



Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



Resgate populacional de microalgas frente à contaminação por glifosato

Camila Corrêa Lourenço dos Reis

Orientadora: Fabiana Schneck

Coorientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Rio Grande
2023



Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Resgate populacional de microalgas frente à contaminação por glifosato

Aluna: Camila Corrêa Lourenço dos Reis

Orientadora: Fabiana Schneck

Coorientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2023

Ficha Catalográfica

R375r Reis, Camila Corrêa Lourenço dos.
Resgate populacional de microalgas frente à contaminação por
glifosato / Camila Corrêa Lourenço dos Reis. – 2023.
57 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2023.



Orientadora: Dra. Fabiana Schneck.

Coorientadora: Dra. Camila de Martinez Gaspar Martins.

1. Água doce 2. Clorófitas 3. Herbicida 4. Resgate evolutivo
I. Schneck, Fabiana II. Martins, Camila de Martinez Gaspar
III. Título.

CDU 582.26

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

 <p>FURG</p>	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS</p>	 <p>PPGBAC</p>
---	--	---

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 11/2023

Às 09h (nove horas) do dia 31 (trinta e um) do mês de janeiro de 2023 (dois mil e vinte e três) via Webconferência no endereço eletrônico: (https://conferenciaweb.mp.br/events/defesa_camilareis), reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da acadêmica *Camila Correa Lourenço dos Reis*. A dissertação intitulada “**Resgate populacional de microalgas frente à contaminação por glifosato**” foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Schneck (Orientadora e Presidente da Banca), Dr. Muryllo Santos Castro e Prof^º. Dr. Danilo Giroldo (FURG). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou a acadêmica **APROVADA**. Desta forma, a acadêmica concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 12h (doze horas) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pela Acadêmica e pelo Coordenador do Curso.

Camila dos Reis

Acad. Camila Correa Lourenço dos Reis

Fabiana Schneck

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Schneck

Muryllo Santos Castro

Dr. Muryllo Santos Castro

Daniilo Giroldo

Prof. Dr. Danilo Giroldo

Documento assinado digitalmente
gov.br ROGERIO TUBINO VIANNA
Data: 27/02/2023 10:18:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^º. Dr. Rogério Vianna

Coordenador do Curso

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosângela, e à minha madrinha Lidiane, pelo inestimável apoio que sempre deram para a minha formação pessoal e profissional.

À minha família, em especial Daniel, Elizabeth, Sérgio, Daiane, Danilo e Marcelo, que sempre estiveram ao meu lado ao longo de toda a minha trajetória.

Ao meu namorado, Diego, pelo incentivo nos momentos mais difíceis e compreensão para quando eu não podia estar presente.

À minha orientadora, Fabiana, e à minha coorientadora Camila, pelas correções, ensinamentos e paciência com a qual guiaram esta parte da minha formação.

Aos técnicos de laboratório Pablo e Cláudio, por toda ajuda na realização dos experimentos laboratoriais deste trabalho.

Às colegas Thays, Andressa e Jenifer, pelo auxílio em diferentes partes da construção deste trabalho.

Aos amigos de curso, Ana, Danielle, Fernanda, Katiuscia, Saimon e Yan, pelas risadas e pela valiosa contribuição para a minha jornada acadêmica.

Aos amigos Angélica, Franciele, Gabrielli, Lize, Mariana, Nathália, Saulo e Thaís, meu muito obrigada por torcerem e vibrarem com as minhas conquistas.

Aos colegas dos grupos de pesquisa Stream Team e Ecobiotox, por proporcionarem discussões estimulantes e me auxiliarem sempre que necessário para melhorar meu trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

Os herbicidas à base de glifosato são os mais utilizados no mundo. Este composto tóxico chega aos ecossistemas aquáticos e pode afetar populações de microalgas, que são base da teia trófica e principais produtores primários destes ambientes. Para compreender os efeitos que este agrotóxico pode ter sobre estes organismos testamos laboratorialmente a sensibilidade ao glifosato de duas espécies de algas verdes (Chlorophyta) e um possível resgate populacional. Este resgate consiste na adaptação gradual da população, que em vez da extinção, permite a ela persistir em um local que se tornou inadequado para a população original. Um experimento de duas etapas, com duração de 72 horas cada, foi conduzido. Populações de duas espécies do fitoplâncton, *Desmodesmus communis* e *Pseudopediastrum boryanum*, foram testadas de forma isolada e em coocorrência. Na etapa 1, as populações foram expostas às concentrações de 0, 100, 500, 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato preparadas a partir da formulação comercial Roundup Transorb®. Alíquotas dos tratamentos da etapa 1 foram então transferidos para os novos meios da etapa 2, onde foi adicionado 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato. A partir de dados de crescimento, densidade e viabilidade celular foram observados efeitos negativos nas duas populações isoladas e em coocorrência conforme o aumento da concentração de glifosato. O resgate populacional após a exposição a 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato foi melhor observado para as populações que anteriormente foram expostas às concentrações intermediárias de 100 e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$, sendo possível observar também que não houve diferença no resgate das populações de espécies isoladas e quando em coocorrência. Concluímos que maiores concentrações de glifosato reduzem o crescimento, a densidade e a viabilidade celular de ambas as espécies a partir de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$, e populações previamente expostas a concentrações intermediárias de glifosato apresentam melhor recuperação após exposição à uma concentração letal. Por fim, a coocorrência destas duas espécies não influencia na resistência das populações à contaminação por glifosato.

Palavras-chave: água doce, clorofíceas, herbicida, resgate evolutivo

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides are the most widely used in the world. This toxic compound reaches aquatic ecosystems and can affect populations of microalgae, which form the base of the trophic web and the main primary producers in these environments. To understand the effects that this pesticide can have on these organisms, we tested the sensitivity to glyphosate of two species of green algae (Chlorophyta) and the occurrence of a population rescue, that is, the gradual adaptation of the population, allowing it to persist in an habitat that has become unsuitable for the original population. A two-stage experiment, lasting 72 hours each, was performed. Populations of two species of phytoplankton, *Desmodesmus communis* and *Pseudopediastrum boryanum*, were examined separately and in co-occurrence. In step 1, populations were exposed to concentrations of 0, 100, 500, 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate prepared from the commercial formulation Roundup Transorb®. Aliquots of the treatments from step 1 were then transferred to the new media from step 2, where 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate were added. Using growth and density data, as well as cell viability, more negative effects were observed both in the two isolated populations and when they co-occurred as the glyphosate concentration increased. Population rescue after exposure to 20,000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate was better observed for populations that were previously exposed to intermediate concentrations of 100 and 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$, and it was also possible to observe that there was no difference in the rescue of populations of isolated species and when in co-occurrence. It can be concluded that higher concentrations of glyphosate reduce the growth, density and cell viability of both species as from 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate, but populations previously exposed to intermediate glyphosate concentrations recovered better after being exposed to a lethal concentration. Finally, the co-occurrence of these two species does not influence the resistance of the populations to glyphosate contamination.

Keywords: Chlorophyceae, evolutionary rescue, freshwater, herbicide.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação segue o modelo sugerido pelo Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais e está organizada em três partes: introdução geral, um capítulo e considerações finais. A introdução geral apresenta uma base teórica a respeito da contaminação dos ambientes aquáticos continentais por herbicidas e seus efeitos em microalgas, além da teoria de resgate evolutivo. Apresenta, ainda, os objetivos geral e específicos do trabalho. Em seguida é apresentado o manuscrito em formato de artigo, com introdução, material e métodos, resultados, discussão e referências utilizadas. O manuscrito segue as normas de formatação da revista *Phycological Research*. E, por fim, a terceira parte apresenta as considerações finais e perspectivas futuras do trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
Ambientes aquáticos e a problemática dos agrotóxicos	10
Uso de herbicidas no Brasil	12
O glifosato	13
Microalgas	15
Resgate populacional	18
OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1	26
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
Microalgas e condições experimentais	31
Delineamento experimental	32
Etapas 1 e 2	32
Quantificação de glifosato	32
Densidade celular e viabilidade	33
Análise de dados	34
RESULTADOS	35
Efeitos do glifosato no crescimento, densidade e viabilidade celular das espécies isoladas (Etapa 1)	35
Efeitos do glifosato no crescimento, densidade e viabilidade celular das espécies em coocorrência (Etapa 1)	38
Resgate populacional de espécies isoladas (Etapa 2)	41
Resgate populacional de espécies em coocorrência (Etapa 2)	41
DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS	46
MATERIAL SUPLEMENTAR	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	56

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Dispersão de pesticidas através do ciclo hidrológico. Fonte: Adaptada de Souza *et al.* (2020). 11

Figura 2. (a) *Desmodesmus communis* (Chlorophyceae); (b) *Pseudopediastrum boryanum* (Chlorophyceae). Fonte: Camila Corrêa Lourenço dos Reis (2021) 16

Figura 3. Via de degradação do composto glifosato por microrganismos. Fonte: Adaptada de Sviridov *et al.* (2015). 18

CAPÍTULO 1

Figura 1. *D. communis* isolada; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c). 36

Figura 2. *P. boryanum* isolada; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c). 37

Figura 3. *D. communis* em coocorrência; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c). 39

Figura 4. *P. boryanum* em coocorrência; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c). 40

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Esquema do delineamento experimental. Cada frasco erlenmeyer representa as 8 repetições em cada tratamento. Controle 1: sem adição de glifosato (0 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Controle 2: sem adição de glifosato (0 $\mu\text{g.l}^{-1}$) na etapa 1. Tratamentos 100, 500 e 1000: com adição de suas respectivas concentrações de glifosato na etapa 1. Abordagens: Coocorrência (ambas espécies),

Desmodesmus communis e *Pseudopediastrum boryanum*. A área sombreada indica os frascos que receberam a concentração letal de 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ na etapa 2. 53

Figura S2. Perfil de crescimento de *D. communis* (A-B) isolada e em (C-D) coocorrência durante (A, C) a etapa 1 e (B, D) a etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. 54

Figura S3. Perfil de crescimento de *P. boryanum* (A-B) isolada e em (C-D) coocorrência durante (A, C) a etapa 1 e (B, D) a etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. 55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Quantificação de glifosato das amostras após 72h do início da etapa 1, (nd) não detectado. 33

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Amostragem, indicando as diferentes etapas do experimento e a quantidade de amostras coletadas em cada etapa. 50

Tabela S2. Resultados de ANOVA (valores da estatística F) e Kruskal-Wallis (valores da estatística Qui-quadrado). 51

INTRODUÇÃO GERAL

Ambientes aquáticos e a problemática dos agrotóxicos

Os ambientes aquáticos continentais, como lagos, rios e áreas úmidas, representam apenas 0,01% da água existente no planeta, mas abrigam cerca de 9,5% do total de espécies descritas, além de proverem inúmeros benefícios para a humanidade (Reid *et al.* 2019). Assim como qualquer ambiente natural, estes ecossistemas fornecem serviços ecossistêmicos essenciais, incluindo serviços de suporte, como ciclagem de nutrientes e produção primária; serviços de provisão, como produção de alimentos e água potável; serviços de regulação, como regulação climática e polinização; e serviços culturais, como ambientes recreativos e de importância religiosa ou espiritual (Brauman *et al.* 2007). O balanço entre os processos ecossistêmicos é o que ajuda a manter estes serviços e, portanto, atividades que afetam processos como o fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes (e.g., assimilação de metais pesados na teia trófica e alteração na abundância de organismos produtores) comprometem o funcionamento desses ecossistemas e, conseqüentemente, a provisão dos serviços ecossistêmicos (Castello & Macedo 2015).

A biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas naturais vêm sendo fortemente alterados por atividades humanas, sendo que todos os ecossistemas do planeta estão, em maior ou menor grau, sujeitos a algum tipo de degradação de origem antrópica (Sala *et al.* 2000). Porém, os ambientes aquáticos continentais estão entre os que mais sofrem com pressões antropogênicas (Dudgeon *et al.* 2006). Segundo Dudgeon *et al.* (2006) existem cinco principais ameaças para a biodiversidade dos ambientes aquáticos de água doce, sendo elas: sobreexploração, como a retirada excessiva de animais para consumo humano; degradação de habitats, como a retirada de sedimento e assoreamento; espécies invasoras, como a introdução deliberada de espécies exóticas de valor econômico; modificação de fluxo em rios, como a interferência causada pela construção de represas; e poluição das águas, que se dá através da entrada de produtos químicos oriundos, principalmente, de efluentes industriais e domésticos e resíduos agrícolas. Estas ameaças podem estar interligadas e ter suas influências combinadas no ambiente, de forma a não haver um impacto mais severo do que outro (Dudgeon *et al.* 2006; Dudgeon 2019).

Cerca de 1,6 milhão de hectares de terra são usados para atividades agrícolas, o que corresponde a 12% da área total de terra firme do planeta (FAO 2021a). Essa crescente modificação de paisagens naturais em plantações para suprir a necessidade de alimento para seres humanos faz com que cerca de 1260 km³ de resíduos agrícolas, como fertilizantes e pesticidas, sejam despejados nos ambientes aquáticos anualmente (FAO 2021a). Muitos destes resíduos têm a capacidade de persistir no ambiente e afetar organismos não alvo, sendo que ao entrarem no ciclo hidrológico,

podem ser levados por longas distâncias, atingindo áreas nas quais não ocorre o uso de químicos agrícolas (Souza *et al.* 2020). Além disso, há a degradação natural dos compostos, gerando outros metabólitos tóxicos, de forma que a degradação química não anula necessariamente a toxicidade (Sviridov *et al.* 2015; Souza *et al.* 2020). Estas substâncias podem evaporar, se infiltrar no solo através da chuva e fluir para os rios e lagos, impactando o meio ambiente (Figura 1; Souza *et al.* 2020). Adicionalmente, os pesticidas frequentemente se encontram em misturas no ambiente natural, podendo apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos, levando a um aumento na toxicidade (Souza *et al.* 2020).



Figura 1. Dispersão de pesticidas através do ciclo hidrológico. Fonte: Adaptada de Souza *et al.* (2020).

Agrotóxicos, pesticidas ou defensivos agrícolas são alguns dos nomes dados a compostos utilizados intensivamente e extensivamente para aumentar a produção de alimentos através da prevenção, controle ou eliminação de pragas, como doenças fúngicas e bacterianas, eliminação de ervas daninhas e eliminação de larvas ou insetos adultos que podem prejudicar plantações

(Carvalho 2017). Agrotóxicos são usados desde 1940, devido ao aumento da população humana e correspondente necessidade do aumento da produção de alimentos (FAO 2021a). Os agrotóxicos podem ter diferentes classificações quanto à sua ação: herbicidas, fungicidas ou inseticidas, sendo que estas substâncias podem pertencer a diversas classes químicas, como os organoclorados, organofosfatos, carbamatos, piretróides, reguladores de crescimento e neonicotinóides (Albuquerque *et al.* 2016; Carvalho 2017). Os dados mais recentes da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) indicam que os países que mais utilizam pesticidas são China, Brasil, Argentina e Estados Unidos (FAOSTAT; FAO 2021b). Nos últimos 10 anos, a quantidade estimada de agrotóxicos utilizada por ano tem se mantido estável em cerca de 4,2 toneladas, sendo que a classe de agrotóxicos mais utilizada mundialmente é a dos herbicidas (FAOSTAT, FAO 2021b). Os herbicidas podem agir de diferentes maneiras para atingir seus organismos-alvo, como através da inibição da fotossíntese e, conseqüentemente, de outras reações bioquímicas formadoras de aminoácidos e lipídios, ou através do bloqueio da divisão celular e inibição do crescimento das plantas (Herrera-Herrera *et al.* 2016). Muitos herbicidas não são seletivos, podendo agir em outras plantas e organismos fotossintetizantes (Herrera-Herrera *et al.* 2016).

Uso de herbicidas no Brasil

No Brasil, os herbicidas correspondem a quase 50% do total de pesticidas comumente encontrados em águas continentais (Albuquerque *et al.* 2016). Os três herbicidas mais utilizados são os que possuem os ingredientes ativos: 2,4D, atrazina e glifosato (Brovini *et al.* 2021). As concentrações ambientais medianas comumente encontradas para estes três herbicidas são de 7,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ para glifosato, 0,05 $\mu\text{g.l}^{-1}$ para 2,4D e 0,03 $\mu\text{g.l}^{-1}$ para atrazina (Brovini *et al.* 2021). Estes valores se encontram dentro dos limites estabelecidos pela Resolução número 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 2005, que estabelece as concentrações limite de 28 pesticidas que podem ser encontradas nas diferentes classes de águas. Especificamente, as concentrações limite para as substâncias mencionadas acima são: glifosato em águas de classes 1-2 = 65 $\mu\text{g.l}^{-1}$ e classe 3 = 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$; 2,4D em águas de classes 1-2 = 4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ e classe 3 = 30 $\mu\text{g.l}^{-1}$; e atrazina em águas de classes 1-2 = 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ e classe 3 = 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Quanto à preocupação com a saúde humana, há a Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde (2017) que estabelece parâmetros para a água potável, permitindo concentrações de até 30 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de 2,4D, 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de atrazina e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato, sendo que este último é um valor acima do permitido em águas de classe 3, que são destinadas ao consumo humano após tratamento convencional ou avançado.

A produção científica acerca dos impactos destes herbicidas nos ambientes aquáticos não acompanha o crescimento de seu uso ao longo do tempo, uma vez que, mesmo o glifosato sendo o

herbicida mais utilizado, a maior parte dos trabalhos científicos realizados se concentra na atrazina (Brovini *et al.* 2021). Além disso, as concentrações de herbicidas em ambientes aquáticos podem estar subestimadas devido aos diferentes métodos de quantificação e eficácia de cada método, podendo estar acima das concentrações permitidas pela legislação brasileira (Lima *et al.* 2019). Por exemplo, o tempo de meia-vida do herbicida glifosato pode variar em função da composição do solo em que está presente, pois diferentes características físicas, químicas e biológicas afetam sua degradação (Myers *et al.* 2016). Estas variações aumentam o custo para prever e monitorar as quantidades de glifosato presentes em um ambiente ao longo de um período (Myers *et al.* 2016).

O glifosato

Os herbicidas à base de glifosato [N-(fosfonometil) glicina], que vêm sendo comercializados desde 1974, são os mais utilizados no Brasil e no mundo (Amarante Jr. *et al.* 2002; Teixeira *et al.* 2019). O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e é um herbicida de amplo espectro, pois atua inibindo uma rota de síntese de aminoácidos aromáticos típica das plantas, via do chiquimato, onde inibe a enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (Amarante Jr. *et al.* 2002). A inibição desta enzima leva à morte das plantas em alguns dias, uma vez que a mesma é essencial para a síntese de fenilalanina, tirosina e triptofano que, por sua vez, são aminoácidos essenciais para a formação dos vegetais (Amarante Jr. *et al.* 2002). Dentre as características químicas do sal de glifosato estão a alta solubilidade em água, estabilidade na presença de luz e em altas temperaturas (até 60 °C) e dissociação em pH alcalino (Amarante Jr. *et al.* 2002). A meia vida deste composto na água pode variar de 4 a 7 dias (Pérez *et al.* 2007; Vera *et al.* 2010).

As formulações à base de glifosato são usadas em uma grande variedade de cultivos no país, especialmente de soja, milho e cana-de-açúcar (Pignati *et al.* 2017). No estado do Rio Grande do Sul, o maior produtor nacional de arroz, as plantações de arroz irrigado, comumente rotacionadas com plantações de soja, são as principais responsáveis por descarregar glifosato nos corpos d'água (SOSBAI 2016). As concentrações de glifosato encontradas em ambientes de água doce costumam variar de acordo com a estação do ano, devido aos períodos de maior ou menor intensidade de cultivos e de precipitação que leva esse composto para rios e lagos (Byer *et al.* 2008; Huntscha *et al.* 2018). Portanto, as concentrações ambientais de glifosato em diferentes corpos d'água podem ser baixas, como as encontradas por Berman *et al.* (2018), com média de 2,11 $\mu\text{g.l}^{-1}$, ou altas e acima do valor permitido pela legislação brasileira, como os valores encontrados por Peruzzo *et al.* (2008) que variaram de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 700 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Atualmente, existem no mercado diversas formulações comerciais que têm o glifosato como composto ativo. Uma das formulações comerciais do glifosato é o Roundup Transorb®, que é

composto por sal de potássio de [N-(fosfonometil)glicina] = 588 g.l⁻¹ (58,8% m/v), por equivalente ácido de [N-(fosfonometil)glicina] = 480 g.l⁻¹ (48,0% m/v) e por outros ingredientes = 820 g.l⁻¹ (82,0% m/v) (ADAPAR 2022), como os surfactantes, que ajudam a aumentar a eficácia do herbicida nos organismos alvos através do rompimento de membrana (Tsui & Chu 2003). Portanto, a toxicidade desse herbicida não está restrita somente ao glifosato, pois as formulações comerciais e os ingredientes isolados demonstram diferentes níveis de toxicidade. Por exemplo, Tsui e Chu (2003) demonstraram, em testes de toxicidade com quatro grandes grupos taxonômicos (bactérias, algas, protozoários e crustáceos), que cada grupo apresenta diferente sensibilidade a cada um dos compostos do herbicida, quando testados separadamente. Porém, os autores também observaram que a formulação comercial completa é a mais tóxica, demonstrando a importância do estudo de formulações comerciais.

Ao atingir os corpos d'água, o glifosato pode afetar organismos não-alvo, desde microalgas até invertebrados e vertebrados. Em vertebrados, a exposição ao glifosato pode levar a danos hepatorreais e disfunções endócrinas (Myers *et al.* 2016). Por exemplo, Lopes *et al.* (2018) verificaram que altas concentrações do glifosato (650 e 3250 µg.l⁻¹) e de sua formulação comercial Roundup (650 e 3250 µg.l⁻¹) causaram efeitos adversos em uma linhagem de células hepáticas do peixe *Danio rerio*, levando à redução da atividade metabólica, danos à integridade lisossomal, redução da atividade da enzima glutatona *S*-transferase e aumento de células em processo de apoptose. Este processo de apoptose também foi observado por Zhang *et al.* (2021) nos tratamentos com maior concentração de glifosato, com a presença de células apoptóticas no coração, cabeça e outras partes dos animais após a exposição de embriões de *D. rerio* a cinco concentrações de 0 a 0,7 µg.l⁻¹ por um período de 72 horas. Já efeitos negativos causados pela formulação de glifosato Roundup Transorb® (500 a 5000 µg.l⁻¹) foram observados na espécie de peixe neotropical *Jenynsia multidentata*, comumente encontrada em áreas úmidas de cultivos de arroz no estado do Rio Grande do Sul (Sánchez *et al.* 2017). Os indivíduos de *J. multidentata* apresentaram redução na qualidade espermática de machos, indução de estresse oxidativo e inibição da enzima acetilcolinesterase, que possui papel essencial na regulação *in locu* da transmissão sináptica (Sánchez *et al.* 2017). Efeitos em anuros foram observados por Herek *et al.* (2020), que demonstraram que concentrações ambientais de glifosato podem causar desequilíbrio em hormônios tireoidianos que levam a malformações dos girinos, afetando aspectos como a capacidade de locomoção e obtenção de alimento. Finalmente, a toxicidade do glifosato também já foi confirmada para bivalves, como demonstrado por Haj *et al.* (2019) em modelo *ex vivo*, com dano lisossomal e citotoxicidade em células de brânquias e músculos nas maiores concentrações testadas de Roundup Transorb®. Estes organismos também podem ser afetados indiretamente, através do consumo de microalgas

contaminadas por glifosato, ocorrendo aumento das atividades de enzimas relacionadas à desintoxicação, como a glutathione *S*-transferase e a fosfatase alcalina (Iummato *et al.* 2018).

Quanto a microrganismos, os estudos têm demonstrado efeitos deletérios em diversas espécies de algas verdes (Chlorophyceae), já que este grupo compartilha com plantas diversas rotas metabólicas, como a rota de síntese de aminoácidos via chiquimato (Tohge *et al.* 2013). Por exemplo, a alga verde *Scenedesmus vacuolatus* apresentou diminuição na taxa de crescimento celular e aumento do stress oxidativo quando exposta a concentrações de 4000 a 8000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato (Iummato *et al.* 2019). Já Smedbol *et al.* (2017) observaram que, além da via do chiquimato, a atividade fotossintética, principalmente em cianobactérias, também pode ser afetada devido aos danos às membranas dos tilacóides. Porém, tais estudos avaliaram atributos isolados, como fatores fisiológicos e danos físicos, sendo necessários estudos que avaliem as respostas de populações ao longo do tempo para que seja possível verificar aspectos como a ocorrência de recuperação do crescimento de populações afetadas e mecanismos que podem estar interferindo nas respostas.

Microalgas

Microalga é um termo utilizado para se referir a organismos microscópicos fotossintetizantes, que vivem em ambientes aquáticos marinhos, de água doce e áreas úmidas, além de serem encontrados nos mais diversos tipos de ambientes que contenham umidade, como solos, turfeiras, rochas, folhas e troncos (Bicudo & Menezes 2006). Por se tratar de um grupo artificial, que não possui um ancestral comum e podendo ter diferentes origens, o termo microalgas não tem valor taxonômico (Bicudo & Menezes 2006). Dentre as microalgas há organismos procariotos, representados pela divisão Cyanobacteria (cianobactérias), e eucariotos, representados por uma maior diversidade de grupos, incluindo os principais filos, Chlorophyta (algas verdes), Euglenophyta (euglenas), Cryptophyta, Xanthophyta (algas verde-amarelas), Chrysophyta (algas douradas), Bacillariophyta (diatomáceas), Dinophyta (dinoflagelados), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas marrons) (Bellinger & Sigee 2015). Há também uma grande diversidade de formas de vida, com organismos unicelulares, filamentosos ou que formam colônias, além de organismos que vivem aderidos em alguma superfície (perifiton) ou na coluna d'água (fitoplâncton) (Bicudo & Menezes 2006).

As microalgas desempenham um papel de extrema importância nos ecossistemas, pois através da fotossíntese produzem oxigênio e são os principais produtores primários, gerando biomassa e formando a base das teias tróficas (Bellinger & Sigee 2015). O grupo mais diverso de algas é o filo Chlorophyta, com cerca de 17 mil espécies descritas, a maioria vivendo em água doce

(Raven 2014). Acredita-se que foi este grupo que deu origem às plantas terrestres, pois compartilham diversas características, como a presença de clorofilas *a* e *b*, amido presente dentro dos plastídios e parede celular formada por celulose (Raven 2014). Devido ao papel que desempenham nos ecossistemas aquáticos e à sensibilidade que estas microalgas apresentam a diversas substâncias, elas se mostram bons modelos biológicos para estudos ecotoxicológicos sobre impactos de diversos tipos de agrotóxicos, além do seu uso permitir a realização de testes de tamanho reduzido e mais baratos (Ceschin *et al.* 2021). As espécies de microalgas mais utilizadas para testes ecotoxicológicos são as algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Desmodesmus quadricauda* (Ceschin *et al.* 2021).

Nesta dissertação, utilizei como modelo de estudo as algas verdes (Chlorophyceae) *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald e *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) Menegh. (Figura 2), obtidas do Banco de Cultivo de Microalgas Dulcícolas (BCMD) da FURG, para testar a hipótese de resgate populacional, que será explicada mais à frente.

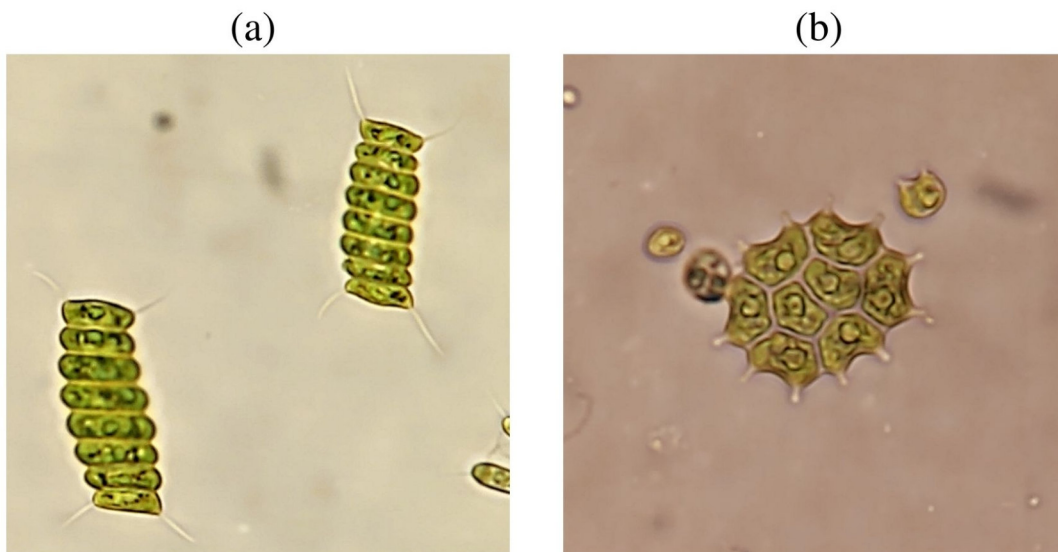
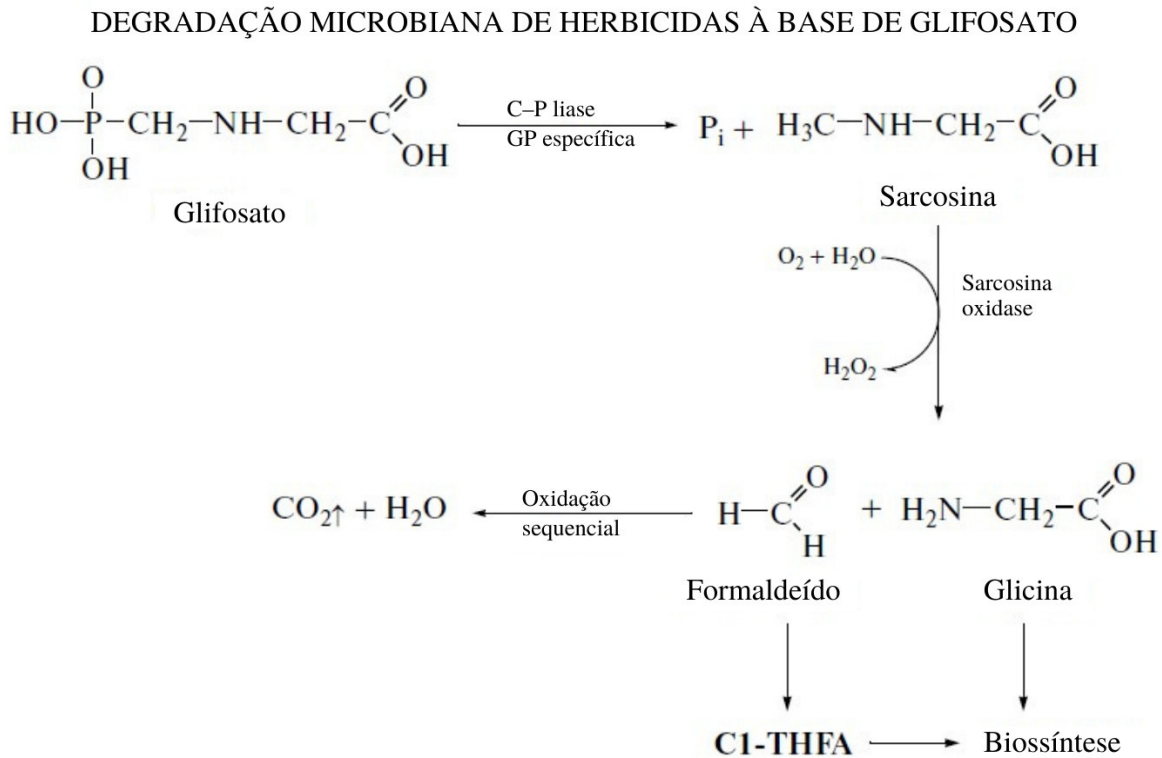


Figura 2. (a) *Desmodesmus communis* (Chlorophyceae); (b) *Pseudopediastrum boryanum* (Chlorophyceae). Fonte: Camila Corrêa Lourenço dos Reis (2021)

Smedbol *et al.* (2018) verificaram que os organismos fitoplanctônicos podem ter sua fisiologia afetadas pela presença de diferentes concentrações (de 0 a 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$) de glifosato no meio, com efeitos também sobre a diversidade e composição das comunidades. Os autores observaram relação negativa entre diversidade (medida através do índice de diversidade de Shannon) e concentração de glifosato, bem como alterações na composição de espécies, em que conjuntos diferentes de espécies sobreviveram apenas em determinadas concentrações de glifosato.

Nesse caso, espécies de Chlorophyceae dominaram em tratamentos com concentrações intermediárias de glifosato (10 a 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$), sendo substituídas por Bacillariophyceae e Cryptophyceae em concentrações de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Além disso, alterações em algumas respostas fisiológicas destes organismos quando expostos ao glifosato podem funcionar como biomarcadores (determinação quantitativa de parâmetros biológicos de organismos expostos a compostos químicos; Amorim 2003), como é o caso do crescimento celular, da produção de pigmentos fotossintéticos e do acúmulo do composto chiquimato-3-fosfato (Smedbol *et al.* 2018). Por exemplo, Lu *et al.* (2020) demonstraram que a abundância de alguns grupos do fitoplâncton é mais impactada nos primeiros cinco dias após a exposição a 2500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato, enquanto o composto ainda não decaiu, mas retornando a valores de abundância próximos ao controle após 10 dias. Isto pode ocorrer devido à capacidade de utilização do glifosato como fonte de fósforo para o crescimento celular. A molécula do glifosato contém fósforo, um nutriente essencial para o crescimento das algas, e algumas poucas algas possuem a capacidade de utilizar este fósforo presente no glifosato, como é o caso da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, que produz enzimas, fosfanatases e C-P liase, capazes de quebrar fosfonatos (Ren *et al.* 2017). Essas enzimas e vias de quebra do glifosato são mais comuns em bactérias e fungos (Figura 3; Sviridov *et al.* 2015). Além disso, as espécies fitoplanctônicas têm meios de sobreviver a um ambiente contaminado por glifosato, como através do controle da expressão de genes que controlam vias catabólicas e relacionadas à desintoxicação (Lu *et al.* 2020). Lozano *et al.* (2018) também observaram um aumento significativo na abundância total do fitoplâncton e do perifíton em relação ao controle, quando expostos por sete dias ao glifosato em concentração de 300 $\mu\text{g.l}^{-1}$ em microcosmos. Já em tratamento com mistura de glifosato e 2,4D, as comunidades foram afetadas negativamente, com o perifíton se mostrando mais resistente que o fitoplâncton, devido à estrutura complexa formada pelo biofilme, de forma que os organismos localizados mais no interior estariam menos expostos aos contaminantes (Lozano *et al.* 2018).



Metabolismo de GP (N-(fosfometil)glicina) mediado pela enzima C-P liase.
C-P: ligação carbono-fósforo. THFA: ácido tetraidrofólico.

Figura 3. Via de degradação do composto glifosato por microrganismos. Fonte: Adaptada de Sviridov *et al.* (2015).

Resgate populacional

Considerando que a presença de substâncias nocivas nos ambientes aquáticos é um fator estressor para os organismos, é necessário compreender como pode se dar a recuperação de populações e comunidades frente a condições de estresse. Dentre as formas de resgate de uma população em declínio há o resgate demográfico, que implica que haverá a imigração de novos indivíduos para um ambiente impactado para contribuir no tamanho populacional e variabilidade genética, e o resgate genético, que se dá em populações com alto nível de endocruzamento através da seleção de indivíduos híbridos (Carlson *et al.* 2014; Hufbauer *et al.* 2015). Porém, aqui será abordado o resgate evolutivo, em que a alteração de fatores ambientais mudará a dinâmica das populações devido a mudanças na frequência de certas características genéticas e fenotípicas através da adaptação evolutiva (Kovach-Orr & Fussmann 2013; Carlson *et al.* 2014). Diz-se que uma população ou uma comunidade foi resgatada quando a mesma persiste no ambiente, apesar dos danos causados pela presença de um fator estressor, como um contaminante na água (Fugère *et al.* 2020). Os fatores a

serem observados e analisados em um estudo de resgate evolutivo são aspectos como o tamanho populacional, possibilidade de variação genética e o grau de má-adaptação ao novo ambiente (Bell e Gonzalez 2009), além da presença de uma pressão seletiva, como poluentes, predadores e competição intraespecífica e interespecífica (Osmond & Mazancourt 2013). Neste estudo, avaliarei a ocorrência de resgate evolutivo de forma indireta, através da quantificação do crescimento populacional.

Especificamente com relação à competição, sabe-se que a competição intraespecífica afeta negativamente a abundância, sendo que indivíduos com menor aptidão morrem, consequentemente aumentando a aptidão média da população (Osmond & Mazancourt 2013). Porém, uma população pequena tem menor taxa de aparecimento de mutações, fazendo com que o resgate seja mais lento (Osmond & Mazancourt 2013). Já a competição interespecífica adiciona uma nova força seletiva, a sobreposição de nicho dos competidores, o que pode superar qualquer redução na abundância e consequentemente gerar maior possibilidade de resgate da população melhor competidora (Osmond & Mazancourt 2013). Ambos os mecanismos de competição agem juntos quando possível, podendo ser interdependentes, e são capazes de fornecer um resgate evolutivo das populações em condições particulares e em maior ou menor grau, pois dependem de fatores como tamanho populacional inicial, taxa de crescimento e aparecimento de novas mutações benéficas para a sobrevivência da população (Osmond e Mazancourt 2013; Amirjanov 2018). Por exemplo, García-Ulloa *et al.* (2021) acompanharam a dinâmica populacional da bactéria *Pseudomonas otitidis* durante quatro períodos de secas em uma lagoa e observaram que após um primeiro evento de pressão seletiva (seca) a população chegou próximo à extinção, mas no ano seguinte houve um pico de crescimento populacional. Após o último evento de seca, a população alcançou mil vezes o tamanho da população original, porém com a diversidade genética diminuída, pois houve pressão seletiva (gargalos genéticos) para que apenas indivíduos de maior aptidão pudessem persistir (García-Ulloa *et al.* 2021).

Populações podem ser resgatadas após uma exposição potencialmente letal a um composto tóxico, desde que a pressão seletiva não seja forte a ponto de causar a extinção da população, mas que seja suficiente para que os indivíduos com alguma tolerância sejam selecionados (Kovach-Orr & Fussmann 2013). Podemos observar isto em alguns estudos com comunidades, em que antes de serem expostas a concentrações altíssimas de poluentes, elas foram expostas a um gradiente de concentrações, desde concentrações muito baixas até concentrações elevadas subletais. Por exemplo, comunidades microbianas do solo expostas ao herbicida Dalapon se recuperaram quando haviam sido expostas previamente a doses subletais do herbicida, tendo sido observados valores similares do índice de diversidade de Shannon entre as comunidades expostas e a comunidade

controle (Low-Décarie *et al.* 2015). Também foi mostrado por Fugère *et al.* (2020) que fatores evolutivos, estimulados durante a exposição inicial a diferentes concentrações de glifosato, evitaram o colapso de uma comunidade fitoplanctônica após sua exposição a uma concentração letal de um herbicida à base de glifosato. Mesmo a diversidade alfa se mostrando 40% menor após a aplicação da concentração letal, o resgate da comunidade foi observado com o crescimento positivo de duas ou mais espécies do fitoplâncton, através da comparação da abundância e biomassa dos gêneros identificados (Fugère *et al.* 2020). Como um exemplo de resgate evolutivo populacional, mais próximo ao experimento realizado nesta dissertação, Bell e Gonzalez (2009) observaram o efeito do tamanho populacional (diferentes densidades) no resgate evolutivo de populações de leveduras expostas a um estresse letal (alta concentração de sal). Os autores demonstraram que quanto menor o tamanho populacional, menor é a possibilidade de resgate devido à menor frequência de indivíduos com características de resistência (Bell & Gonzalez 2009). De forma complementar, Gonzalez e Bell (2012) observaram a ocorrência de resgate populacional de duas espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus*) após a exposição a uma concentração letal de sal. Essas populações foram acompanhadas durante 100 gerações, sendo expostas a estresses subletais (0, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 120 e 150 g.l⁻¹ de sal) que interferiram diretamente no crescimento populacional e nos eventos de resgate evolutivo após uma exposição letal. Os autores demonstraram ainda que mesmo espécies relacionadas podem apresentar respostas distintas quanto à sensibilidade ao estressor (Gonzalez & Bell 2012). Especificamente, eventos de resgate evolutivo foram observados para as populações de *S. paradoxus* selecionadas nas mais baixas concentrações de sal (de 0 a 80 g.l⁻¹), enquanto as populações de *S. cerevisiae* obtiveram maior sucesso de resgate quando foram selecionadas em maiores concentrações (120 g.l⁻¹) (Gonzalez & Bell 2012). Para que se possa compreender melhor a importância do resgate evolutivo frente a problemas ambientais, ainda são necessários experimentos *ex situ* e *in situ* com diferentes grupos de organismos e agentes estressores. Tais estudos permitirão abordar de forma robusta o real impacto das interações complexas entre organismos e espécies e diferentes estressores presentes em um ambiente natural (Bell 2017).

OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar, em escala laboratorial, os efeitos do herbicida à base de glifosato, Roundup Transorb®, sobre duas espécies de microalgas (Chlorophyceae) isoladas e em coocorrência, além de avaliar a capacidade de recuperação destas populações após exposição à uma concentração letal do herbicida. Os objetivos específicos são:

1. Avaliar o crescimento, a densidade e a viabilidade das espécies frente a diferentes concentrações de glifosato.
2. Avaliar a tolerância das espécies ao glifosato quando expostas de forma isolada e em coocorrência.
3. Avaliar se há relação entre a exposição prévia das espécies ao glifosato e o resgate das populações após a exposição a uma concentração letal do herbicida.

REFERÊNCIAS

- ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. 2022. Roundup Transorb. [Citado em 10 de janeiro de 2022]. Disponível em: <https://www.adapar.pr.gov.br/Pagina/Agrotoxicos-Herbicidas>
- Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, J. A., Montagnerd, C. C. e Umbuzeiro, G. A. 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science Processes & Impacts* 18(7):779-787.
- Amarante Junior, O. P., Santos, T. C. R., Brito, N. M. e Ribeiro, M. L. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25(4):589-593.
- Amirjanov, A. 2018. The role of selection on evolutionary rescue. *International Journal of Modern Physics C* 29(2):1850017.
- Amorim, L. C. A. 2003. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6(2):158-170.
- Bell, G. 2017. Evolutionary Rescue. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48:605-627.
- Bell, G. e Gonzalez, A. 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters* 12:942-948.
- Bellinger, E. G. e Sigeo, D. C. 2015. *Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators*. Wiley Blackwell. 2ed.
- Berman, M. C., Marino, D. J. G., Quiroga, M. V. e Zagarese, H. 2018. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200:513-522.
- Bicudo, C. e Menezes, M. 2006. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. Rima 2ed.
- Brauman, K. A., Daily, G. C., Duarte, T. K. e Mooney, H. A. 2007. The nature and value of ecosystem services: an overview highlighting hydrologic services. *Annual Review of Environment and Resources* 32:67-98.
- Brovini, E. M., Deus, B. C. T., Vilas-Boas, J. A., *et al.* 2021. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. *Science of the Total Environment* 771:144754.
- Byer, J. D., Struger, J., Klawunn, P., Todd, A. e Sverko, E. 2008. Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: an evaluation. *Environmental Science & Technology* 42(16):6052-6057.
- Carlson, S. M., Cunningham, C. J. e Westley, P. A. H. 2014. Evolutionary rescue in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution* 29(9):521-530.
- Carvalho, F. P. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6(2):48-60.
- Castello, L. e Macedo, M. N. 2016. Large-scale degradation of Amazonian freshwater ecosystems. *Global Change Biology* 22:990-1007.

- Ceschin, S., Bellini, A. e Scalici, M. 2021. Aquatic plants and ecotoxicological assessment in freshwater ecosystems: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 28:4975-4988.
- CONAMA 2005. Resolução nº 357, Conselho Nacional do Meio Ambiente. [Citado em 10 de maio 2020]. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., *et al.* 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163-182.
- Dudgeon, D. 2019. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology* 29(19):960-967.
- FAO (2021a) The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture – Systems at breaking point. Synthesis report 2021.
- FAO (2021b) Faostat analytical brief 29. Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators 1990–2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Citado em 6 de junho de 2020]. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>
- Fugère, V., Hébert, M. P., Costa, N. B., *et al.* 2020. Community rescue in experimental phytoplankton communities facing severe herbicide pollution. *Nature Ecology & Evolution* 4:578-588.
- García-Ulloa, M. II, Escalante, A. E., Moreno-Letelier, A., Eguiarte, L. E. e Souza, V. 2021. Evolutionary rescue of an environmental *Pseudomonas otitidis* in response to anthropogenic perturbation. *Frontiers in Microbiology* 11:563885.
- Gonzalez, A. e Bell, G. 2012. Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368:20120079.
- Haj, Y. E., Bohn, S. e Souza, M. M. 2019. Tolerance of native and invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an *ex vivo* approach. *Environmental Science and Pollution Research* 26:31198-31206.
- Herek, J. S., Vargas, L., Trindade, S. A. R., *et al.* 2020. Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research* 27:22619-22630.
- Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J. e Rodríguez-Delgado, M. A. 2016. Pesticides and Herbicides: types, uses, and determination of herbicides. *Encyclopedia of Food and Health* 2016:326-332.
- Hufbauer, R. A., Szücs, M., Kasyon, E., *et al.* 2015. Three types of rescue can avert extinction in a changing environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(33):10557-10562.
- Huntscha, S., Stravs, M. A., Bühlmann, A., *et al.* 2018. Seasonal dynamics of glyphosate and AMPA in Lake Greifensee: rapid microbial degradation in the epilimnion during summer. *Environmental Science & Technology* 52:4641-4649.
- Iummato, M. M., Sabatini, S. E., Cacciatore, L. C., *et al.* 2018. Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163:69-75.

- Iummato M. M., Fassiano A., Graziano M., Afonso M. S., Molina M. C. R. and Juárez A. B. 2019. Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172:471-479.
- Kovach-Orr, C. e Fussmann, G. F. 2013. Evolutionary and plastic rescue in multitrophic model communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368:20120084.
- Lima, J. A. M. C., Labanowski, J., Bastos, M. C., *et al.* 2019. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 27:10581-10598.
- Lopes, F. M., Sandrini, J. Z. e Souza, M. M. 2018. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162:201-207.
- Low-Décarie, E., Kolber, M., Homme, P., *et al.* 2015. Community rescue in experimental metacommunities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(46):14307-14312.
- Lozano, V. L., Vinocur, A., Sabio y García, C. A. *et al.* 2018. Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148:1010-1019.
- Lu, T., Xu, N., Qi, Z., *et al.* 2020. Understanding the influence of glyphosate on the structure and function of freshwater microbial community in a microcosm. *Environmental Pollution* 260:114012.
- Ministério da Saúde. 2017. Portaria de Consolidação nº 5. [Citado em 12 de janeiro de 2022]. Disponível em: http://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETE_MBRO_2017.pdf
- Myers J. P. , Antoniou M. N. A., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L. G., *et al.* 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health* 15:19.
- Osmond M. M. and Mazancourt C. 2013. How competition affects evolutionary rescue. *Philosophical Transactions of Royal Society B* 368:20120085.
- Pérez, G. L., Torremorell, A., Mugni, H., *et al.* 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17(8):2310-2322.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A. e Ronco, A. E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156:61-66.
- Pignati, W. A., Lima F. A. N. S., Lara S. S., *et al.* 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva* 22(10):3281-3293.
- Raven, P. H., Eichhorn, S. E. e Evert, R. F. 2014. *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan. 8ed.
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., *et al.* (2019) Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews* 94:849-873.

- Ren, L., Wang, P., Wang, C., Chen, J., Hou, J. e Qian, J. 2017. Algal growth and utilization of phosphorus studied by combined mono-culture and co-culture experiments. *Environmental Pollution* 220(A):274-285.
- Sala, O. E., Chaplin, F. S., Armesto, J. J., *et al.* 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1771-1774.
- Sánchez, J. A. A., Varela, A. S., Corcini, C. D., *et al.* 2017. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 177:200-210.
- Smedbol, E., Lucotte, M., Labrecque, M., Lepage, L. e Juneau P. 2017. Phytoplankton growth and psII efficiency sensitivity to a glyphosate-based herbicide (Factor 540®). *Aquatic Toxicology* 192:265-273.
- Smedbol, E., Gomes, M. P., Paquet, S., *et al.* 2018. Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540® on an agricultural stream freshwater phytoplankton community. *Chemosphere* 192:133-141.
- SOSBAI - Sociedade Sul-brasileira de Arroz Irrigado. 2016. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado. Pelotas.
- Souza, R. M., Seibert, D., Quesada, H. B., Bassetti, F. J., Fagundes-Klen, M. R. e Bergamasco, R. 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: a review. *Process Safety and Environmental Protection* 135:22-37.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O. e Leontievsky, A. A. 2015. Microbial degradation of glyphosate herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 51(2):183-190.
- Teixeira, D. E., Paula, R. L. G. e Napolitano, H. B. 2019. Legislação e normatização para o glifosato no Brasil. *Revista Processos Químicos* 13(25):105-116.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. e Fernie, A. R. 2013. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science* 4:62.
- Tsui, M. T. K. e Chu, L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:1189-1197.
- Vera, M. S, Lagomarsino, L., Sylvester, M., *et al.* 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19:710-721.
- Zhang, W., Wang, J., Song, J., *et al.* 2021. Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 226:112854.

CAPÍTULO 1

Resgate populacional de microalgas frente a contaminação por glifosato

(Manuscrito a ser submetido para a revista Phycological Research)

Resgate populacional de microalgas frente a contaminação por glifosato

Camila Corrêa Lourenço dos Reis, Pablo dos Santos Guimarães, Thays de Andrade Guedes, Camila de Martinez Gaspar Martins, Fabiana Schneck

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande, ICB, Campus Carreiros, Rio Grande, Brasil

Email: camilaclsdosreis@gmail.com

RESUMO

Os herbicidas à base de glifosato são os mais utilizados no mundo. Este composto tóxico chega aos ecossistemas aquáticos e pode afetar populações de microalgas, que são base de teia trófica e principais produtoras primárias destes ambientes. Testamos laboratorialmente a sensibilidade ao glifosato de duas espécies de algas verdes (Chlorophyta) e um possível resgate populacional. Populações de *Desmodesmus communis* e *Pseudopediastrum boryanum* foram testadas de forma isolada e em coocorrência em um experimento de duas etapas, com duração de 72 horas cada. Na etapa 1, as populações foram expostas às concentrações de 0, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato preparadas a partir da formulação comercial Roundup Transorb®. Alíquotas dos tratamentos da etapa 1 foram então transferidos para os novos meios da etapa 2, onde foi adicionado 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato. Ao final da etapa 1, observou-se mais efeitos negativos nas duas populações isoladas e em coocorrência conforme o aumento da concentração de glifosato. Ao final da etapa 2, o resgate populacional após a exposição a 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato foi melhor observado para as populações que anteriormente foram expostas às concentrações intermediárias de 100 e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Concluímos que o glifosato, a partir da concentração de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$, reduz o crescimento, a densidade e a viabilidade celular de ambas as espécies, e populações previamente expostas a concentrações intermediárias de glifosato apresentam melhor recuperação após exposição à uma concentração letal. Além disso, a coocorrência destas duas espécies não influencia a resistência das populações ao herbicida.

PALAVRAS-CHAVE: água doce, clorofíceas, herbicida, resgate evolutivo

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides are the most widely used in the world. This toxic compound reaches aquatic ecosystems and can affect populations of microalgae, which are the basis of the trophic web and the main primary producers in these environments. We tested the sensitivity to glyphosate of two species of green algae (Chlorophyta) and the occurrence of population rescue. Populations of *Desmodesmus communis* and *Pseudopediastrum boryanum* were tested in isolation and in co-occurrence in a two-step experiment, lasting 72 hours each. In step 1, the populations were exposed to concentrations of 0, 100, 500 and 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate prepared from the commercial formulation Roundup Transorb®. Aliquots of the treatments from step 1 were then transferred to the new media from step 2, where 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate was added. At the end of step 1, more negative effects were observed in the two isolated populations and in co-occurrence as the concentration of glyphosate increased. At the end of step 2, rescue after exposure to 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ of glyphosate was better observed for populations that were previously exposed to intermediate concentrations of 100 and 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$. We conclude that glyphosate, from a concentration of 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$, reduces the growth, density and cell viability of both species, and populations previously exposed to intermediate concentrations of glyphosate show better recovery after exposure to a lethal concentration. Furthermore, the co-occurrence of these two species does not influence population resistance to the herbicide.

KEYWORDS: Chlorophyceae, evolutionary rescue, freshwater, herbicide

INTRODUÇÃO

Mudanças ambientais decorrentes de ações antrópicas, como sobre-exploração, poluição das águas, degradação de habitats, introdução de espécies invasoras e modificação de fluxo em rios são frequentes nos ambientes aquáticos (Dudgeon *et al.* 2006). Essas mudanças geram pressões seletivas sobre as populações naturais, o que pode levar à extinção ou adaptação (Carlson *et al.* 2014). Para uma população se adaptar, deve ocorrer a seleção de mutações e de variações genéticas benéficas em relação às mudanças ambientais, levando esta população a persistir em um ambiente impactado através do processo de resgate evolutivo (Carlson *et al.* 2014). Tais adaptações foram observadas com populações que, antes de serem expostas a concentrações letais de poluentes, foram expostas a um gradiente de concentrações, desde concentrações muito baixas até concentrações elevadas, mas ainda subletais (Bell 2017). Portanto, uma população pode ser resgatada após uma exposição potencialmente letal a um composto tóxico, desde que a pressão seletiva gerada não seja forte a ponto de causar a sua extinção (Kovach-Orr & Fussmann 2013). Porém a pressão tem de ser suficientemente forte para que os indivíduos tolerantes sejam selecionados, reproduzam-se e retomem o crescimento populacional em um ambiente antes hostil à população originária (Kovach-Orr & Fussmann 2013). Assim, podemos afirmar que uma população foi resgatada quando a mesma persiste no ambiente, apesar dos danos causados pela presença de um fator estressor, como a presença de um contaminante (Bell 2017).

Na natureza, há diversos fatores que agem conjuntamente, podendo ser interdependentes, e afetando a probabilidade de resgate evolutivo de uma população (Osmond & Mazancourt 2013; Carlson *et al.* 2014; Goldberg & Friedman 2021). Dentre eles, podemos citar fatores intrínsecos, como o tamanho populacional inicial e a taxa de aparecimento de mutações, e fatores extrínsecos, como a taxa de mudanças ambientais, ocorrências de interações negativas (e.g., competição e predação) (Carlson *et al.* 2014) e de interações positivas (eg., cooperação e mutualismo) (Goldberg & Friedman 2021). A competição intraespecífica afeta negativamente a abundância, sendo que os indivíduos com menor aptidão morrem, consequentemente aumentando a aptidão média da população (Osmond & Mazancourt 2013). Porém, uma população com baixa densidade sofre alterações na sua dinâmica e tem menor taxa de aparecimento de mutações, de forma que o resgate seja mais lento (Osmond & Mazancourt 2013). Quanto à competição interespecífica, a força de seleção gerada é maior devido à sobreposição de nicho dos competidores, podendo superar qualquer redução na abundância e, consequentemente, gerando maior possibilidade de resgate da população melhor competidora (Osmond & Mazancourt 2013). Já a presença de interações positivas entre duas populações reduz drasticamente a probabilidade de ocorrer resgate evolutivo, pois há a necessidade

de que as duas espécies se adaptem ao mesmo tempo frente a uma pressão seletiva (Goldberg & Friedman 2021). Caso apenas uma população se adapte, ocorre o surgimento de competição entre as duas populações, em que a população adaptada leva ao rápido declínio da população não adaptada, sendo esta forma de interação benéfica somente em ambientes estáveis (Goldberg & Friedman 2021). Apesar da maioria dos estudos que avalia resgates populacionais ser realizado com espécies isoladas (Bell 2012; Ramsayer *et al.* 2012, Lachapelle *et al.* 2015), experimentos que incluem duas ou mais espécies ou mesmo comunidades naturais vêm sendo realizados (Gonzalez & Bell 2012, Friman *et al.* 2015; Low-Décarie *et al.* 2015). Por exemplo, a exposição prévia a um herbicida à base de glifosato evitou o colapso de uma comunidade fitoplanctônica após sua exposição a uma concentração letal do herbicida, com a observação da retomada do crescimento positivo de algumas populações (Fugère *et al.* 2020). Diante do exposto, é fundamental compreendermos a capacidade de diferentes espécies em se adaptar a contaminantes quando em coocorrência com outras espécies, simulando de forma mais realista a natureza.

Dentre os contaminantes que merecem atenção estão os herbicidas, que comumente são lixiviados para ambientes aquáticos, afetando organismos não-alvo (Souza *et al.* 2020). Os herbicidas à base de glifosato [N-(fosfometil) glicina] estão entre os mais utilizados no mundo (Amarante Jr. *et al.* 2002; Teixeira *et al.* 2019) e apresentam um alto risco ambiental quanto a concentrações ambientais e efeitos toxicológicos (Brovini *et al.* 2021). As concentrações ambientais de glifosato encontradas na literatura costumam variar, pois há uma dinâmica sazonal e dependência da intensidade de cultivos que o utilizam e dos fatores ambientais, como evaporação e chuva, que levam esse composto para rios e lagos (Huntscha *et al.* 2018; Lima *et al.* 2022). Além disso, diferentes métodos de amostragem e quantificação podem gerar divergências nas concentrações reportadas na literatura (Byer *et al.* 2008; Lima *et al.* 2019; Berho *et al.* 2020). Brovini *et al.* 2021, em estudo de revisão, apontam que no Brasil este composto é detectado nos ambientes aquáticos em uma concentração ambiental média de $7,5 \mu\text{g.l}^{-1}$, que se apresenta dentro dos limites estabelecidos pela Resolução número 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), cujo valor máximo permitido em corpos d'água varia entre 65 e $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ (CONAMA 2005). Apesar de ser um composto destinado à manutenção de plantações, a sua ação não se restringe apenas a esses locais, podendo ser transportado para outros ambientes e atingir organismos não alvo (Souza *et al.* 2020). Isso porque o mecanismo de toxicidade do glifosato é de amplo espectro, já que ele atua inibindo uma rota de síntese de aminoácidos aromáticos típica das plantas, via do chiquimato, onde inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSP), levando à morte dos organismos em alguns dias devido à inibição de síntese proteica iniciada pelas EPSP (Amarante Jr. *et al.* 2002). De fato, danos causados por glifosato podem ser observados em diversos organismos (Myers *et al.* 2016), incluindo microalgas. Dentre as respostas já relatadas em microalgas estão redução de

crescimento (Smedbol *et al.* 2017), perda de espécies (Smedbol *et al.* 2018) e aumento do estresse oxidativo (Iummato *et al.* 2019).

Considerando que as microalgas desempenham papel central nos ecossistemas aquáticos como base das teias tróficas, é fundamental compreender como diferentes espécies respondem à pressão seletiva do glifosato, um dos herbicidas mais utilizados no mundo, em conjunto com uma possível pressão gerada por competição interespecífica. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, em escala laboratorial, os efeitos do herbicida à base de glifosato Roundup Transorb® e a ocorrência de resgate populacional em duas espécies de microalgas verdes (Chlorophyta), *Desmodesmus communis* (E.Hegewald) E.Hegewald 2000: 8 (Guiry & Guiry 2020) e *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) E.Hegewald 2005: 1052 (Guiry & Guiry 2021), ocorrendo isoladamente e em coocorrência. As hipóteses do trabalho foram (i) que haveria uma redução de crescimento, densidade e viabilidade celular de ambas as espécies com o aumento na concentração de glifosato no meio em uma relação dose-dependente; (ii) que a tolerância das espécies ao glifosato seria maior quando expostas de forma isolada do que em coocorrência; e (iii) que haveria uma relação positiva entre a exposição prévia das espécies ao glifosato e a retomada de crescimento, indicando a ocorrência de resgate das populações.

MATERIAL E MÉTODOS

Microalgas e condições experimentais

As cepas de microalgas das espécies *Desmodesmus communis* (CH002) e *Pseudopediastrum boryanum* (CH007) foram obtidas de culturas previamente estabelecidas pelo Banco de Cultivo de Microalgas Dulcícolas (BCMD) da FURG, registrado no CCInfo (Culture Collection for information Worldwide) da WDCM (World Data Centre for Microorganisms) com o número de registro 1124. A pré-cultura foi realizada em meio de cultivo WC (Guillard & Lorenzen 1972) por sete dias, até atingir a densidade de 10^4 cél.ml⁻¹. As microalgas foram mantidas em mesa agitadora durante toda a realização do experimento, em temperatura constante de 23 °C, fotoperíodo de 12h, rotação de 110 rpm e pH de 7,45 (no início da etapa 1), 7,92 (no fim de etapa 1), 7,23 (no início da etapa 2) e 7,5 (no fim da etapa 2). O pH foi medido com auxílio de um medidor de bancada (Hanna pH 21 - pH/mV meter). Foi utilizada uma solução de trabalho de glifosato, diluindo-se Roundup Transorb para obtenção de uma solução com concentração de 1 g.l⁻¹ de glifosato.

Delineamento experimental

O delineamento experimental consistiu de 120 frascos Erlenmeyer com capacidade de 100 ml, contendo 49 ml de meio de cultivo WC (Guillard & Lorenzen 1972) e 1 ml de inóculo. Foram definidos cinco grupos com oito repetições cada (Figura 1), sendo dois grupos controle (sem adição de glifosato) e três tratamentos com as seguintes concentrações de glifosato: 100, 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$. O controle 1 serviu como controle tanto para a etapa 1 como para a etapa 2 do experimento, enquanto o controle 2 foi utilizado na etapa 2 como o tratamento sem exposição prévia ao glifosato. Estes grupos foram repetidos em amostras com populações isoladas de *D. communis* e *P. boryanum* e em amostras com essas espécies coocorrendo. O experimento teve duração de sete dias, divididos em duas etapas de 72 horas cada, contando ainda com uma coleta final após 240 horas (7 dias) do início da etapa 2.

Etapas 1 e 2

Na etapa 1, as células da pré-cultura em concentração de 10^4 cél. ml^{-1} foram inoculadas (Figura S1), e foram adicionadas as concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato (hora zero do experimento). As amostras de todos os tratamentos foram coletadas às 0, 24, 48 e 72h. A etapa 2 ocorreu logo após a etapa 1, sendo que novos meios de cultivo foram inoculados com 1 ml de cada amostra da etapa anterior. A única concentração de glifosato usada nesta etapa foi a concentração letal de 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ nos frascos correspondentes ao controle 2 e nos tratamentos com exposição prévia ao glifosato. As amostras de todos os tratamentos foram coletadas após 0, 24, 48, 72h do início da etapa 2. Além disso, os frascos continuaram na mesa agitadora por mais 7 dias, quando foi realizada a última coleta de todos os tratamentos (240h). Assim, o experimento contou com 960 amostras (Tabela S1), sendo que 384 fizeram parte da etapa 1: 4 (controle + 3 tratamentos) \times 3 (populações isoladas + coocorrência) \times 8 (repetições) \times 4 (coletas). A etapa 2 contou com 480 amostras: 5 (controle 1 + controle 2 + tratamentos) \times 3 (populações isoladas + coocorrência) \times 8 (repetições) \times 4 (coletas). Os dados de 0h da etapa 2 foram obtidos das mesmas amostras coletadas às 72h da etapa 1, sendo que os valores de densidade foram obtidos considerando a diluição feita para o início da etapa 2.

Quantificação de glifosato

As amostras para a quantificação de glifosato foram obtidas às 0 e 72h da etapa 1 e às 0 e 72h da etapa 2, sendo imediatamente filtradas com bomba de vácuo e compressor - modelo 131

(Primatec), utilizando microfiltro de fibra de vidro GF-5 de 0,4 μm (Macherey Nagel). Para as amostras de 0h foi feita a análise apenas do meio de cultivo contendo glifosato. Para as amostras de 72h, cada tratamento de oito repetições gerou uma amostra de 20 ml, pois foi coletado 2,5 ml de cada erlenmeyer. Assim, cada tratamento (C1, C2, 100, 500, 1000) contou com três amostras, sendo cada uma proveniente de uma abordagem (coocorrência e *D. communis* e *P. boryanum* isoladas). A quantificação foi realizada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC – DAD). As leituras de cada amostras encontram-se detalhadas na tabela 1.

Tabela 1. Quantificação de glifosato das amostras após 72h do início da etapa 1, (nd) não detectado.

Tratamento (concentração previamente definida, em $\mu\text{g.l}^{-1}$)	Concentração quantificada ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
Controle	nd
100	384
500	527
1000	933
20000	21194

Densidade celular e viabilidade

A densidade e viabilidade celular foram obtidas através da análise das mesmas alíquotas coletadas em cada amostra. Para a quantificação da densidade celular, a amostra foi homogeneizada e observada em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer. A contagem de células seguiu o protocolo de Gouveia e Sobral (2020), considerando cada célula da colônia como um indivíduo. Nesta análise não foi considerada a diferença de coloração, sendo contabilizados todos os indivíduos, vermelhos e verdes (ver abaixo análise de viabilidade). Foram contados quatro ou oito quadrantes externos da lâmina, dependendo da densidade de cada amostra. Para a suficiência amostral foi considerada a contagem de pelo menos 400 indivíduos por amostra (Lourenço 2006), considerando um mínimo de quatro quadrantes, exceto nas amostras iniciais, em que o número de células é ainda muito baixo, tendo sido contados oito quadrantes.

Para a análise de viabilidade foi utilizado o método de coloração de células com corante Vermelho Neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil-fenazina) (Saul da Luz *et al.* 2016; Andrade e Sobral 2020). Cada alíquota para essas análises foi preparada com a adição de 100 μL de corante, 100 μL de formaldeído em 1 mL de amostra coletada. Foram contadas 200 células em lâmina e lamínula para cada amostra, sendo que as células coradas de vermelho foram consideradas células viáveis e as células não coradas (verdes), consideradas células não viáveis. Nos tratamentos de coocorrência foi feita a discriminação de cada espécie dentre as 400 células contadas para a densidade celular e as 200 células para a viabilidade.

Análise de dados

Para as análises estatísticas foram utilizados os dados obtidos para 72h da etapa 1, 72h da etapa 2 e 240h da etapa 2. Para calcular a taxa de crescimento, foi obtida a diferença entre o logaritmo natural da densidade (em cel.mL^{-1}) após 72h e o logaritmo natural da densidade inicial (0h). A viabilidade foi representada pela proporção de células viáveis. Análises separadas foram feitas para cada espécie, tanto isolada quanto em coocorrência.

Foram feitas análises de variância (ANOVA) de um fator (concentração de glifosato), separadamente para 72 horas da etapa 1, 72 horas da etapa 2 e 240 da etapa 2 de cada população. O teste *a posteriori* de Tukey foi aplicado quando a ANOVA foi significativa. Para dados que não atenderam aos pressupostos de normalidade (verificada utilizando o teste de Shapiro) e homogeneidade de variância (teste de Levene) foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (para quais conjuntos de dados foi utilizado ANOVA e Kruskal-Wallis e seus respectivos valores de p ver Tabela S2).

Todas as análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team 2021), utilizando os pacotes stats (R Core Team 2021) para as ANOVAS, rstatix (R Core Team 2021) para os testes de Shapiro e Levene, ggplot2 (Wickham 2016) e viridis (Garnier *et al.* 2021) para a construção de gráficos.

RESULTADOS

Efeitos do glifosato no crescimento, densidade e viabilidade celular das espécies isoladas (Etapa 1)

O crescimento celular e a densidade de *D. communis* foram similares entre o controle e o tratamento de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$, sendo significativamente maiores que o crescimento e a densidade observados nos tratamentos de 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 1A e 1D). Com relação à viabilidade celular, *D. communis* apresentou viabilidade significativamente maior no controle que em todos os tratamentos, sendo que a menor viabilidade ocorreu no tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$, que diferiu significativamente também dos tratamentos com 100 e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 1G). O crescimento celular de *P. boryanum* foi significativamente maior no controle que nos tratamentos de 100 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 2A), enquanto que para a densidade celular o controle apresentou valores maiores que todos os demais tratamentos, além do tratamento de 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ apresentar densidades maiores que os tratamentos de 100 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 2D). De forma similar, *P. boryanum* apresentou maior viabilidade celular no controle, sendo ainda observada uma redução significativa na viabilidade com o aumento da concentração de glifosato (Figura 2G).

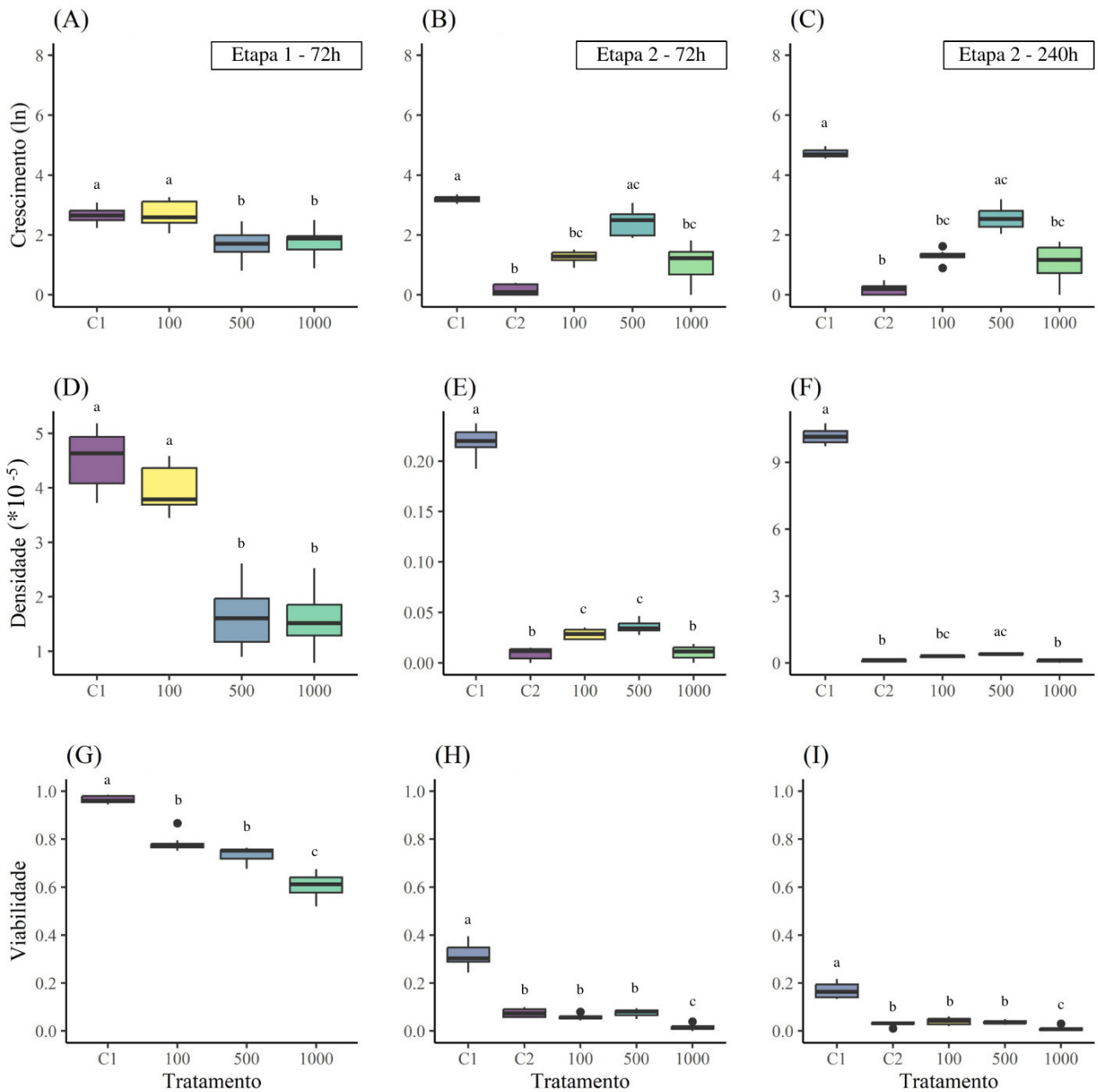


Figura 1. *D. communis* isolada; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c).

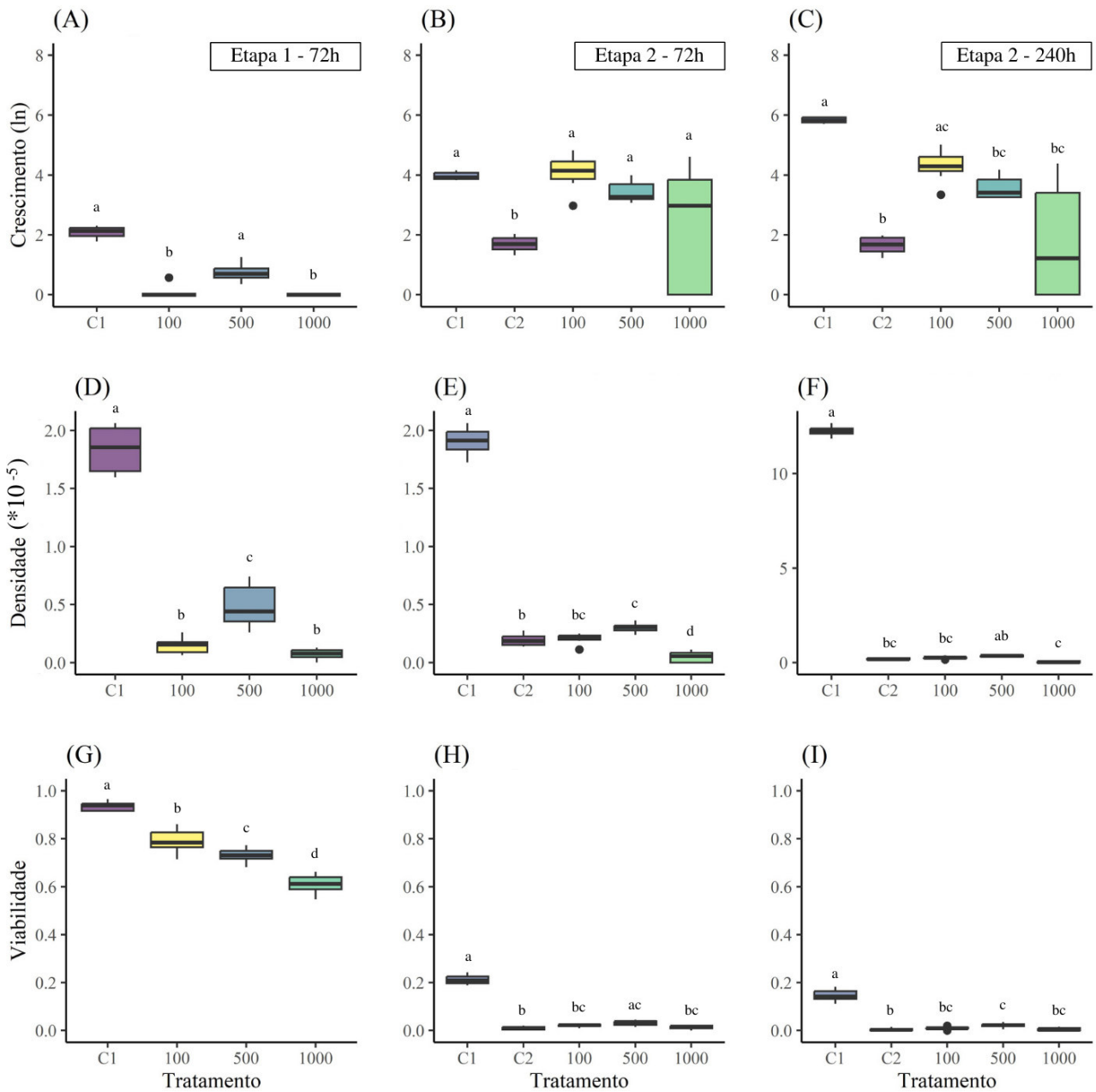


Figura 2. *P. boryanum* isolada; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 µg.l⁻¹ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c).

Efeitos do glifosato no crescimento, densidade e viabilidade celular das espécies em coocorrência (Etapa 1)

O crescimento celular de *D. communis* foi maior no grupo controle e no tratamento de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$, diferindo significativamente dos tratamentos de 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 3A). A partir do perfil de crescimento desta espécie é possível notar que a coocorrência interfere na taxa de crescimento, porém a densidade ao final do experimento é a mesma de quando ocorre de forma isolada (Figuras S2 e S3). Quanto à densidade celular, *D. communis* apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos, sendo os tratamentos de 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ os mais afetados, apresentando menor densidade celular após 72h (Figura 3D). Com relação à viabilidade celular de *D. communis*, houve diferença significativa entre todos os tratamentos, sendo possível observar a queda na proporção de células viáveis com o aumento da concentração de glifosato (Figura 3G).

Para *P. boryanum*, o crescimento do grupo controle foi significativamente maior que de todos os tratamentos, sendo que o tratamento de 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ foi menos afetado que os tratamentos de 100 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 4A). O perfil de crescimento desta espécie indica que a coocorrência interfere na taxa de crescimento, mas sem causar grande diferença na densidade ao final do experimento tanto para a espécie ocorrendo isolada ou em coocorrência (Figuras S2 e S3). Ainda, os três tratamentos com glifosato apresentaram menor densidade que o controle, sendo que o tratamento de 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ apresentou maiores densidades que os tratamentos de 100 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 4D). A viabilidade celular de *P. boryanum* apresentou padrão similar ao observado para *D. communis*, porém não havendo diferença significativa entre os tratamentos de 100 e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 4G). Além disso, o tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ foi o mais afetado para as duas espécies, com *P. boryanum* apresentando cerca de 20% de células viáveis e *D. communis* 50% (Figuras 3G e 4G).

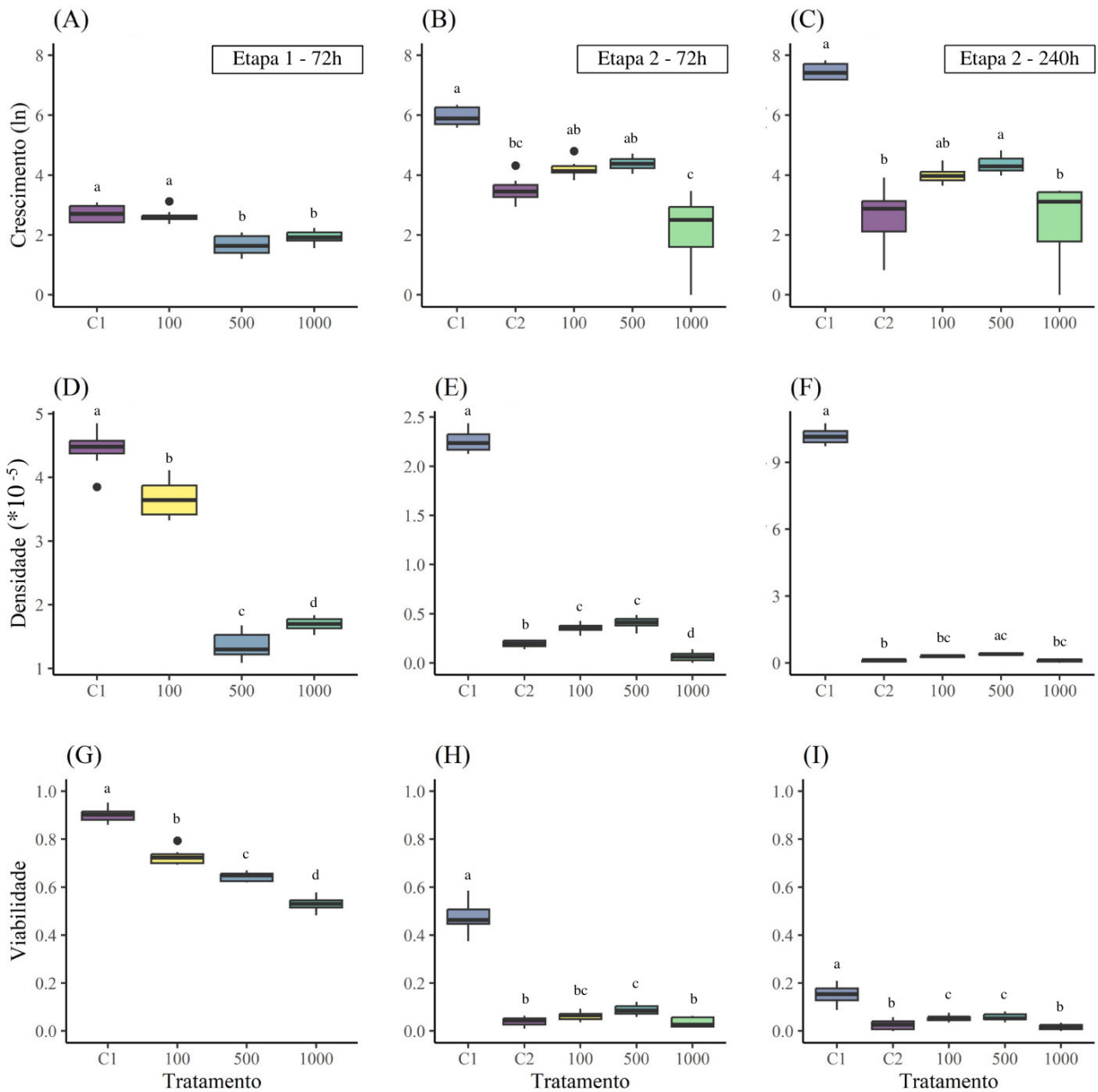


Figura 3. *D. communis* em coocorrência; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c).

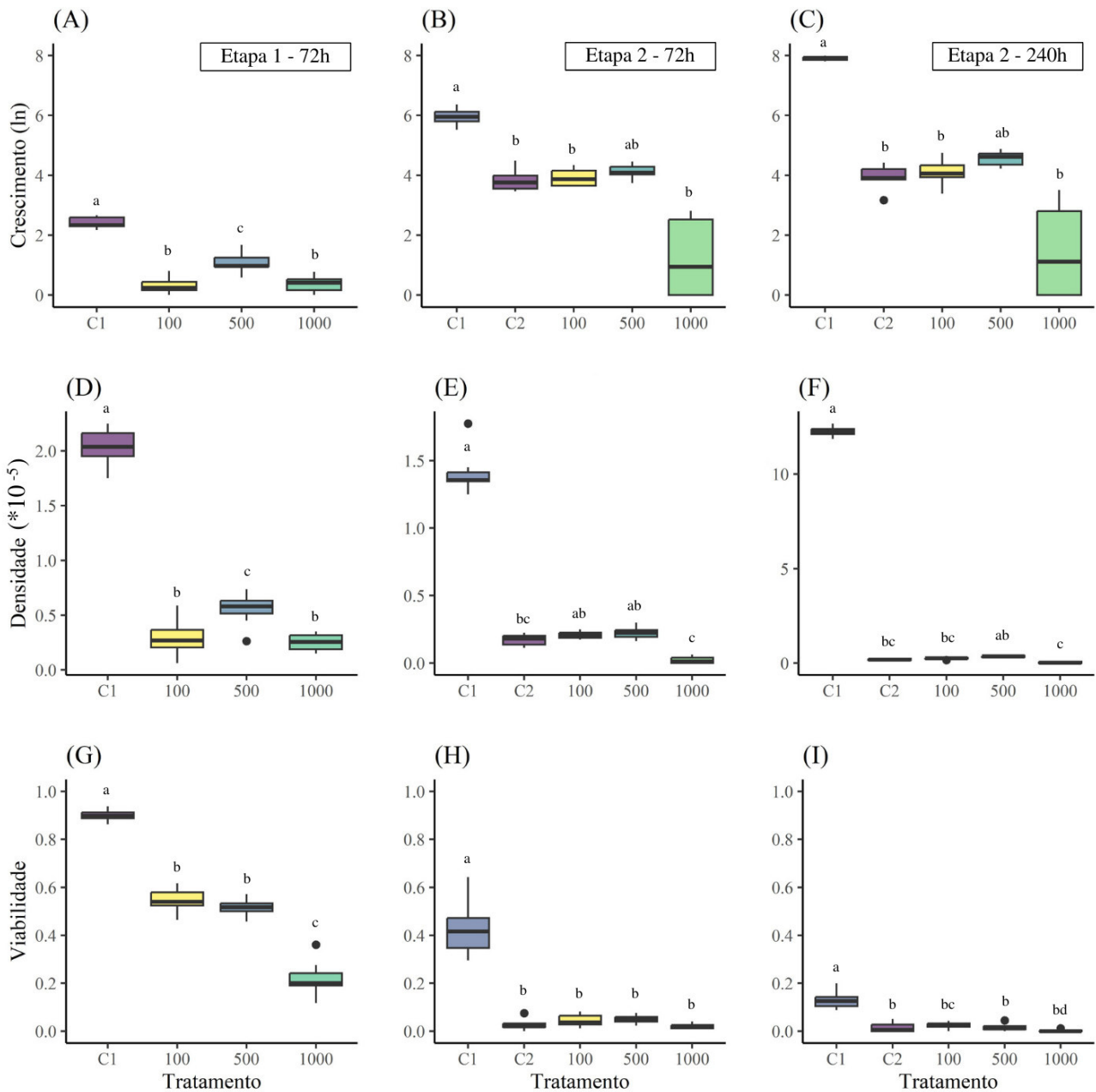


Figura 4. *P. boryanum* em coocorrência; (A-C) crescimento, (D-F) densidade, e (G-I) viabilidade após (A, D, G) 72h do início da etapa 1, (B, E, H) 72h do início da etapa 2 e (C, F, I) 240h do início da etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com $20000 \mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2. Os dados de crescimento e densidade foram calculados subtraindo o valor de densidade inicial (0h) de cada tratamento do valor obtido após 72h ou 240h de exposição. Viabilidade celular em proporção de células viáveis. Resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) foram representados por letras diferentes (a, b e c).

Resgate populacional de espécies isoladas (Etapa 2)

Para *D. communis*, o crescimento celular apresentou comportamento similar após 72h e 240h da etapa 2, com maior crescimento no controle 1 (C1) que no controle 2 (C2), onde este o tratamento com menor crescimento, apesar de não diferir significativamente dos tratamentos de 100 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 1B e 1C). A densidade celular após 72h foi maior no controle 1 do que em todos os tratamentos, tendo os tratamentos C2 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ sido os mais afetados, apresentando densidade significativamente menor que os tratamentos de 100 e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 1E). Após 240h, a densidade celular de *D. communis* permaneceu maior no controle 1, que somente não diferiu do tratamento de 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 1F). Já a viabilidade celular, apresentou comportamento semelhante após 72h e 240h, com o controle 1 apresentando maior proporção de células viáveis, diferindo significativamente de C2 e de todos os demais tratamentos, sendo o tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ o mais afetado e o único a diferir significativamente de todos os outros (Figura 1H e 1I).

Para *P. boryanum*, o menor crescimento celular após 72h ocorreu em C2, diferindo significativamente do controle 1 e de todos os tratamentos (Figura 2B). Já para as 240h da etapa 2, o controle 1 apresentou um aumento no crescimento em relação às 72h, e o C2 cresceu menos apenas em relação ao controle 1 e ao tratamento de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figura 2B e 2C). Quanto à densidade celular, após 72h da etapa 2 o controle 1 apresentou maior valor que C2 e todos os tratamentos, e o tratamento 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ foi o que apresentou menor densidade (Figura 2E). Após 240h da etapa 2, o controle 1 também apresentou a maior densidade, e mesmo os valores de C2 e dos tratamentos sendo todos baixos, houve diferença significativa entre os tratamentos de 500 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$, sendo este o mais afetado (Figura 2F). Quanto à viabilidade celular, após 72h e 240h da etapa 2 o controle 1 de *P. boryanum* apresentou os maiores valores, com cerca de 20% de células viáveis, e o grupo com menor porcentagem de células viáveis sendo o C2 (~ 0%) (Figuras 2H e 2I).

Resgate populacional de espécies em coocorrência (Etapa 2)

O crescimento celular de *D. communis* apresentou padrões similares após 72h e 240h da etapa 2, com o controle 1 apresentando maiores valores e diferindo significativamente de C2 e do tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$, sendo estes os mais afetados e não diferindo entre si (Figuras 3B e 3C). A densidade celular após 72h foi maior no controle 1 e, além disso, C2 e o tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ não apresentaram diferença entre si, apresentando as menores densidades (Figura 3E). Após 240h da etapa 2, o controle 1 também foi o que apresentou maior densidade, porém não diferiu significativamente do tratamento de 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Além disso, o C2 foi o que mais sofreu efeito negativo, porém não apresentou diferença significativa com os tratamentos de 100 e 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$

(Figura 3F). Para a viabilidade celular de *D. communis*, o controle 1 apresentou maior porcentagem de células viáveis após 72h (~50%) e após 240h (~20%), sendo que C2 e o tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ apresentaram os menores valores (~0%) (Figura 3H e 3I).

Para *P. boryanum*, o crescimento celular após 72h e 240h apresentou comportamentos semelhantes, com o controle 1 apresentando os maiores valores, enquanto o C2 e todos os demais tratamentos não apresentando diferenças significativas entre si, apesar de um menor crescimento no tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figuras 4B e 4C). Quanto à densidade celular após 72h e 240h, o controle 1 apresenta as maiores densidades e o C2 e o tratamento de 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ são os mais afetados (Figura 4E e 4F). A viabilidade celular de *P. boryanum* após 72h da etapa 2 foi maior no controle 1 (~40%), não havendo diferenças significativas entre C2 e os demais tratamentos, com valores próximos a 0% (Figura 4H). Após 240h, o controle 1 apresentou uma grande redução na viabilidade celular (~20%), mas ainda assim manteve uma viabilidade significativamente maior que todos os tratamentos (Figura 4I).

DISCUSSÃO

Os resultados da etapa 1 corroboram a hipótese de que o glifosato atua negativamente sobre o crescimento, densidade e viabilidade celular das duas espécies de microalgas estudadas, estejam elas ocorrendo isoladamente ou em coocorrência, havendo uma relação dose-dependente. O efeito da coocorrência na tolerância das espécies ao glifosato não foi observado, uma vez que os dados das populações isoladas e em coocorrência não demonstram diferenças significativas. Porém, existe uma diferença de sensibilidade, demonstrada pelo menor crescimento de *P. boryanum* que de *D. communis* nas maiores concentrações de glifosato. Esta diferença de sensibilidade também é observada na densidade celular, com *P. boryanum* demonstrando sensibilidade a partir da exposição a 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato, enquanto *D. communis* passa a ser afetada a partir de 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Já a viabilidade celular demonstrou o mesmo padrão para as duas espécies durante a etapa 1, diminuindo com o aumento da concentração de glifosato.

Ainda, os resultados de crescimento celular demonstraram haver resgate populacional, ainda que não tendo sido observada uma relação linear de maior retomada de crescimento quanto maior a exposição prévia. As populações isoladas que não haviam sido previamente expostas a doses não-letais de glifosato (i.e., C2) não foram capazes de retomar um crescimento similar ao controle, enquanto que populações previamente expostas a 100 ou 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$, a depender da espécie, apresentaram crescimento similar ao controle, seja em isolamento ou em coocorrência. Esse resultado demonstra que uma exposição prévia ao agente estressor criou alguma forma de

resistência nas populações. Porém, a exposição prévia a uma dose elevada de glifosato ($1000 \mu\text{g.l}^{-1}$) resultou em crescimento populacional reduzido e similar ao observado em populações não expostas previamente (C2).

Na literatura é comum encontrar que o glifosato pode gerar efeitos antagônicos, podendo em algumas espécies do fitoplâncton ter a capacidade de suprimir o crescimento e em outras a capacidade de estimular (Saxton *et al.* 2011; Wang *et al.* 2016). O que encontramos para as espécies deste estudo foi principalmente o efeito negativo, tanto no crescimento celular quanto na viabilidade celular, mesmo que as espécies tenham apresentado taxas de crescimento distintas. Além disso, demonstramos que a exposição à uma concentração não-letal mas elevada do herbicida torna a população menos apta para responder ao efeito de uma exposição letal posterior (i.e., $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$ na etapa 1, seguido por $20000 \mu\text{g.l}^{-1}$ na etapa 2). Estes resultados estão de acordo com estudos que testaram os efeitos do glifosato em outras algas verdes. Por exemplo, Smedbol *et al.* (2018), observaram que microalgas clorofíceas dominaram a comunidade fitoplanctônica em concentrações de $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.l}^{-1}$, demonstrando uma melhor tolerância do grupo em concentrações intermediárias. Porém, quando em concentração de $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato, a dominância deste grupo sobre a comunidade foi altamente reduzida (Smedbol *et al.* 2018). Em outro estudo, a alga verde *Chlorella vulgaris* apresentou crescimento populacional nas primeiras 24 horas após exposição a concentrações de 500 a $16000 \mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato, passando a ter seu crescimento inibido após 48 horas (Reno *et al.* 2014). No presente estudo, apesar de as populações terem estabilizado o crescimento (ver material suplementar, Figuras S2 e S3), a proporção de células viáveis observada para os tratamentos com glifosato ao final da etapa 1 foi baixa. Saul da Luz *et al.* (2016) observaram respostas semelhantes para estas mesmas espécies de microalgas, com viabilidade abaixo de 10% após 24 horas de exposição ao glifosato. Esse efeito na viabilidade pode não estar diretamente relacionado ao glifosato, mas a outros compostos presentes no Roundup Transorb. Alguns estudos comparativos demonstraram que formulações comerciais são mais tóxicas do que o composto glifosato puro (Moraes *et al.* 2021), por conter outras substâncias, como isopropilamina (IPA) e polioxietilenamida (POEA), que mostram maior toxicidade para diversas espécies de microalgas (Lipok *et al.* 2010). Por exemplo, Moraes *et al.* 2021 demonstraram que o Roundup Transorb causou maior redução no número de células e na viabilidade da cianobactéria *Synechococcus elongatus* do que o glifosato puro.

Apesar de a resistência ao glifosato ser mais rara em espécies fitoplanctônicas eucarióticas (Wang *et al.* 2016), foi possível observar culturas que, quando livres de outros organismos capazes de metabolizar esse composto, apresentaram crescimento populacional, mesmo que em taxas mais baixas devido à redução na síntese de aminoácidos (Wang *et al.* 2016). No nosso estudo, é notável

que as populações expostas a qualquer concentração do herbicida cresceram menos em relação aos seus controles e houve uma diminuição na viabilidade celular. Desta forma, a densidade populacional atingiu seu máximo dentro do ambiente limitado do erlenmeyer, sendo que a viabilidade observada ao fim do experimento pode estar relacionada ao esgotamento dos nutrientes (Vera *et al.* 2012) ou ao acúmulo de glifosato no interior das células, de forma a dificultar sua metabolização e levar à morte celular (Wang *et al.* 2016).

Podemos observar que a queda na densidade populacional e o menor crescimento ocorreram principalmente em populações que não haviam sido previamente expostas ao glifosato. Já as populações previamente expostas a concentrações intermediárias (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$), independente da espécie ou se isolada ou em coocorrência, demonstraram uma melhor retomada no crescimento. As populações que melhor se recuperaram na etapa 2 não foram as que tiveram menor queda de crescimento na etapa 1 (por exemplo algumas unidades experimentais de 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Porém seria mais lógico ocorrer o contrário, como observado por Ramsayer *et al.* (2012) em populações da bactéria *Pseudomonas fluorescens* expostas a antibióticos, em que populações remanescentes mais numerosas obtiveram vantagem e sobreviveram até o final do experimento por conterem maior quantidade de mutações favoráveis. A observação do resgate de uma população ocorre quando ela consegue se manter não em um ambiente restaurado e limpo, mas sim em um ambiente que ainda contém o agente estressor, indicando que houve adaptação (Bell & González 2009). Porém, ao fim do nosso experimento, todas as populações apresentaram viabilidade reduzida, próxima a zero. Tal resultado pode estar relacionado ao efeito conjunto do esgotamento de nutrientes e presença de herbicida. Além disso, a população pode se extinguir mesmo havendo adaptação, pois qualquer adaptação que possa ter ocorrido durante o processo de exposição às concentrações intermediárias do herbicida pode não ter se tornado permanente, ou seja, os indivíduos adaptados não apresentaram aptidão suficiente para manter o crescimento populacional (Bell 2012). Apesar de a seleção de indivíduos com a capacidade de tolerar o glifosato ser algo bom para que haja o resgate, isso implica em perda de variação genética dentro da população, e em caso de uma nova adversidade surgir, a probabilidade de extinção é maior (García-Ulloa *et al.* 2021).

O tamanho populacional inicial é um importante fator que interfere no possível resgate de uma população (Carlson *et al.* 2014). Assim, uma limitação dos nossos resultados decorre do fato das duas etapas do nosso experimento terem sido feitas sem um intervalo entre elas, sendo que as alíquotas obtidas para iniciar a etapa 2, principalmente as provenientes dos tratamentos com glifosato da etapa anterior, estavam com a densidade populacional abaixo de 10^4 cél.ml^{-1} . Este foi um passo importante para López-Rodas *et al.* (2007) em experimento com populações de *Microcystis aeruginosa*, em que após uma primeira exposição das microalgas às mais baixas

concentrações de glifosato, houve um período de crescimento até $2,3 \times 10^5$ cél.ml⁻¹ para então serem exposta à maior concentração de glifosato. Desta forma, podemos explicar a baixa densidade populacional observada para todos os tratamentos com glifosato, e além disso o crescimento celular às 72h da etapa 2 pode então ter sido subestimado. É importante salientar ainda que uma abordagem laboratorial e em escala reduzida não reflete necessariamente o que ocorre em ambientes naturais, onde há interação de uma comunidade complexa de microalgas, além de fatores externos como mudança de temperatura e aporte de outros contaminantes. De qualquer forma, nossos resultados trazem indícios dos efeitos do glifosato sobre o crescimento e viabilidade de microalgas dulcícolas.

Concluimos que as espécies de microalgas *Desmodesmus communis* e *Pseudopediastrum boryanum* sofreram decaimento populacional com as maiores concentrações de glifosato, mas, foram capazes de manter suas populações mesmos que em densidades mais baixas que os controles após a exposição a um concentração letal, e isto se deu independente das espécies estarem isoladas ou coocorrendo, não havendo evidências de interação positiva nem negativa entre elas. Os resultados deste trabalho contribuem para uma melhor compreensão sobre os efeitos de diferentes concentrações de glifosato (concentrações ambientais e acima do permitido pela legislação atual para ambientes de água doce) em microalgas dulcícolas. Por fim, nossos resultados contribuem para o conhecimento sobre a capacidade de ocorrência de resgate populacional e se os mecanismos evolutivos podem salvar populações da extinção.

REFERÊNCIAS

- Amarante Junior, O. P., Santos, T. C. R., Brito, N. M. e Ribeiro, M. L. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25(4):589-593.
- Andrade C. C. N. e Sobral M. V. 2020. Ensaio de captação do vermelho neutro. *Em Gonçalves, J. C. R. e Sobral, M. V. Cultivo de células: da teoria à bancada*. Editora UFPB, João Pessoa, pp. 114-122.
- Bell, G. 2017. Evolutionary Rescue. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48:605-627.
- Bell, G. e Gonzalez, A. 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters* 12:942-948.
- Bell, G. 2012. Evolutionary rescue of a green alga kept in the dark. *Biology Letters* 9:20120823.
- Berho, C., Robert, S., Coureau, C., Coisy, E., Berrehouc, A., Amalric, L. e Bruchet A. 2020. Estimating 42 pesticide sampling rates by POCIS and POCIS-MIP samplers for groundwater monitoring: a pilot-scale calibration. *Environmental Science and Pollution Research* 27:18565-18576.
- Brovini, E. M., Deus, B. C. T., Vilas-Boas, J. A., *et al.* 2021. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. *Science of the Total Environment* 771:144754.
- Carlson, S. M., Cunningham, C. J. e Westley, P. A. H. 2014. Evolutionary rescue in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution* 29(9):521-530.
- CONAMA 2005. Resolução nº 357, Conselho Nacional do Meio Ambiente. [Citado em 10 de maio 2020]. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., *et al.* 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163-182.
- Friman, V. P., Guzman, L. M., Reuman, D. C. e Bell, T. 2015. Bacterial adaptation to sublethal antibiotic gradients can change the ecological properties of multitrophic microbial communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282:20142920.

- Fugère, V., Hébert, M. P., Costa, N. B., *et al.* 2020. Community rescue in experimental phytoplankton communities facing severe herbicide pollution. *Nature Ecology & Evolution* 4:578-588.
- Garnier, S., Ross N., Rudis, R., Camargo, A. P., Sciaini, M. E Scherer C. 2021. Rvision - Colorblind-Friendly Color Maps for R. R package version 0.6.1
- Goldberg, Y. e Friedman, J. 2021. Positive interactions within and between populations decrease the likelihood of evolutionary rescue. *Public Library of Science Computational Biology* 17(2): e1008732.
- Gonzalez, A. e Bell, G. 2012. Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368:20120079.
- Gouveia, R. G. e Sobral, M. V. 2020. Contagem de células. *Em Gonçalves, J. C. R. e Sobral M. V. Cultivo de células: da teoria à bancada.* Editora UFPB, João Pessoa, pp. 87-93.
- Guillard, R. R. L. e Lorenzen, C. J. 1972. Yellow-Green Algae with Chlorophyllide *c*. *J. Phycology* (8):10-14.
- Guiry, M. D. e Guiry, G. M. 2020. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [Citado em 07 novembro de 2022]. Disponível em: <https://www.algaebase.org>
- Guiry, M. D. e Guiry, G. M. 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [Citado em 07 novembro de 2022]. Disponível em: <https://www.algaebase.org>
- Iummato M. M., Fassiano A., Graziano M., Afonso M. S., Molina M. C. R. and Juárez A. B. 2019. Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172:471-479.
- Kovach-Orr, C. e Fussmann, G. F. 2013. Evolutionary and plastic rescue in multitrophic model communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368:20120084.
- Lachapelle, J., Bell G. e Colegrave, N. 2015. Experimental adaptation to marine conditions by a freshwater alga. *Evolution* 69(10):2662-2675.

López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., *et al.* 2007. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evolutionary Ecology* 21:535-547.

Lima, J. A. M. C., Labanowski, J., Bastos, M. C., *et al.* 2019. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 27:10581-10598.

Lipok, J., Studnik, H. and Gruyaert, S. 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(7):1681-1688.

Lourenço, S. O. 2006. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos.

Lima, I. B., Boëchat, I. G., Fernandes, M. D., Monteiro, J. A. F., Rivaroli, L. e Gücker, B. 2022. Glyphosate pollution of surface runoff, stream water, and drinking water resources in Southeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 10.1007/s11356-022-24167-2.

Low-Décarie, E., Kolber, M., Homme, P., *et al.* 2015. Community rescue in experimental metacommunities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(46):14307-14312.

Moraes, J. S., Oliveira, T. P., Guimarães, P. S. e Martins, C. M. G. 2021. Short-term effects of glyphosate and Roundup Transorb® formulation on the cyanobacteria *Synechococcus elongatus*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 16(1):57-62.

Myers J. P. , Antoniou M. N. A., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L. G., *et al.* 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health* 15:19.

Osmond M. M. and Mazancourt C. 2013. How competition affects evolutionary rescue. *Philosophical Transactions of Royal Society B* 368:20120085.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Citado em 07 novembro de 2022]. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

Ramsayer, J., Kaltz, O. e Hochberg, M. E. 2012. Evolutionary rescue in populations of *Pseudomonas fluorescens* across an antibiotic gradient. *Evolutionary Applications* 6:608-616.

- Reno, U., Gutierrez, M. F., Regaldo, L. e Gagneten A. M. 2014. The Impact of Eskoba®, a Glyphosate Formulation, on the Freshwater Plankton Community. *Water Environment Research* 86(12):2294-2300.
- Saul da Luz, D., Silva, D. G., Souza, M. M., Giroldo, D. e Martins, C. M. G. 2016. Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Phycological Research* 64:56-60
- Saxton, M. A., Morrow, E. A., Bourbonniere, R. A. e Wilhelm, S. W. 2011. Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research* 37:683-690.
- Smedbol, E., Lucotte, M., Labrecque, M., Lepage, L. e Juneau P. 2017. Phytoplankton growth and psII efficiency sensitivity to a glyphosate-based herbicide (Factor 540®). *Aquatic Toxicology* 192:265-273.
- Smedbol, E., Gomes, M. P., Paquet, S., *et al.* 2018. Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540® on an agricultural stream freshwater phytoplankton community. *Chemosphere* 192:133-141.
- Souza, R. M., Seibert, D., Quesada, H. B., Bassetti, F. J., Fagundes-Klen, M. R. e Bergamasco, R. 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: a review. *Process Safety and Environmental Protection* 135:22-37.
- Teixeira, D. E., Paula, R. L. G. e Napolitano, H. B. 2019. Legislação e normatização para o glifosato no Brasil. *Revista Processos Químicos* 13(25):105-116.
- Vera, M., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., *et al.* 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21:1805-1816.
- Wang, C., Lin, X., Li, L. e Lin, S. 2016. Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. *Public Library of Science One* 11(3): e0151633.
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York. Springer-Verlag.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Amostragem, indicando as diferentes etapas do experimento e a quantidade de amostras coletadas em cada etapa.

Tempo de experimento	Nº da coleta	Quantidade de amostras coletadas
0h	1º	96
24h	2º	96
48h	3º	96
72h e 0h	4º	120
24h	5º	120
48h	6º	120
72h	7º	120
240h	8º	120

Tabela S2. Resultados de ANOVA (valores da estatística F) e Kruskal-Wallis (valores da estatística Qui-quadrado).

Espécie	Grupo	Etapa	F	Qui-quadrado	P
<i>D. communis</i>	Crescimento isolado	1 - 72h	12,48		< 0,001
		2 - 72h		33,689	< 0,001
		2 - 240h		33,735	< 0,001
	Crescimento coocorrência	1 - 72h	28,98		< 0,001
		2 - 72h		33,534	< 0,001
		2 - 240h		33,865	< 0,001
	Densidade isolado	1 - 72h	63,25		< 0,001
		2 - 72h	900,2		< 0,001
		2 - 240h		35,628	< 0,001
	Densidade coocorrência	1 - 72h	320,1		< 0,001
		2 - 72h	1522		< 0,001
		2 - 240h		35,628	< 0,001
	Viabilidade isolado	1 - 72h	35,772		< 0,001
		2 - 72h	136,7		< 0,001
		2 - 240h	75,19		< 0,001
Viabilidade coocorrência	1 - 72h	198,5		< 0,001	
	2 - 72h	176,8		< 0,001	
	2 - 240h	26,65		< 0,001	
<i>P. boryanum</i>	Crescimento isolado	1 - 72h		28,657	< 0,001
		2 - 72h		19,772	< 0,001
		2 - 240h		30,566	< 0,001
	Crescimento coocorrência	1 - 72h	105,9		< 0,001
		2 - 72h		31,181	< 0,001
		2 - 240h		33,113	< 0,001
Densidade	1 - 72h	274		< 0,001	

isolado	2 - 72h	1014		< 0,001
	2 - 240h		35,772	< 0,001
Densidade	1 - 72h	287		< 0,001
coocorrência	2 - 72h		31,772	< 0,001
	2 - 240h		35,772	< 0,001
Viabilidade	1 - 72h	116,3		< 0,001
isolado	2 - 72h		29,652	< 0,001
	2 - 240h	82,5		< 0,001
Viabilidade	1 - 72h	244,7		< 0,001
coocorrência	2 - 72h	90,53		< 0,001
	2 - 240h	27,8		< 0,001

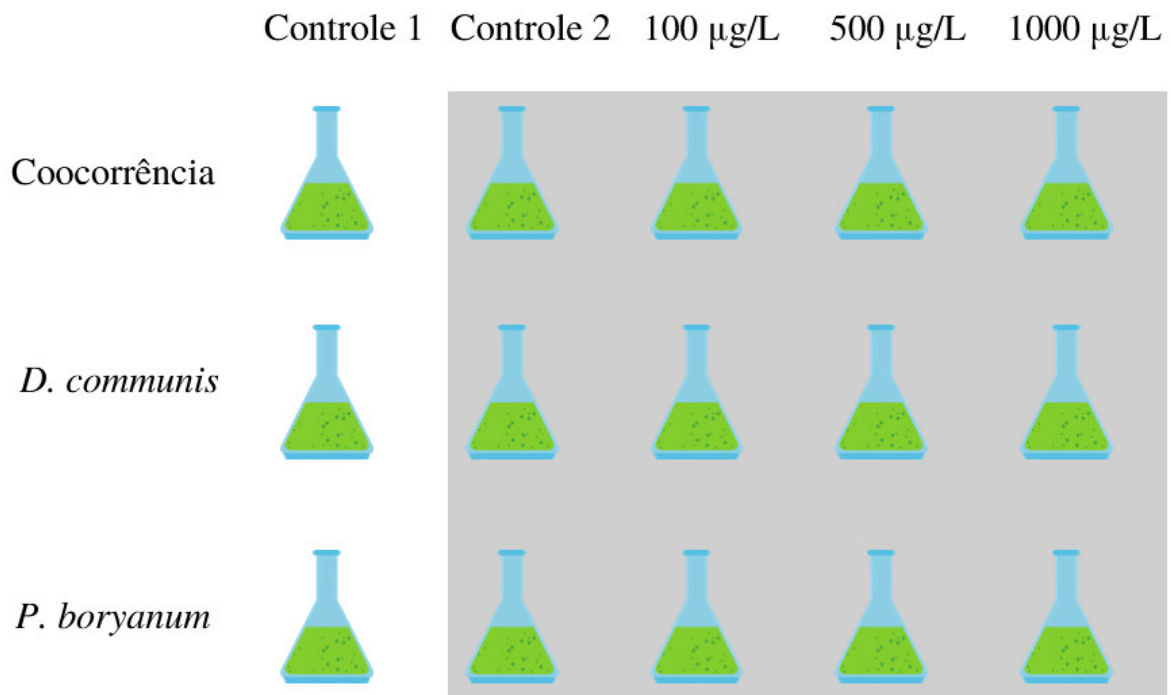


Figura S1. Esquema do delineamento experimental. Cada frasco erlenmeyer representa as 8 repetições em cada tratamento. Controle 1: sem adição de glifosato ($0 \mu\text{g.l}^{-1}$). Controle 2: sem adição de glifosato ($0 \mu\text{g.l}^{-1}$) na etapa 1. Tratamentos 100, 500 e 1000: com adição de suas respectivas concentrações de glifosato na etapa 1. Abordagens: Coocorrência (ambas espécies), *Desmodemus communis* e *Pseudopediastrum boryanum*. A área sombreada indica os frascos que receberam a concentração letal de $20000 \mu\text{g.l}^{-1}$ na etapa 2.

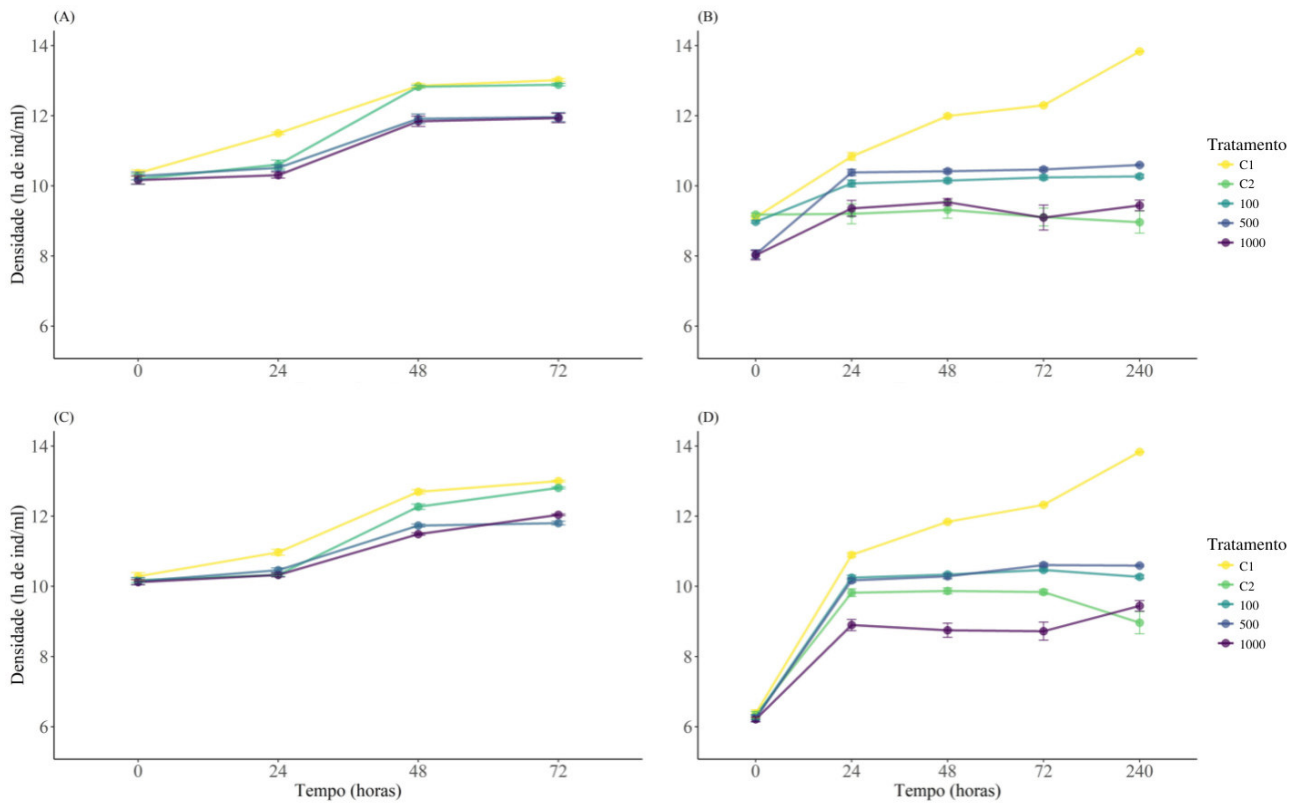


Figura S2. Perfil de crescimento de *D. communis* (A-B) isolada e em (C-D) coocorrência durante (A, C) a etapa 1 e (B, D) a etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2.

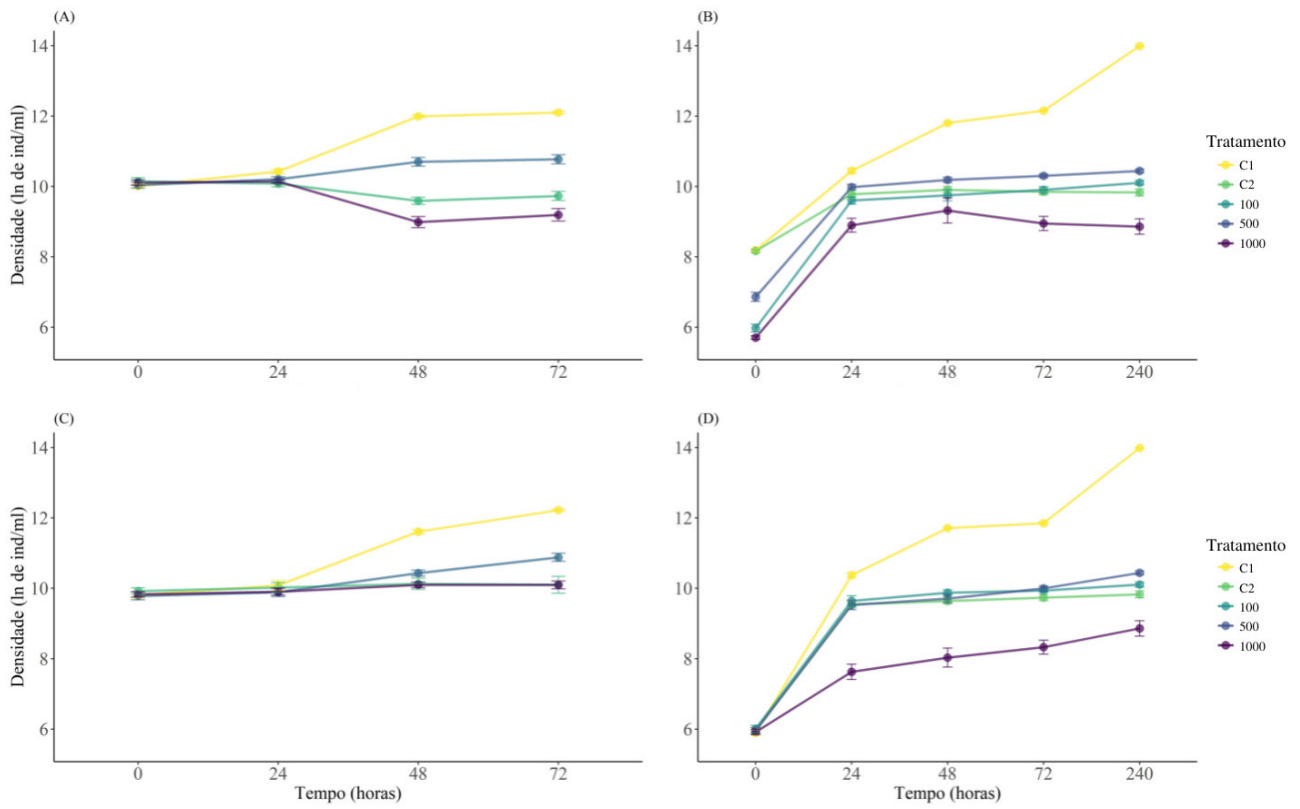


Figura S3. Perfil de crescimento de *P. boryanum* (A-B) isolada e em (C-D) coocorrência durante (A, C) a etapa 1 e (B, D) a etapa 2. C1: controle 1, sem glifosato em ambas etapas. C2: controle 2, sem glifosato na etapa 1 e com 20000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de glifosato na etapa 2.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

É inegável que herbicidas, tais como glifosato, exercem efeitos negativos em diversas espécies do fitoplâncton. Neste estudo avaliei os impactos do herbicida glifosato sobre duas espécies de microalgas clorofíceas, importantes componentes dos ambientes aquáticos. Este estudo contribui no avanço do conhecimento sobre os efeitos do glifosato em mais um dos diversos organismos não-alvos que ele pode alcançar. Mostra que exposições repentinas de populações a concentrações baixas e médias deste composto, podendo, inclusive, estar dentro do limite estabelecido pela lei ambiental, faz com que as populações não consigam manter o crescimento normal e que a quantidade de células saudáveis seja reduzida.

O resgate evolutivo é uma forma pela qual comunidades e populações conseguem se manter em ambientes que sofreram algum tipo de estresse, sendo comum encontrar na literatura diversos tipos de estressores, como aumento da temperatura, salinidade da água e contaminantes de origem antrópica. Desta forma, este estudo contribui para a discussão sobre resgates populacionais frente a um entre os diversos herbicidas utilizados na agricultura. Este trabalho mostra a importância da exposição prévia a pequenas concentrações do contaminante para que as microalgas mais resistentes possam ser selecionadas e dar continuidade a população. Ressalto que apesar de as populações conseguirem evitar a extinção através do resgate, ainda há uma substância tóxica impedindo o pleno funcionamento, mostrando a importância da não utilização destas substâncias.

Vale salientar que há formas de melhorar o trabalho. Abordei o resgate das populações em uma escala laboratorial, de forma que, para obtenção de respostas mais condizentes com o que ocorre na natureza, seria necessária a adição de diversas variáveis ambientais como interação com a comunidade, mudanças de temperatura, ciclo de chuvas e aporte de nutrientes e outros estressores. Um estudo com duração mais longa, com, por exemplo, a adição de um período após a etapa 1 para que a população se recupere para o início da etapa 2 seria fundamental. O uso de um método de quantificação da concentração de glifosato mais preciso e a quantificação de nutrientes durante o crescimento dos cultivos ajudariam na obtenção de respostas mais precisas. Além disso, a adição de mais espécies ajudaria a observar melhor o que acontece em um ambiente natural. Portanto, a realização de outros estudos considerando estes aspectos contribuirá para o entendimento do resgate populacional de algas expostas ao glifosato.

Essa dissertação fortalece a importância de estudos laboratoriais dos impactos do glifosato, que é amplamente utilizado no Brasil, de forma a ajudar a compreender um pouco as alterações que este composto causa nas populações de organismos tão importantes para a manutenção dos ecossistemas aquáticos continentais.