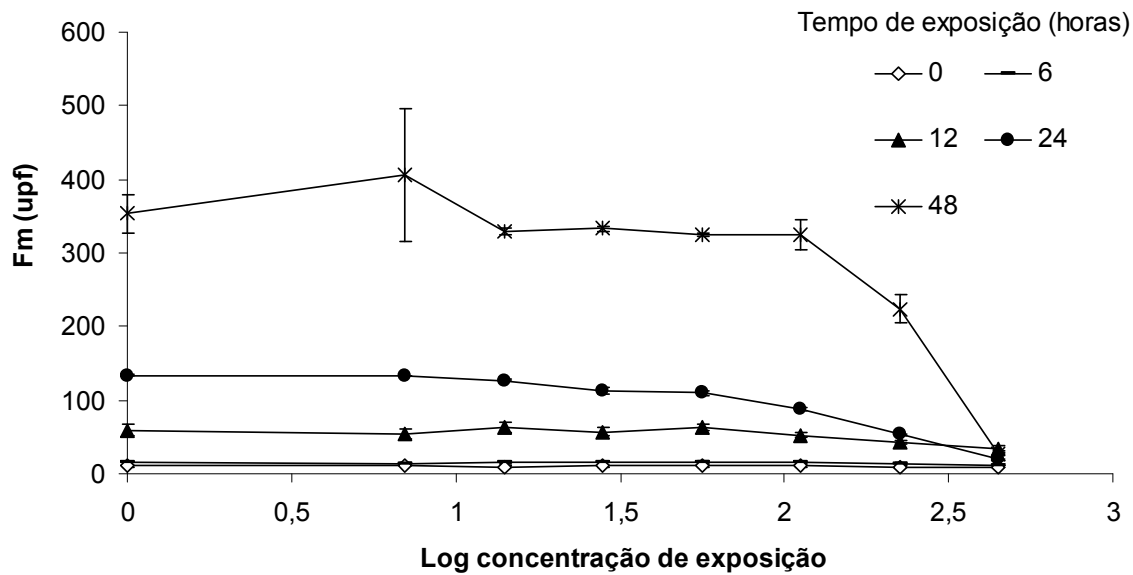


Figura 17 – Média das leituras de Fo (a) e Fm (b) nos tratamentos com o herbicida bentazon, em cada tempo de exposição.

4.2.2. Indução da fluorescência da clorofila-*a* com o fluorímetro de pulso de amplitude modulada PAM-2000

Como foi observado no experimento com o DCMU, houve uma inibição na Fv/Fm da diatomácea *S. costatum* com o aumento da concentração da substância-teste (Figura 18). A Fv/Fm apresentou um padrão de variação semelhante ao longo do experimento em todos os tratamentos. Antes da adição do herbicida bentazon (0 horas), a Fv/Fm (média \pm desvio padrão) nos tratamentos e no controle foi de $0,46 \pm 0,04$. No momento da adição do bentazon (0,03 horas), a Fv/Fm caiu abruptamente em todos os tratamentos (Figura 19).

A Fv/Fm média ao longo do experimento nos tratamentos foi pelo menos duas vezes menor que a obtida no controle. Foram observadas inibições de 47%, 64,7 % e 69,5% na Fv/Fm da microalga, nos tratamentos de 11,25; 22,50 e 24,00 mg.L⁻¹ de bentazon, que correspondem, respectivamente, à CENO, CEO e CE₅₀ determinadas no ensaio de inibição de crescimento algal. A CE₅₀ obtida neste experimento foi de 12,53 mg.L⁻¹. Não foi possível calcular os parâmetros ecotoxicológicos CENO e CEO, pois a menor concentração testada já ocasionou uma diminuição significativa na Fv/Fm da diatomácea *S. costatum*.

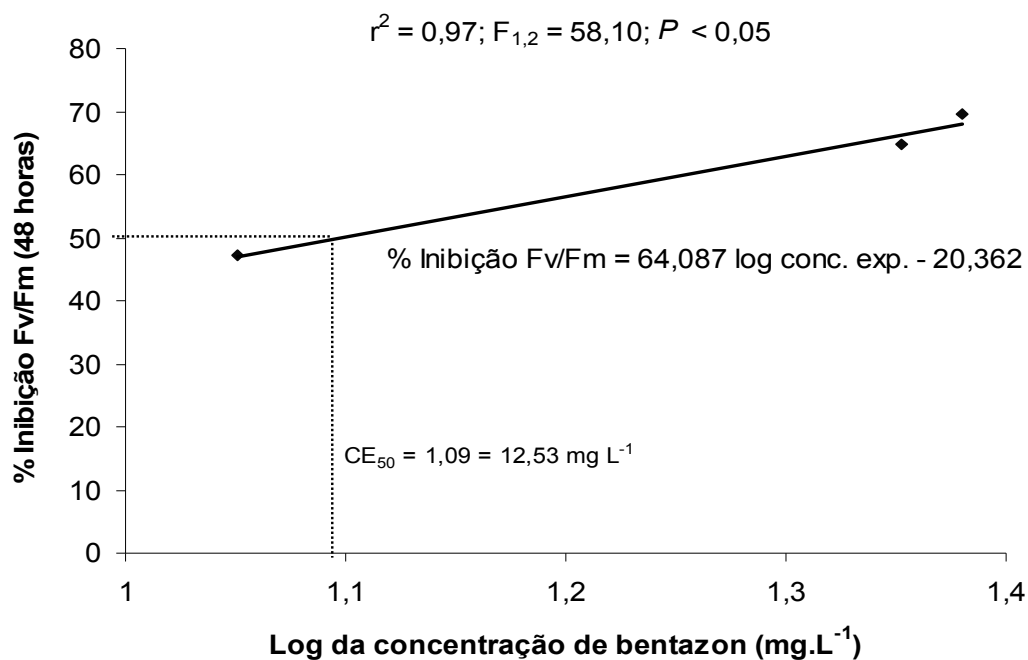


Figura 18 - Percentual de inibição da Fv/Fm de *S. costatum* em relação ao controle, nos tratamentos com o herbicida bentazon (experimento de indução da fluorescência máxima com o PAM).

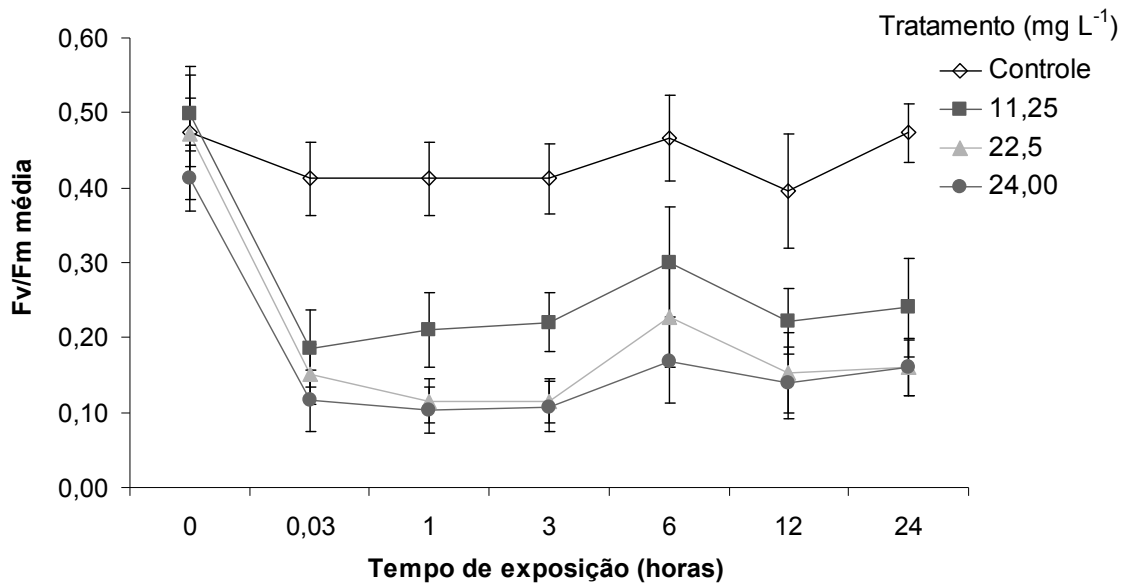


Figura 19 - Média da performance fotossintética (Fv/Fm) de *S. costatum* nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon no experimento de indução da fluorescência máxima com o PAM.

Diferentemente do que foi observado no experimento com o DCMU, não houve variação nos valores de F_o e F_m com o aumento do tempo de exposição. Também não houve variação da F_o com o aumento da concentração de bentazon. Todavia, os valores de F_m diminuíram com o aumento da concentração de exposição (Figuras 20 e 21).

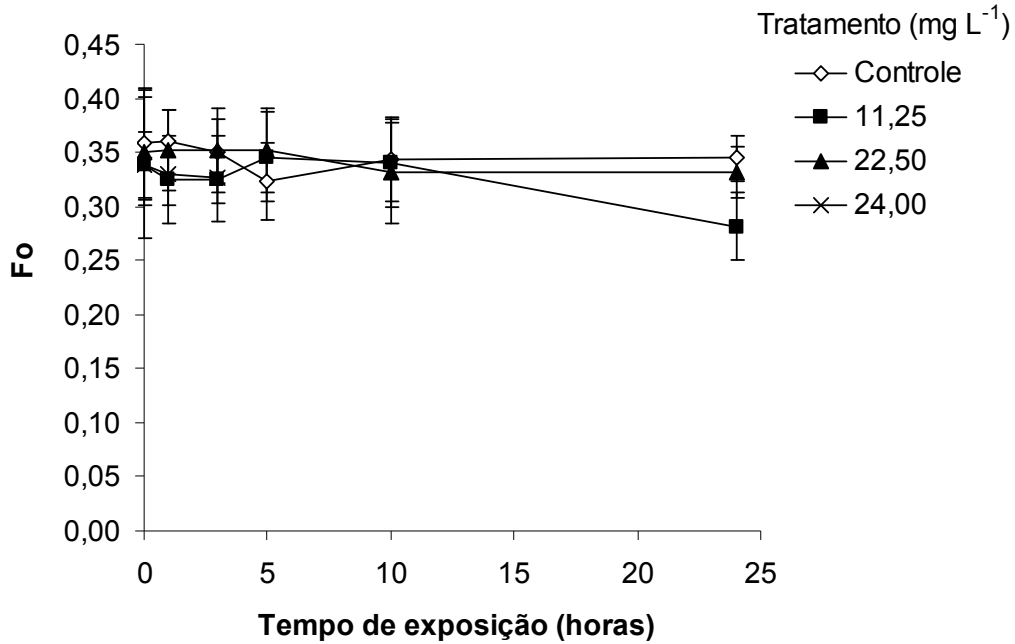


Figura 20 – Fluorescência mínima (Fo) ao longo do tempo de exposição nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon.

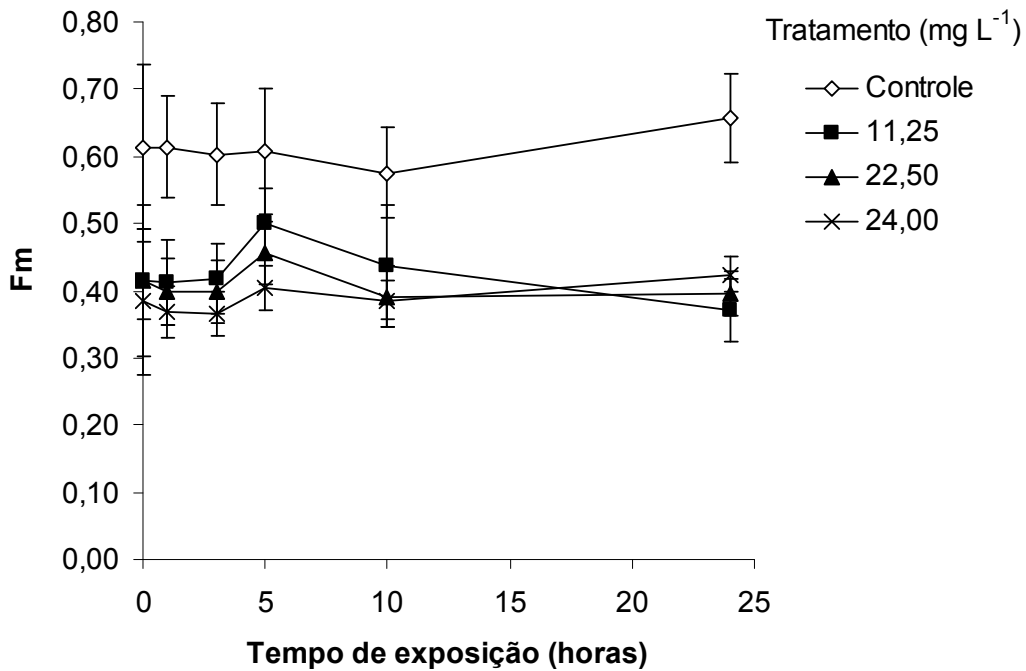


Figura 21 – Fluorescência máxima (Fm) ao longo do tempo de exposição nos diferentes tratamentos com o herbicida bentazon.

Os valores da Fv/Fm no experimento com o PAM foram, em média, 1,54 vezes menores do que os obtidos no experimento com o DCMU. Entretanto, os percentuais de inibição da Fv/Fm e o valor calculado de CE₅₀ obtidos através de ambas as metodologias foram semelhantes (Tabela 02).

Tabela 02 – Valores de percentual de inibição da Fv/Fm e concentração efetiva mediana (CE₅₀) do herbicida bentazon sobre a diatomácea *S. costatum* nos experimentos de indução da fluorescência da clorofila-*a* com o PAM e com o DCMU.

Tratamento (mg.L⁻¹)	% Inibição da Fv/Fm	
	PAM	DCMU
11,25	47,14	47,71
22,50	64,7	57,28
24,00	69,55	67,77
CE₅₀ (mg.L⁻¹)	12,53	12,79

A concentração de 11,25 mg.L⁻¹ de bentazon, não apresentou efeito detectável no ensaio de inibição de crescimento algal. Entretanto, esta mesma concentração ocasionou um comprometimento do estado fisiológico da espécie causando uma inibição de aproximadamente 47% na Fv/Fm. A concentração de 24,00 mg.L⁻¹ de bentazon, CE₅₀ determinada através do ensaio de inibição de crescimento algal, corresponderam a uma inibição de 60,59% e 69,50% na Fv/Fm nos experimentos com o DCMU e com o PAM, respectivamente. Os valores de CE₅₀ obtidos no experimento de medição da Fv/Fm com o DCMU (12,79 mg.L⁻¹) e com o PAM (12,53 mg.L⁻¹) corresponderam a aproximadamente 50% da CE₅₀ obtida no ensaio padrão de inibição de crescimento algal (Tabela 03).

Tabela 03 – Valores de concentração de efeito não observado (CENO), concentração de efeito observado (CEO), concentração efetiva mediana (CE₅₀) e os percentuais de inibição correspondentes (em negrito), no ensaio de inibição de crescimento algal, experimento de avaliação da performance fotossintética utilizando o DCMU e experimento de avaliação da performance fotossintética utilizando o PAM.

	Tratamento (mg L ⁻¹)		
	CENO	CEO	CE ₅₀
Ensaio de inibição de crescimento algal	11,25	22,5	23,97
	4,15	48,89	50,00
Avaliação da performance fotossintética (DCMU)	1,41	2,81	12,79
	12,42	21,38	50,00
Avaliação da performance fotossintética (PAM)	-	-	12,53
	-	-	50,00

5. DISCUSSÃO

5.1. Variação do pH durante o experimento

Sabe-se que o pH é um dos principais fatores que influenciam na biodisponibilidade de um composto químico uma vez que o seu transporte para dentro da célula é influenciado pelo seu grau de ionização e este, por sua vez, pelo pH do meio. Formas ionizadas de uma substância química têm sua entrada, através da membrana celular, dificultada, enquanto que as formas moleculares têm a entrada facilitada (Azevedo e Lima, 2003). Segundo Sterling *et al.* (1990), o herbicida bentazon se difunde livremente e extensivamente pela membrana de células cultivadas de malvão (*Abutilon theophrasti*). Esse estudo revelou que a absorção do bentazon para o meio intracelular é inversamente relacionada com o pH do meio onde o composto está diluído.

No presente estudo, foi observado um aumento no pH, desde o início até o final do experimento, nos tratamentos onde houve crescimento algal. O aumento no pH foi resultante do desenvolvimento do processo fotossintético e a conseqüente remoção do CO₂ dissolvido no meio de cultivo. Nos tratamentos onde foi observada inibição no crescimento algal, o pH praticamente não variou. Conseqüentemente, a variação que ocorreu no pH não influenciou na toxicidade observada sobre o crescimento algal.

5.2. Efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento da microalga

A toxicidade moderada que foi observada do herbicida bentazon sobre o crescimento da diatomácea *Skeletonema costatum* confirma o que é reportado em outros estudos ecotoxicológicos, e é explícito pela baixa toxicidade deste herbicida em relação a outros herbicidas e compostos químicos potencialmente poluidores.

A concentração efetiva mediana (CE₅₀) encontrada neste trabalho (24,00 mg.L⁻¹) é pelo menos duas vezes superior ao valor de 10,10 mg.L⁻¹ reportado pela EPA (2000) para o efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento de *S. costatum*, o que é explicado pela diferença nos tempos de exposição (72 horas e 120 horas, respectivamente) (Tabela 04). Mesmo que a comparação entre o valor documentado pela EPA e o encontrado neste trabalho esteja dificultada devido a este fato, os dados apresentados neste trabalho

forneem uma informação importante, pois podem ser comparados com resultados de outros estudos com outros pesticidas tambem utilizados no cultivo do arroz irrigado, que foram realizados nas mesmas condições experimentais e com a mesma linhagem de *S. costatum* utilizados neste trabalho,.

O herbicida bentazon apresentou toxicidade significativamente menor do que a de outros defensivos agrıcolas utilizados na rizicultura da região sul do Brasil, como por exemplo, os inseticidas carbofuran e fipronil e o herbicida clomazone. Foram encontrados, para esses pesticidas, valores de concentrao efetiva mediana (CE_{50}), sobre *S. costatum*, de 0,34, 1,09 e 2,87 $mg.L^{-1}$, respectivamente (Correia *et al.*, 2005), enquanto que o valor de CE_{50} obtido no presente estudo foi pelo menos 8 vezes superior (24,00 $mg.L^{-1}$), confirmando sua menor toxicidade.

O herbicida bentazon tambem se mostrou menos tıxico para diatomıcea *S. costatum* do que algumas substâncias de referęncia utilizadas com frequęncia em ensaios ecotoxicolıgicos. O valor de $CE_{50,72h}$ para o cloreto de zinco e cloreto de cıdmio, por exemplo, ę de 0,14 $mg.L^{-1}$ (Walsh *et al.*, 1988), 0,025 $mg.L^{-1}$ para o sulfato de cobre (Fisher e Froot, 1980) e 0,0037 $mg.L^{-1}$ para o cloreto de mercırio (Cloutier-Mantha e Brown, 1980). Assim, pode-se classificar o bentazon como um composto de toxicidade moderada para *S. costatum*. Já o pesticida pentaclorofenol apresenta $CE_{50,96h}$ de 0,08 $mg.L^{-1}$ e, portanto, ę altamente tıxico. O dicromato de potássio apresenta uma toxicidade ($CE_{50,72h} = 31,1 mg.L^{-1}$) inferior  do bentazon (Kusk e Nyholm, 1991) (Tabela 04).

Tabela 04 - Valores de concentração efetiva mediana (CE₅₀) para o efeito de diferentes substâncias químicas usadas como referência em ensaios padrão em ecotoxicologia, sobre a diatomácea *S. costatum*.

Substância-teste	CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Tempo de exposição (horas)	Referência
Cloreto de mercúrio	0,0037	72	Cloutier-Mantha e Brown (1980)
Sulfato de cobre	0,025	72	Fisher e Froot (1980)
Pentaclorofenol	0,08	96	EPA (2000)
Cloreto de cádmio	0,14	72	Walsh <i>et al.</i> (1988)
Cloreto de zinco	0,14	72	Walsh <i>et al.</i> (1988)
Bentazon	10,1	120	EPA (2000)
Bentazon	24	72	Este trabalho
Dicromato de potássio	31,1	72	Kusk e Nyholm (1991)

A toxicidade encontrada neste estudo para o efeito do bentazon sobre o crescimento da diatomácea *S. costatum*, está dentro do padrão que é reportado sobre a sua toxicidade em outras espécies de fitoplâncton. Os valores de CE_{50;72h} encontrados na literatura são de 4,50, 42,50 e 47,30 mg.L⁻¹ para as clorofíceas *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirshneriella subcapitata*), *Chlorella fusca* e *Ankistrodesmus sp.*, respectivamente (Huber e Otto, 1994; Faust *et al.*, 1993). Para a cianofíceia *Anabaena flosaquae* é reportada uma CE₅₀ de 10,00 mg.L⁻¹ após cinco dias de exposição (EPA, 2000) (Tabela 05).

Tabela 05 – Valores de concentração efetiva mediana (CE₅₀) para o efeito do herbicida bentazon em diferentes espécies de fitoplâncton.

Espécie	CE₅₀ (mg.L⁻¹)	Tempo de exposição (horas)	Referência
<i>P. subcapitata</i>	4,50	72	Huber e Otto (1994)
<i>C. fusca</i>	42,50	72	Faust et al. (1993)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	47,30	72	Faust et al. (1993)
<i>A. flosaquae</i>	10,00	120	EPA (2000)
<i>S. costatum</i>	10,10	120	EPA (2000)
<i>S. costatum</i>	24,00	72	Este trabalho

No ensaio padrão de inibição de crescimento algal, onde na maioria das vezes a biomassa é estimada via fluorescência da clorofila *a*, é esperado que os valores de fluorescência da clorofila *a* sejam os mesmos dos obtidos no controle, nos tratamentos onde não há efeito tóxico, e que sejam menores, como consequência da diminuição na biomassa algal nos tratamentos onde é observado efeito tóxico. No caso deste trabalho, houve uma alteração nesse padrão, pois a fluorescência medida não foi apenas reflexo da biomassa algal e, portanto, da concentração de clorofila *a*. Houve também a interferência da fluorescência gerada pelo efeito da substância-teste sobre o FSII (indução da fluorescência da clorofila *a*) conforme reportado por Mine e Matsunaka (1975) e Nimbai *et al.* (1996), e explicado anteriormente em *introdução (ítem 1.3.2.1.)*. Nos tratamentos onde a biomassa algal não foi afetada já havia um efeito tóxico sobre o FSII e os valores de fluorescência da clorofila *a* aumentaram atingindo valores superiores aos obtidos no controle. Nos tratamentos onde a biomassa algal foi afetada houve uma diminuição na concentração de clorofila *a* e, portanto, nos valores de fluorescência medidos.

5.3. Efeito do herbicida bentazon sobre a máxima performance fotossintética do FSII da microalga

O herbicida bentazon também se mostrou menos tóxico do que outros herbicidas que possuem mecanismo de ação semelhante, quando o parâmetro considerado é a máxima performance fotossintética do FSII (Fv/Fm). Neste estudo, os tratamentos de 12,80 mg.L⁻¹ (experimento DCMU) e 12,53 mg.L⁻¹ (experimento PAM) de bentazon, inibiram em 50% a Fv/Fm da diatomácea *S. costatum*. Em contraste, foi demonstrado que 0,003 mg.L⁻¹ do herbicida DCMU inibe em 25% na Fv/Fm da diatomácea marinha *Phaedactylum tricorutum* (Schreiber *et al.*, 2002). Também tendo obtido efeito de maior toxicidade do que os resultados do presente estudo, Geoffroy *et al.* (2004) mostraram que a mesma concentração do herbicida flumioxazin inibe em 13% a Fv/Fm da cloroficea dulcícola *Scenedesmus obliquus* após 24 h de exposição.

Os padrões observados de variação da Fv/Fm ao longo do tempo experimental, principalmente nas concentrações de bentazon mais baixas, foram semelhantes entre si, sugerindo que o herbicida bentazon diminui os níveis da Fv/Fm mas não altera seu padrão natural de variação ao longo do ciclo de vida alga. O mesmo foi encontrado por Macinnis-Ng e Ralph (2003) ao submeter *Zostera capricorni* aos herbicidas atrazina e DCMU. Os autores mostraram que 100 µg.L⁻¹ dessas substâncias inibem em 57% e 73% a Fv/Fm de *Z. capricorni*, entretanto o seu padrão de variação ao longo do tempo de exposição não foi alterado em relação ao que foi observado no controle.

A diminuição progressiva da toxicidade do bentazon (nas concentrações mais baixas) que foi observada com o aumento do tempo de exposição, pode estar relacionada à rápida fotodegradação desse composto. No processo de fotodegradação, as moléculas de bentazon são rapidamente quebradas e a concentração diluída no meio de cultivo diminui progressivamente. Experimentos em laboratório mostraram que o herbicida bentazon, sob iluminação, apresenta meia-vida de 14 horas em pH 9,0 a 25°C (Eswein e Panek, 1986; FAO, 1999).

Os processos de biodegradação, por outro lado, podem ser desconsiderados uma vez que, com relação à biodegradação do bentazon, foram reportadas meia-vidas de cerca de 100 dias (Bieber, 1994) e 84 dias (Thorstensen e Lode, 2001). Outros herbicidas com modo de ação semelhante ao do bentazon possuem uma degradação mais lenta. Isso é o caso dos

herbicidas DCMU e atrazina, com meia-vidas de 43 (Ralph, 2000; Haynes *et al.*, 2000) e 150 dias (Ralph, 2000), respectivamente.

Outros fatores que podem estar atuando contribuindo para a diminuição da toxicidade são processos inerentes ao próprio metabolismo do bentazon pelas células algais e mecanismos de detoxificação, que serão discutidos posteriormente.

5.3.1. Variação dos valores de Fo e Fm

Um dos fatores que influenciaram nos valores de Fo e Fm foi o efeito direto do bentazon sobre o FSII (indução da fluorescência da clorofila *a*). Considerando que a substância-teste atua como bloqueador do FSII, a energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila *a*, não pode ser usada na fotoquímica e é então dissipada não fotoquimicamente causando um aumento no sinal de Fo que então se aproxima do nível de Fm (Krause e Weis, 1991; Merz *et al.*, 1996). Esta tendência foi observada por Ralph (2000) que verificou um aumento no sinal de fluorescência da clorofila *a* ao expor *Halophilia ovalis* a diversos pesticidas.

Nas concentrações de bentazon mais altas, a diminuição na biomassa algal ocasionou a diminuição nas leituras de Fo e Fm. No caso do trabalho de Ralph (2000), os valores absolutos de Fo e Fm não foram influenciados pela biomassa algal já que o tempo de exposição foi de apenas 96 horas e a espécie alvo utilizada nos experimentos foi uma macroalga cuja biomassa varia mais lentamente.

Diferentemente do que foi observado para Fo e Fm, a Fv/Fm não foi afetada pela biomassa algal. A Fv/Fm é expressa pela taxa entre a fluorescência variável (Fm-Fo) e a Fm, não dependendo dos valores absolutos de Fo e Fm. Os sinais captados de Fo e Fm são dependentes das atividades fotoquímicas e das propriedades óticas da amostra (i.e. densidade celular) e, conseqüentemente, é essencial remover estas variações para se realizar comparações entre eventuais mudanças nas características da fluorescência de diferentes amostras (Baker e Rosenqvist, 2004). Isto pode ser feito de forma mais segura comparando-se taxas dos valores de fluorescência medidos, as quais são menos dependentes desses fatores (Baker e Rosenqvist, 2004; Lichtenthaler *et al.*, 2005). Devido a isso, em sua

maioria, os resultados encontrados nos diferentes trabalhos são publicados geralmente na forma de taxas dos valores de fluorescência medidos.

5.3.2. Comparação das medições da Fv/Fm feitas nos experimentos com o DCMU e com o PAM

As diferenças observadas nos valores de Fv/Fm obtidos nos experimentos com o DCMU e PAM podem estar associadas à diferenças na metodologia adotada para medir Fo e Fm além das diferenças inerentes aos equipamentos utilizados. O fluorímetro usado no experimento com o DCMU (Turner Designs TD-700) possui alta sensibilidade para a determinação de clorofila *a* em suspensões líquidas (Turner Designs, 1997), enquanto que o fluorímetro de pulso de amplitude modulada PAM-2000 tem maior sensibilidade para a detecção da fluorescência da clorofila *a* em vegetais superiores (Walz, 2006).

Entretanto, considerando a principal abordagem deste trabalho, que foi a avaliação da toxicidade da substância-teste sobre a microalga, ambas as metodologias geraram resultados semelhantes. Os valores absolutos de Fv/Fm foram sempre mais baixos na metodologia com o PAM em relação à metodologia com o DCMU, porém, as diferenças entre os valores obtidos nos tratamentos em relação aos obtidos no controle (toxicidade medida) foram semelhantes em ambas as metodologias.

A técnica de medição da Fv/Fm com o uso do DCMU, apesar de eficiente é menos prática se comparada à metodologias mais modernas como a que usa o fluorímetro PAM, o que torna-se evidente ao compararmos quantidade de procedimentos necessários para o desenvolvimento de cada experimento.

5.4. Comparação dos diferentes parâmetros monitorados quanto a sua sensibilidade para a detecção dos efeitos do herbicida bentazon

Sabe-se que o crescimento saudável de um organismo é resultado do perfeito funcionamento e integração dos processos bioquímicos e fisiológicos (Nelson e Cox, 2005). Qualquer xenobionte causa efeitos imediatos nas vias bioquímicas, que precedem os efeitos observados sobre a fisiologia, o crescimento e a reprodução do organismo exposto (Rand e

Petrocelli, 1985; Adams e Rowland, 2003). Nossos resultados demonstraram que o monitoramento da Fv/Fm foi mais sensível do que o monitoramento do crescimento algal na detecção imediata do efeito tóxico ocasionado pelo herbicida bentazon sobre a diatomácea *S. costatum*. Como demonstrado, imediatamente após a adição da substância-teste foi detectado o efeito tóxico sobre a Fv/Fm em uma concentração 8 vezes inferior à concentração de efeito observado (CEO) determinada através do ensaio convencional de inibição de crescimento algal.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com outros estudos que também confirmaram a maior sensibilidade da Fv/Fm para a detecção de efeitos precoces de substâncias tóxicas em um curto período de exposição. Thompson (1997) comparou os efeitos de um metal tóxico, um pesticida, uma amostra do efluente de uma estação de tratamento de esgoto e amostras de sedimento sobre a Fv/Fm e o crescimento da clorofícea *Pseudokirshneriella subcapitata*. Considerando as amostras de sedimento, a CEO, determinada no monitoramento da Fv/Fm, foi 70% menor do que a obtida quando o parâmetro monitorado foi o crescimento em um período de 24 horas de exposição. Considerando o metal tóxico e o pesticida pentaclorofenol, cujos efeitos são mais agudos, a Fv/Fm mostrou-se mais sensível em um tempo de exposição menor do que 24 horas. Tratamentos de 05 horas com cobre e 24 horas com pentaclorofenol inibiram em 25% a Fv/Fm. No presente trabalho a CEO obtida no monitoramento da Fv/Fm, também foi consideravelmente mais baixa (87% menor) do que a obtida no monitoramento do crescimento algal.

Na avaliação da toxicidade de pesticidas, é aplicado um índice de segurança proposto por Solomon (1997). Este índice é calculado a partir da relação entre a CE₅₀ obtida no ensaio toxicológico e a concentração do pesticida recomendada pelo fabricante para a aplicação no campo. Pesticidas com valores de índice de segurança maiores do que 20 apresentam um menor risco de impacto ambiental. Considerando a concentração recomendada para a aplicação do herbicida bentazon no campo (0,96 mg.L⁻¹) e a CE₅₀ (24,00 mg.L⁻¹) obtida através do ensaio padrão de inibição de crescimento algal, o produto não apresenta alto risco de impacto ambiental (índice de segurança equivalente a 25). Entretanto, considerando que em ambientes sujeitos à poluição pode haver não necessariamente uma diminuição na biomassa, mas sim um comprometimento do estado

fisiológico dos organismos (Lovett-Doust e Lovett-Doust, 2001; Landis e Yu, 2003) e, neste caso, considerando a CE_{50} (aproximadamente $13,0 \text{ mg.L}^{-1}$) obtida no monitoramento da Fv/Fm, o produto seria considerado impactante ao ambiente (índice de segurança de 13,05). Dos resultados obtidos considerando tanto a Fv/Fm, como também o crescimento, a aplicação do pesticida, do modo como é realizada, ocasiona um possível efeito crônico cujo resultado ambiental é a seleção de espécies resistentes.

5.5. Aplicabilidade da Fv/Fm para o estudo da toxicidade do bentazon em organismos fitoplanctônicos

Os resultados obtidos demonstraram que a Fv/Fm tem alta sensibilidade para detecção dos efeitos precoces gerados pela exposição ao herbicida bentazon. A detecção rápida do efeito tóxico em uma baixa concentração da substância-teste denota a potencialidade e aplicabilidade da Fv/Fm como biomarcador na avaliação da toxicidade de substâncias tóxicas sobre organismos fotossintetizantes.

Além disso, foram comprovadas a sensibilidade e aplicabilidade da diatomácea *S. costatum* não apenas em ensaios ecotoxicológicos convencionais, como também em experimentos alternativos baseados no uso de biomarcadores de estresse fisiológico.

No presente estudo, a Fv/Fm mostrou uma maior sensibilidade do que a concentração de clorofila *a*, comumente adotada em bioensaios ecotoxicológicos como forma de estimar a biomassa algal. O monitoramento contínuo da eficiência do FSII, reflexo do seu funcionamento, possibilitou uma análise mais detalhada do comportamento do efeito tóxico ao longo do tempo de exposição e em concentrações inferiores àquelas onde foi detectado qualquer efeito sobre a concentração de clorofila *a*. Com isso, foi possível analisar as variações na intensidade do efeito tóxico desde os momentos iniciais de exposição e detectar concentrações limites com perda na eficiência do FSII e associa-la às fases do crescimento do organismo.

A aplicação da Fv/Fm é válida não somente para detectar a presença de substâncias que agem diretamente sobre o FSII, mas também as que não agem diretamente sobre esse local (Podola *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Tukaj *et al.*, 2006; Kuster e Altenburger, 2007). Substâncias tóxicas e/ou fatores estressantes podem inibir reações metabólicas não

diretamente envolvidas na fotossíntese, modificando o estoque de diversos intermediários metabólicos, que por sua vez podem influenciar na síntese de moléculas chave no metabolismo fotossintético e, conseqüentemente, interferir na taxa de fotossíntese e nas características da fluorescência emitida (Baker e Rosenqvist, 2004). Isto confere à Fv/Fm um alto potencial para aplicação na avaliação da toxicidade de amostras ambientais as quais geralmente apresentam um conjunto de diversas substâncias tóxicas interferindo em vários processos metabólicos do organismo exposto.

No presente estudo, por outro lado, não foi possível prever em curto prazo sobre um provável efeito tóxico no crescimento da alga, ou seja, em nível populacional, somente considerando os efeitos imediatos observados sobre a Fv/Fm. Nas concentrações intermediárias de bentazon, no final do tempo de exposição, por exemplo, enquanto que a Fv/Fm diminuiu, o crescimento algal não foi afetado. Isso pode estar relacionado à mecanismos de modulação do efeito tóxico (mecanismos de detoxificação), associados ao metabolismo celular, que causam uma adaptação fisiológica temporária, durante a exposição das células à substância tóxica, de modo que funções vitais como o crescimento e a reprodução praticamente não são afetados (Andersen e Barton, 1998).

Um destes mecanismos pode estar relacionado à regulação do balanço energético entre os fotossistemas I e II. Como o herbicida bentazon bloqueia o FSII que perde parcialmente sua eficiência, mas não tem efeito sobre o FSI (Boger *et al.*, 1977) este último, apesar de não receber integralmente a energia proveniente do FSII, ainda capta diretamente energia luminosa, através do seu próprio complexo antena, e a transfere ao processo fotoquímico. A diminuição da taxa de transporte de elétrons do FSII para o FSI é compensada por uma regulação do balanço estequiométrico das reações de oxi-redução ocorrentes nos fotossistemas, que ocorre através de modificações na composição das macromoléculas responsáveis pelo andamento dessas reações (Fujita *et al.*, 1987; Pfannschmid *et al.*, 2001; Sonoike *et al.*, 2001) resultando, assim, na regulação do processo fotossintético como um todo.

Outro mecanismo atuante na detoxificação do bentazon é mediado por hidroxilases do citocromo P450, que o transformam em 6-OH e 8-OH-hidroxibentazon. Estes últimos podem ser conjugados com açúcares e translocados para diversos tecidos (Huber e Otto, 1994). Esse é o mecanismo no qual se baseia a seletividade do herbicida bentazon, já que

ocorre exclusivamente em linhagens selecionadas de espécies de interesse para cultivo, enquanto que vegetais mais simples, como as plantas daninhas, não são capazes de fazê-lo e acabam morrendo (Huber e Otto, 1994). Entretanto, não são encontrados estudos sobre a existência e/ou eficiência desse processo em algas.

Um terceiro processo de detoxificação é desempenhado pelos carotenóides presentes na membrana do tilacóide (Demmig *et al.*, 1987), que podem atuar amenizando os efeitos deletérios indiretos do bentazon. Estes compostos têm a capacidade de ajudar na dissipação não fotoquímica do excesso de energia de excitação causada pelo bloqueio do FSII pelo herbicida bentazon. Os carotenóides reduzem a formação de radicais superóxido (1O_2) causando a dissipação da energia da $^1Cl_a^*$ e $^3Cl_a^*$, além de inativar diretamente o 1O_2 formado e, conseqüentemente, evitando a fotodestruição dos pigmentos e proteínas das estruturas das organelas (Demmig *et al.*, 1987; Krinsky, 1994; Porra *et al.*, 1997; Asada, 2006). O ciclo da diadinoxantina, presente nas diatomáceas, que é análogo ao ciclo das xantofilas nas algas verdes e pardas e em vegetais superiores (Arsalane, 1994), também tem função protetora. Nesse processo, a diatoxantina dissipa a energia da $^1Cl_a^*$, e é oxidada formando diadinoxantina (Porra *et al.*, 1997; Niyogi *et al.*, 1997).

Embora se saiba sobre a existência desses mecanismos de detoxificação, não são encontradas informações sobre a sua eficiência em resposta à exposição ao bentazon, em espécies naturais, principalmente em se tratando de algas. Os estudos existentes se resumem ao uso de espécies diretamente envolvidas na atividade agrícola (Al-Mendoufi e Ashton, 1984; Sterling *et al.*, 1999; Han e Wang, 2002; Wu e Wang, 2003).

5.6. Considerações Finais

O presente trabalho vem a confirmar o que é reportado na literatura sobre a utilização de biomarcadores na área da ecotoxicologia. Considerando a grande diversidade de possíveis interações de cada diferente substância tóxica nas diferentes espécies (biodisponibilidade, interações fisico-químicas, metabolismo celular e mecanismos de detoxificação, etc), estudos toxicológicos, devem considerar o efeito da substância-teste em vários processos fisiológicos vitais (o que envolve a utilização de mais de um biomarcador), a atuação dos principais mecanismos de detoxificação, bem como a

realização de bioensaios toxicológicos convencionais, para se avaliar de forma mais realista o comportamento do efeito sobre a biomassa populacional da espécie em questão.

Há situações, por outro lado, onde se deseja apenas detectar a presença de alguma substância tóxicas em amostras. Nesse caso, a utilização de um biomarcador específico, como a Fv/Fm, é uma ferramenta de grande aplicabilidade por ser um parâmetro sensível e de rápido diagnóstico.

Este estudo é uma contribuição para a área da ecotoxicologia, apresentando informações ainda desconhecidas sobre o efeito de um herbicida de utilização comum no sul do Brasil, em uma espécie de alta representatividade em ambientes aquáticos costeiros. São apresentados resultados de experimentos ainda pouco difundidos e conhecidos, sobre o uso de biomarcadores de estresse fisiológico no fitoplâncton. Os métodos apresentados podem ser utilizados por diversos órgãos, como os que controlam a qualidade da água destinada para usos nobres (como consumo humano, por exemplo), pois permitem detectar, com grande rapidez e sensibilidade, a presença de substâncias tóxicas em amostras de água. As metodologias apresentadas neste trabalho podem ser utilizadas como uma alternativa aos métodos convencionais mais sensíveis de detecção de substâncias tóxicas em amostras, os quais, geralmente, têm custo elevado.

As informações fornecidas neste estudo auxiliam na condução de outras investigações de monitoramento de ambientes aquáticos sob influência das áreas de cultivo de arroz irrigado. Estas áreas são conhecidas por terem alta abundância e diversidade fitoplanctônica. Assim, podem ser desenvolvidos estudos de monitoramento da performance fotossintética da comunidade fitoplanctônica natural dos cultivares de arroz de modo a avaliar uma eventual ocorrência do efeito tóxico no ambiente natural, bem como um acompanhamento mais detalhado da persistência dos pesticidas aplicados na água.

6. CONCLUSÕES

- O herbicida bentazon é moderadamente tóxico para a diatomácea marinha *Skeletonema costatum*.
- Com a adição do herbicida bentazon, houve uma diminuição imediata na máxima performance fotossintética da microalga.
- Houve efeito de diminuição no crescimento da diatomácea *S. costatum* a partir das 24 horas de exposição.
- A máxima performance fotossintética foi o parâmetro estudado que apresentou maior sensibilidade para detecção dos efeitos do herbicida bentazon.
- Os resultados de toxicidade do bentazon sobre a máxima performance fotossintética, obtidos através das metodologias com o DCMU e com o PAM, coincidiram.
- Considerando a toxicidade do herbicida sobre o estado fisiológico da alga e a concentração recomendada pelo fabricante para aplicação no campo, o seu potencial impacto no ambiente, conforme o índice proposto por Solomon (1998), é elevado.
- Foi comprovada a aplicabilidade do parâmetro Fv/Fm para a detecção de substâncias tóxicas em bioensaios toxicológicos rápidos.
- Por outro lado, a Fv/Fm não pode ser utilizada isoladamente para prever a morte celular, ou seja, inferir sobre um possível efeito tóxico a nível populacional, sem considerar o efeito observado em outros processos fisiológicos.
- Foi comprovada a aplicabilidade e sensibilidade da diatomácea marinha *Skeletonema costatum* em bioensaios toxicológicos convencionais e em experimentos com biomarcadores.

7. REFERÊNCIAS

Adams, W. J. e Rowland, C. D. 2003. Aquatic toxicology test methods. *In*: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A. e Cairns, J. Handbook of Ecotoxicology. Second edition. Lewis Publishers. 1312 p.

Al-Mendoufi, O. e Ashton, F. M. 1984. Bentazon influence on selected metabolic processes of isolated bean leaf cells. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 3(1-3): 121-126

A.P.H.A. 1966. Standard methods for the examination of water and wastewater, 11th ed. American Public Health Association Inc., New York, 626 p.

Andersen, M. E. e Barton, H. A. 1998. The use of biochemical and molecular parameters to estimate dose-response relationships at low-levels of exposure. *In*: Hook, G. E. R. e Lucier, G. W. Reviews in environmental health. Toxicological defense mechanisms. Diane Publishing. 400p.

Asada, K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**. v. 141:391–396

Azevedo, F. A. e Lima, I. V. 2003. Toxicocinética. *In*: Azevedo, F. A. e Chasin, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos : RiMa. São Paulo: Intertox. 340p.

Baker, N. R. e Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**. v. 55:1607-1621.

BASF. The Chemical Company. Catálogo de produtos (herbicida Basagran 600). Disponível em: <<http://www.agro.basf.com.br/produtos/produtos.asp?area=2>> Acesso em: setembro de 2006.

Bennett, A.; Bianchi, T. S. e Means, J. C. 2000. The Effects of PAH Contamination and Grazing on the Abundance and Composition of Microphytobenthos in Salt Marsh Sediments (Pass Fourchon, LA, U.S.A.): II: The Use of Plant Pigments as Biomarkers. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** v. 50(3):425-439

Bieber, W. D. 1994. Degradation of the test substance Bentazon in aerobic aquatic environment. BASF 94/11026. WAS95-00111.

Billen, G.; Garnier, J.; Fight, A. e Cun, C. 2001. Modeling the Response of Water Quality in the Seine River Estuary to Human Activity in its Watershed Over the Last 50 Years. **Estuaries**. v. 24(6B):977–993.

Boger, P.; Beese, B. e Miller, R. 1977. Long-term effects of herbicides on the photosynthetic apparatus II. Investigations on bentazone inhibition. **Weed Research**. v. 17(1): 61–67.

Bol, J.; Verhaar, H. J. M. e Hermens, J. L. M. 2002. Environmental relevant parameters for some pesticides. Triazines, organochlorine pesticides, phenoxy-carbonic acid herbicides and carboximides. Report, RITOX, University of Utrecht, The Netherlands (in Dutch).

Cajaraville M.P.; Bebianno M.J.; Blasco J.; Porte C.; Sarasquete C. e Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**. v. 247(2-3):295-311.

Campbell, S. J.; McKenzie, L. J. e Kerville, S. P. 2006. Photosynthetic responses of seven tropical seagrasses to elevated seawater temperature. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 330(2):455-468

Chapman, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**. v. 44:7–15.

Chazin, A. A. M. e Azevedo, F. A. 2003. Intoxicação e avaliação da toxicidade. *In*: Azevedo, F. A. e Chazin, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos : RiMa. São Paulo: Intertox. 340p.

Cloutier-Mantha, L. e Brown, D.A. 1980. The Effects of Mercury Exposure on Intracellular Distribution of Mercury, Copper and Zinc in *Skeletonema Costatum* (Grev.) Cleve. **Botanica Marina**. v. 23:53-58.

Correia, E. A.; Tamanaha, M. S.; Resgalla Jr, C.; Rörig, L. R. e Noldin, J. A. 2006. Testes de inibição de crescimento em fitoplâncton com agroquímicos utilizados na cultura de arroz irrigado. *In*: XI Congresso Brasileiro de Ficologia, Itajaí, SC. Anais do XI Congresso Brasileiro de Ficologia.. p. 229-229.

Danilov, R.A. e Ekelund, N.G.A. 2001. Effects of Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ and pentachlorophenol on photosynthesis and motility in *Chlamydomonas reinhardtii* in short-term exposure experiments. **BMC Ecology**, 1, 1.

Dawson, B. J. M. Shallow Ground-Water Quality Beneath Rice Areas in the Sacramento Valley, California, 1997. **U.S. GEOLOGICAL SURVEY. Water-Resources Investigations Report 01-4000**. NATIONAL WATER-QUALITY ASSESSMENT PROGRAM. Sacramento, California.

Demmig, B.; Winter, K.; Kruger, A. e Czygan, F. 1987. Photoinhibition and Zeaxanthin Formation in Intact Leaves: A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. **Plant Physiology**. v. 84:218-224.

Di Bernardo, L. 1995. Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento. ABES. Rio de Janeiro. 140 p.

Dousett, S.; Babut, M.; Andreaux, F. e Schiavon, M. 2004. Alachlor and Bentazone Losses from Subsurface Drainage of Two Soils. **Journal of Environmental Quality**. v. 33. p. 294 – 301.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap05.htm>> Acesso em 23 de março de 2006.

EPA - U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Pesticide fact sheet for bentazon and sodium bentazon: Washington, D.C., Office of Pesticide Programs, Fact Sheet 64, 10 p.

EPA - U.S. Environmental Protection Agency. Ecotoxicological database. Disponível em:
<http://cfpub.epa.gov/ecotox/ecotox_home.cfm> Acesso em: 10 de novembro de 2005.

Eswein, R.P. e Panek, E.J. 1986. Photolysis of Bentazon in pH 5, 7, and 9 aqueous solutions at 25°C. BASF 86/5016. WAS95-00102.

Evens, T. J.; Kirkpatrick, G. J.; Millie, D. F. 2001. Chapman, D. J. e Schofield, O. M. E. Photophysiological responses of the toxic red-tide dinoflagellate *Gymnodinium breve* (Dinophyceae) under natural sunlight. **Journal of Plankton Research**. v.23(11):1177-1194.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1999. FAO Specifications and evaluations for plant protection products.

Faust, M. R.; Altemburger, W. B. e Grimme, L. H. 1993. Additive effects of herbicide combinations on aquatic non-target organisms. **Science of the Total Environment**. (Supl.): 941 – 951.

Ferrat, L.; Pergent-Martini, C. e Roméo, M. 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. **Aquatic Toxicology**. v. 65:187-204.

Fisher, N. S. e Frood, D. 1980. Heavy metals and marine diatoms: Influence of dissolved organic compounds on toxicity and selection for metal tolerance among four species. **Journal of Marine Biology**. v. 59(2):85-93.

Frankart, C.; Eullaffroy, P. e Vernet, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. **Environmental and Experimental Botany**. v. 49:159-168.

French, P. W. 1997. Coastal and estuarine management. Routledge environmental management series. New York. 251 p.

Fujita, Y.; Murakami, A. e Ohki, K. 1987. Regulation of Photosystem Composition in the Cyanobacterial Photosynthetic System: the Regulation Occurs in Response to the Redox State of the Electron Pool Located between the Two Photosystems. **Plant and Cell Physiology**. v. 28(2):283-292.

Geoffroy, L.; Frankart, C. e Eulaffroy, P. 2004. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environmental Pollution**. v. 131:233-41.

Giardi, M. T.; Koblížek, M. e Masojídek, J. 2001. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. **Biosensors & Bioelectronics**. v. 16:1027–1033.

Groom, M. J.; Meffe, G. K. e Carroll, C. R. 2006. Principles of Conservation Biology. 3 ed.

Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. e Chanley, M. H. Culture of Invertebrate Animals. NY Plenum Press. pp. 29-60.

Guillard, R. R. L. e Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. **Canadian Journal of Microbiology**. 8:229-39.

Han, Y. C. e Wang, C. Y. 2002. Physiological basis of bentazon tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) lines. **Weed Biology and Management**. v. 2 (4):186–193.

Haynes, D.; Ralph, P.; Pranges, J. e Denninson, B. 2000. The Impact of the Herbicide Diuron on Photosynthesis in Three Species of Tropical Seagrass. **Marine Pollution Bulletin**. v. 41 (7-12):288-293.

Hsu, B; Lee, J. e Pan, R. The two binding sites for DCMU in photosystem II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 141(2):682-688.

Huber, R. and S. Otto. 1994. Environmental Behavior of Bentazon Herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 137: 11-134.

ISO – International Organization for Standardization. **Water Quality – Marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaedactylum tricornutum***. Draft International Standard ISO/TC 147/SC 5/WG. Netherlands, 1989.

Jakob, T.; Schreiber, U.; Kirchesch, V.; Langner, U. e Wilhelm, C. 2005. Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. **Photosynthesis Research**. V. 93(3):343-361.

Jeffrey, S.W; Mantoura, R. F. C. e Wright, S. W. 1997. Application of pigment methods to oceanography. UNESCO publishing. France.

Johnson, G. N.; Scholes, J. D.; Grime, J. P. e Horton, P. 1990. *In: Proceedings of the VIIIth International Congress on Photosynthesis.*

Kana, R.; Spundova, M.; Ilik, P.; Lazar, D.; Klem, K.; Tomek, P.; Naus, J. e Prasil, O. 2004. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare L.*) leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 78:161–170.

Karavaev, V. A.; Polyakova, I. B.; Solntseva, M. K. e Yurinab, T. P. 1998. Effect of various chemical agents on photosynthesis studied by the method of fluorescence induction. **Journal of Luminescence**. v. (76-77):335-338.

Kennedy, J. H.; LaPoint, T. W.; Balci, P.; Stanley, J. K. e Johnson, Z. B. 2003. Model aquatic ecosystems in ecotoxicological research: considerations of design, implementation and analysis. *In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A. e Cairns, J. Handbook of Ecotoxicology*. Second edition. Lewis Publishers. 1312 p.

Kautsky, H.; Appel, W. e Anamm, H. 1960. Chlorophyllfluorescenz und kohlenassimilation. **Biochemische Zeitschrift**. v. 322:277-292

Kennish, M. J. 1997. Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. CRC Press. 524 p.

Kirk, J. T. O. 1994. Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Second edition. Cambridge University Press. 509 p.

Krinsky, N. I. 1994. The biological properties of carotenoids. **Pure & Applied Chemistry**. v. 66(5):1003-1010.

Kusk, K. O. e Nyholm, N. 1991. Evaluation of a phytoplankton toxicity test for water pollution assessment and control. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 20:375-379.

Kuster, A. e Altenburger, R. 2007. Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species. **Chemosphere**. v. 67(1):194-201.

Laberge, D.; Chartrand, J.; Rouillon, R. e Carpentier, R. *In vitro* phytotoxicity screening test using immobilized thylakoids. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 18(12): 2851-2858.

Landis, W. G.; YU, M. H. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems . 3. ed. New York: Lewis Publishers, 2003. 484 p.

Lazár, D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**. v. 1412 (1):1-28.

- Lee, R. E. 1999. Phycology. Third Edition. Cambridge University Press. 600p.
- Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C. e Knapp, M. 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**. v. 43 (3): 379-393
- Littlepage, J. L. 1998. A laboratory and shipboard manual of oceanographic techniques: chemical and biological oceanography. Department of Biology, University of Victoria, 230 p.
- Lovett-Doust, L. e Lovett-Doust, J. 2001. Plant biomonitors in aquatic environments. Assessing impairment via plant performance. *In*: Butterworth, F. M.; Gunatilaka, A. e Gonshebb, M. E. Biomonitors and Biomarkers As Indicators of Environmental Change. Environmental Science Research. v. 2. 508 p.
- Lugomela, C.; Söderbäck, E. e Björk, M. 2005. Photosynthesis rates in cyanobacteria-dominated sub-tidal biofilms near Zanzibar, Tanzania. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. V. 63(3):439-446.
- Macedo, R.S.; Rorig, L.R.; Urban, S.R.; Castro-Silva, M.A. da e Pereira-Filho, J. 2005. Avaliação do efeito das águas superficiais dos estuários dos rios Camboriú e Itajaí-Açu sobre o crescimento da diatomácea *Skeletonema costatum*. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. v. 9(2):9-15.
- Macek, J. K. 1980. Aquatic Toxicology: Fact or fiction? **Environmental Health Perspectives**. V. 34:159-63
- Macinnis-Ng, C. M. O. e Ralph, P. J. 2003. Short-term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. **Aquatic Botany**. v. 76:1-15.
- Marchand, F. L.; Kockelbergh, F.; van der Vijver, B.; Beyens, L. e Nijs, I. 2006. Are heat and cold resistance of arctic species affected by successive extreme temperature events? **New Phytologist**. v. 170(2):291-300.
- Marchetti, A.; Sherryb, N. D.; Juneauc, P.; Strzepek, R. F. e Harrison, P. J. 2006. Phytoplankton processes during a mesoscale iron enrichment in the NE subarctic Pacific: Part III — Primary productivity. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**. V. 53(20-22):2131-2151.
- Margalef, R. 1989. Ecologia. Barcelona: Omega
- Maxwell, K. e Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**. v. 51(345):659-668.
- McCornick, P. V. e Cairns Jr., J. 1994. Algae as indicators of environmental change. **Journal of Applied Phycology**. v. 6(5-6):509-526.

Merz, D.; Geyer, M.; Moss, D. A. e Ache1, H. J. 1996. Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. v. 354(3):299-305

Mine, A. e Matsunaka, S. 1975. Mode of action of bentazon: Effect on photosynthesis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 5. p. 444 – 450.

Mobin, M. e Khan, N. A. 2006. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**.

Montgomery, J. H. 1993. Agrochemicals Desk Reference: Environmental Data. Lewis Publishers. Chelsea, MI.

Müller, P.; Li, X. P. e Niyogi, K. K. 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. **Plant Physiology**. v. 125:1558–1566.

Nash, S. M.; Goddardb, J. e Müllera, J. F. 2005. Phytotoxicity of surface waters of the Thames and Brisbane River Estuaries: A combined chemical analysis and bioassay approach for the comparison of two systems. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 21(11):2086-2093.

Nelson, D. L. e Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. New York: Worth, 2005. 1200 p.

Nikookar, K.; Moradshahi, A. e Hosseini, L. 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. **Biomolecular Engineering**. v. 22(4):141-146

Nimbal, C. I.; Yerkes, C. N.; Weston, L. A. e Weller, S. C. 1996. Herbicidal Activity and Site of Action of the Natural Product Sorgoleone. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 54(1):73-83

Niyogi, K. K.; Björkman, O. e Grossman, A. R. 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Plant Biology**. v. 94:14162–14167

Okada, M.; Kitajima, M. e Buder, W. L. 1976. Inhibition of photosystem I and photosystem II in chloroplasts by UV radiation. **Plant and Cell Physiology**. v. 17(1):35-43

Oxborough, K. e Baker, N. R. 1997. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo' . **Photosynthesis Research**. v. 54: 135–142

Parsons, T. R.; Maita, Y. e Lalli, C. M. 1989. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press. 173 p.

Pesticide Action Network. Informações sobre o uso e aplicação de pesticidas em diversos países. Disponível em: < <http://www.panna.org> > . Acesso em abril de 2007.

Pfannschmid, T.; Schütze, K.; Brost, M. e Oelmüller, R. 2001. A Novel Mechanism of Nuclear Photosynthesis Gene Regulation by Redox Signals from the Chloroplast during Photosystem Stoichiometry Adjustment. **Journal of Biological Chemistry**. V. 276(39): 36125-36130.

Podola, B.; Nowack, E. C.; Melkonian, M. 2004. The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. **Biosensors & Bioelectronics**. v. 19(10):1253-60.

Porra, R. J.; Pfundel, E. E. e Engel, N. 1997. Metabolism and function of photosynthetic pigments. *In*: Jeffrey, S.W; Mantoura, R. F. C. e Wright, S. W. Application of pigment methods to oceanography. UNESCO publishing. France.

Purcell, M.; Carpentier, R.; Bélanger, D. e Fortier, G. 1990. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. **Journal Biotechnology Techniques**. v. 4(5):363-368

Ralph, P. 2000. Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll *a* fluorescence. **Aquatic Botany**. v. 66:141–152.

Rand, G. M. e Petrocelli, S. R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications. Hemisphere Publishing Corporation, N.Y. 600p.

Rennenberg, H.; Loreto, F.; Polle, A.; Brilli, F.; Fares, S.; Beniwal, R. S. e Gessler, A. 2006. Physiological responses of forest trees to heat and drought. **Plant Biology**. v. 8(5):556-71.

Rioboo, C.; González, O.; Herrero, C. e Cid, A. 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. **Aquatic Toxicology**. v. 59:225-235.

Rörig, L. R.; Resgalla Jr, C.; Conceição, M. B.; Silva, M. A. C.; Stramosk, C. A.; Macedo, R. S.; Urban, S. R.; Nakagome, F. K.; Máximo, M.; Silveira, R. A. M . 2004. Análise ecotoxicológica múltipla dos efluentes tratados de uma indústria de processamento de aço e valiação comparativa dos métodos. *In*: VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Florianópolis. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Florianópolis : Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia.

Sarkar, A.; Ray, D.; Shrivastava, A. N. e Sarker, S. 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**. v. 15(4):333-340.

Schofield, O.; Grzymiski, J.; Moline, M. M. A. e Jovine, R. V. M. 1998. Impact of temperature acclimation on photosynthesis in the toxic red-tide dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Ca28). **Journal of Plankton Research**. v. 20(7):1241-1258.

Schreiber, U. 1997. Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion: Simple introductory experiments with the TEACHING-PAM Chlorophyll Fluorometer. Heiz Walz GmbH.

Schreiber, U.; Muller, J. F.; Hauggl, A. e Gademmann, R. 2002. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. **Photosynthesis Research**. v. 74:317–330.

Schödel, R.; Irrgang, K. D.; Voigt, J. e Renger, G. 1999. Quenching of Chlorophyll Fluorescence by Triplets in Solubilized Light-Harvesting Complex II (LHCII). **Biophysical Journal**. v. 76:2238–2248

Schwarzschild, A.C.; MacIntyre, W.G.; Moore, K.A. e Libelo, E.L. 1994. *Zostera marina* growth response to Atrazine in root-rhizome and whole plant exposure experiments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 183:77–89.

Slama, I.; Ghnaya, T.; Messedi, D.; Hessini, K.; Labidi, N.; Savoure A. e Abdelly, C. 2007. Effect of sodium chloride on the response of the halophyte species *Sesuvium portulacastrum* grown in mannitol-induced water stress. **Journal of Plant Research**.

Sonoike, K.; Hihara, Y. e Ikeuchi, M. 2001. Physiological Significance of the Regulation of Photosystem Stoichiometry upon High Light Acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plant and Cell Physiology**. v. 42(4):379-384

Sosak-Swidarska, B.; Tyrawska, D. e Maslikowska, B. 1998. Microalgal ecotoxicity test with 3,4-Dichloroaniline. **Chemosphere**. v. 37:2975–2982.

Sterling, T. M.; Balke, N. E. e Silverman, D. S. 1990. Uptake and Accumulation of the Herbicide Bentazon by Cultured Plant Cells. **Plant Physiology**. v. 92:1121-1127.

Thompson, J. A. 1997. Cellular fluorescence capacity as an endpoint in algal toxicity testing. **Chemosphere**. v. 35 (9): 2027-2037.

Thorstensen, C. W. e Lode, O. 2001. Organic Compounds in the Environment. **Journal of Environmental Quality**. v. 30:947-953

Tukaj, Z.; Baścik-Remisiewicz, A.; Skowroński, T. e Tukaj, C. 2006. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. **Environmental and Experimental Botany**.

Turner Designs. TD-700 Laboratory Fluorometer: operating manual. Version 1.4, 53 p., 1997.

- Vass, I.; Turcsányi, E.; Touloupakis, E.; Ghanotakis, D. e Petrouleas, V. 2002. The Mechanism of UV-A Radiation-Induced Inhibition of Photosystem II Electron Transport Studied by EPR and Chlorophyll Fluorescence. **Biochemistry**. v. 41(32):10200 -10208
- Walsh, G.E.; McLaughlin, L.L.; Yoder, M.J.; Moody, P.H.; Lores, E.M.; Forester, J. e Wessinger-Duvall, P.B. 1988. *Minutocellus Polymorphus*: A New Marine Diatom for Use in Algal Toxicity Tests. **Environmental Toxicology Chemistry**. v. 7(11):925-929.
- Wang, L.; Ying, B. e XL, E. 2006. Rapid detection of toxic substances in water with ToxY-PAM. **Journal of Hygiene Research**. v. 35(2):254-6.
- Waring, J.; Underwood, G. J.; Baker, N. R. 2006. Impact of elevated UV-B radiation on photosynthetic electron transport, primary productivity and carbon allocation in estuarine epipelagic diatoms. **Plant Cell & Environment**. v. 4:521-34.
- Warner, M. E. e Madden, M. L. 2006. The impact of shifts to elevated irradiance on the growth and photochemical activity of the harmful algae *Chattonella subsalsa* and *Prorocentrum minimum* from Delaware. **Harmful Algae**.
- Wu, C. M. e Wang, C. Y. 2003. Physiological study on bentazon tolerance in inbred corn (*Zea mays*). **Weed technology**. v. 17(3):565-570
- Zagatto, P. A. 2006. Ecotoxicologia Aquática. Princípios e aplicações. São Carlos: RiMa.
- Zar, J. 2000. Biostatistical Analysis. 6.ed. Prentice Hall, New Jersey, USA, 662 pp.