



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**UFMG**

**BRUNA BARÇANTE**

**DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS**  
**DURANTE UM TRATAMENTO COM PHOSLOCK EM UM**  
**RESERVATÓRIO URBANO EUTRÓFICO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração: Fisiologia Vegetal e Ecologia**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**BRUNA BARÇANTE**

**DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS**  
**DURANTE UM TRATAMENTO COM PHOSLOCK EM UM**  
**RESERVATÓRIO URBANO EUTRÓFICO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração: Fisiologia Vegetal e Ecologia**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alessandra Giani**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Coorientador: Dr. Daniel Albuquerque Pereira**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Barçante, Bruna

Dinâmica das populações de cianobactérias durante um tratamento com Phoslock em um reservatório urbano eutrófico [manuscrito] / Bruna Barçante. - 2019.

65 p. : il.

Orientadora: Alessandra Giani.


Coorientador: Daniel Albuquerque Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1.Cianobactérias. 2.cianotoxinas. 3.eutrofização. 4.phoslock. 5. reservatório da Pampulha I. Giani, Alessandra. II. Pereira, Daniel Albuquerque. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

Dissertação defendida pela mestranda Bruna Barçante, aprovada pela banca examinadora constituída pelos professores:

  
Dra. Alessandra Giani (UFMG)

  
Dr. Ricardo Motta Pinto Coelho (Universidade Federal de São João del-Rei)

  
Dra. Maria Rita Scotti Muzzi (UFMG)

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me capacitar e me guiar por caminhos que jamais imaginei trilhar.

Aos meus amados pais, Márcio e Célia, e à minha irmã Marcela, por todo o amor e apoio incondicional.

À minha querida orientadora, professora Alessandra Giani, pela confiança, paciência, orientação, incentivo e oportunidade. Eu não poderia ter orientadora melhor!!

Ao coorientador, Dr. Daniel Albuquerque, pela assistência durante as análises de cianotoxinas e doação do seu tempo.

Aos colegas do Laboratório de Ficologia pela colaboração, momentos de descontração e amizade. Agradeço especialmente à Elenice pelos conselhos, puxões de orelha e incentivo. Com certeza tive muita sorte e privilégio por conhecê-la! À Valquíria pela ajuda com as análises físico-químicas. À Laísa pela ajuda nas coletas de campo, identificações do fitoplâncton e em muitas outras coisas que precisei. Ao Leandro e à Natália pelo apoio, troca de experiências e por compartilharem comigo os momentos de ansiedade.

Aos grandes amigos da graduação que vou levar para a vida toda: Ana Carolina Carneiro, Daniele, Rogéria e Romário. Muito obrigada pelo apoio e por se fazerem sempre presentes. Agradeço de forma especial à Rogéria e à Daniele pelos momentos de cumplicidade compartilhados e pela amizade imutável!

Aos professores Ricardo Motta Pinto Coelho e Maria Rita Scotti Muzzi por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora deste trabalho e pelas excelentes contribuições.

À Prefeitura de Belo Horizonte, especialmente ao Sr. Hamilton Latorre Fortes e a sua equipe, que sempre atenderam a nossa demanda de apoio logístico para as coletas de água na Lagoa da Pampulha com muita solicitude.

Ao ICB pela disponibilização de automóveis para a realização das coletas e aos motoristas.

À Capes pela bolsa concedida durante os dois anos de mestrado, a qual foi essencial para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral e hipótese.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos e capítulos da dissertação .....</b>	<b>14</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo 1: Cyanobacterial bloom dynamics in a tropical urban eutrophic reservoir treated with a lanthanum-enriched clay.....</b>	<b>18</b>
<b>Abstract:.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Material and methods .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Sample collection and water quality measurements .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Phoslock application .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Data analysis .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Results .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Climatic, physical and chemical parameters .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Composition and biomass of the phytoplankton community.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>35</b>
<b>6. References .....</b>	<b>36</b>
<b>Capítulo 2: Cianotoxinas e sua relação com espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas em um reservatório urbano hipereutrófico.....</b>	<b>42</b>
<b>Resumo:.....</b>	<b>42</b>

<b>1. Introdução.....</b>	<b>43</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Amostragem em campo e análises físico-químicas.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. Extração e análises de microcistinas intracelulares .....</b>	<b>46</b>
<b>2.3. Extração e análises de saxitoxinas intracelulares.....</b>	<b>46</b>
<b>2.4. Análises dos dados.....</b>	<b>47</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Variações temporais das populações de cianobactérias.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Variações temporais das cianotoxinas e das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas .....</b>	<b>49</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>53</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>64</b>

## RESUMO GERAL

O reservatório da Pampulha é um importante ponto turístico da cidade de Belo Horizonte tornando-se, recentemente, Patrimônio Mundial da UNESCO. Apesar da sua grande importância econômico-cultural, o reservatório vem sofrendo ao longo de várias décadas com os impactos ambientais decorrentes da alta urbanização da sua bacia hidrográfica. Além do crônico processo de assoreamento, que levou à perda de 1/3 do seu volume, a eutrofização alterou profundamente o funcionamento de todo o ecossistema. As florações de cianobactérias representam uma das principais preocupações para os gestores públicos devido à perda estética e ao mau cheiro do local ao redor do reservatório, que é um importante ponto turístico da cidade. Além disso, as espécies de cianobactérias encontradas no reservatório são conhecidas por serem potencialmente tóxicas, podendo representar um sério risco para os cidadãos que frequentam o local.

Várias medidas vêm sendo realizadas pela prefeitura de Belo Horizonte ao longo dos últimos anos na tentativa de minimizar o atual quadro de degradação ambiental do reservatório da Pampulha, como a melhoria no sistema de tratamento e captação de esgotos, dragagem de sedimentos, controle de erosão das margens dos principais tributários e, mais recentemente, um tratamento com aplicações diárias de uma argila modificada (Phoslock®), que possui a habilidade de remover o fósforo da coluna d'água e de fixá-lo permanentemente no sedimento, tornando-o indisponível para o fitoplâncton.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, visamos avaliar a eficácia e os efeitos a longo prazo promovidos pelo tratamento com Phoslock na qualidade da água reservatório da Pampulha e nas florações de cianobactérias. No segundo capítulo, visamos estudar a atual composição das espécies de cianobactérias do reservatório da Pampulha, bem como avaliar as variações nas concentrações de cianotoxinas e a sua relação com as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. Para atender aos objetivos propostos, realizamos amostragens no reservatório da Pampulha no período de abril/2016, quando o tratamento com o Phoslock iniciou, até maio/2018.

De uma forma geral, os resultados apresentados no primeiro capítulo mostraram que o tratamento com Phoslock não alcançou os resultados esperados no reservatório da Pampulha. Embora pequenas melhorias tenham sido observadas na estrutura do fitoplâncton em dois períodos, com a diminuição significativa das populações de cianobactérias em alguns meses, possibilitando o aumento temporário da diversidade de outros grupos de algas, as cianobactérias ainda persistiram por um longo período durante o nosso estudo, representando mais de 80% do biovolume total do fitoplâncton em vários meses. Nossos resultados mostraram que o Phoslock



não foi eficaz na diminuição significativa do fósforo em um lago com um longo histórico de poluição por nutrientes como o reservatório da Pampulha. As altas concentrações de fósforo nesse reservatório, muitas vezes acima de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , favorecem a dominância permanente das cianobactérias nesse ambiente.

No segundo capítulo, mostramos que a comunidade de cianobactérias do reservatório da Pampulha é composta principalmente por espécies potencialmente tóxicas. As principais espécies observadas durante o nosso estudo foram *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *P. isothrix* e todas elas são conhecidas na literatura como potenciais produtoras das toxinas detectadas nesse trabalho. A espécie *M. aeruginosa* foi a principal preditora da presença de microcistinas no reservatório da Pampulha, enquanto que *C. raciborskii* e *Planktothrix* spp. foram as espécies preditoras da ocorrência das saxitoxinas (GTX1, GTX4, NeoSTX, dcSTX), que variaram substancialmente ao longo período de estudo de acordo com a presença das espécies potencialmente produtoras no fitoplâncton. A predominância de espécies toxigênicas no reservatório da Pampulha bem como das toxinas demonstra que medidas mais efetivas para a recuperação total desse ecossistema são urgentemente necessárias.

**Palavras-chave:** Eutrofização, cianobactérias, cianotoxinas, phoslock, reservatório da Pampulha.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figure 1.** Temporal variation of precipitation (monthly accumulation) and air temperature (mean, minimum, maximum - based in daily means) in Belo Horizonte (Brazil) during the study period. .... 23
- Figure 2.** Temporal variation of the (a) thermal water profile (°C) and (b) vertical dissolved oxygen profile (mg L<sup>-1</sup>) in Pampulha reservoir during the study period. .... 24
- Figure 3.** Temporal variation of Secchi disk depth (m) throughout the study period. Vertical dashed lines indicate periods of change in the Phoslock application or in the treatment response. (see section "Data analysis" for details). .... 25
- Figure 4.** Temporal variation of total phosphorus (TP) and soluble reactive phosphorus (SRP) at the (a) surface (0.5m) and (b) bottom layer (8.0m) of Pampulha reservoir during the Phoslock treatment period. Vertical dashed lines: as in figure 4. .... 26
- Figure 5.** Temporal variation in the phytoplankton biomass and composition and chlorophyll a concentration in Pampulha reservoir. Vertical dashed lines: as in figure 4. .... 28
- Figure 6.** Triplot redundancy analysis of the relationships found between abiotic parameters (blue arrows), biotic parameters (red arrows) and samples distribution (circles: the numbers inside the circles indicate month and year) in Pampulha reservoir (April/2016 to May/2018). The arrows indicate the direction of increase. The angles between variables reflect their correlations (angles close to 90° indicate no correlation, angles close to 0° indicate a high positive correlation and angles close to 180° indicate a high negative correlation). WT = water temperature; Rainf = rainfall; Transp = water transparency; DO = dissolved oxygen; EC = electrical conductivity; pH = hydrogenation potential; TP = total phosphorus; NH<sub>4</sub> = ammonium; NO<sub>2</sub> = nitrite; NO<sub>3</sub> = nitrate; SRP= soluble reactive phosphorus; Chla = chlorophyll-a; CyanoTotal = total biomass of cyanobacteria. See text for explanation of the three colored ellipses. .... 29

### Capítulo 2

- Figura 1.** Variação temporal da biomassa das principais espécies de cianobactérias e do biovolume total do fitoplâncton no reservatório da Pampulha, no período de estudo. .... 48
- Figura 2.** Correlações entre concentração de toxina e biovolume da potencial espécie produtora (A, C, E, G) e variação temporal da toxina e da potencial espécie produtora (B, D, F, H) no reservatório da Pampulha, no período de estudo (dados transformados em raiz quadrada - sqrt). .... 51
- Figura 3.** Gráfico “triplot” da análise de redundância das relações encontradas entre as espécies de cianobactérias (setas pretas), toxinas (setas cinzas) e a distribuição das amostras (círculos: os números dentro dos círculos indicam mês e ano) no reservatório da Pampulha (abril/2016 a maio/2018). As setas indicam a direção do aumento. Os ângulos entre as variáveis refletem suas correlações (ângulos próximos a 90° não indicam correlação, ângulos próximos a 0° indicam correlação positiva alta e ângulos próximos a 180° indicam uma alta correlação negativa). C.raci = *Cylindrospermopsis raciborskii*; M.aeru = *Microcystis aeruginosa*; P.agar = *Planktothrix agardhii*; P.iso = *Planktothrix isothrix*; MC = microcistina; GTX4 = goniautoxina 4; GTX1 = goniautoxina 1; dcSTX = decarbamoilsaxitoxina; NeoSTX = neosaxitoxina. .... 52

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Table 1.</b> Redundancy analysis scores to axis-1 (RDA1) and axis-2 (RDA2) for biotic and environmental variables. ....	30
--	----

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros dos modelos de regressões múltiplas das relações entre as espécies de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e as variáveis ambientais. ....	49
<b>Tabela 2.</b> Escores da análise de redundância para o eixo-1 (RDA1) e eixo-2 (RDA2) para as cianotoxinas e as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. ....	53

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os reservatórios urbanos são ecossistemas de extrema importância para a qualidade de vida das populações das cidades, proporcionando uma série de serviços ambientais, como abastecimento de água, amortecimento de cheias, regulação do clima, além do seu valor para a recreação. Entretanto, atividades antropogênicas têm favorecido a eutrofização destes sistemas e, com isso, o aumento de florações de cianobactérias, refletindo em danos na sua integridade ecológica, com sérias consequências na sua qualidade de água para atividades humanas.

As cianobactérias são organismos procariontes, fotossintetizantes, que podem ser encontrados em diferentes habitats, como ambientes de água doce, marinhos e, até mesmo, ambientes terrestres. Esses organismos são importantes produtores primários nos ecossistemas aquáticos de água doce, no entanto, seu crescimento excessivo, geralmente ocasionado por desequilíbrios ecológicos provocados por atividades humanas, têm gerado grandes preocupações a nível mundial para a gestão dos reservatórios urbanos (Chorus e Bartram, 1999; Brookes e Carey, 2011; O’Neil et al., 2012, Paerl e Otten, 2013). Muitos gêneros de cianobactérias podem produzir toxinas nocivas capazes de causar efeitos deletérios à saúde humana como, por exemplo, gastroenterites, dermatites, problemas no sistema nervoso, insuficiência hepática e, em altas concentrações, até morte (Carmichael e Boyer, 2016).

Muitos fatores favorecem o crescimento das cianobactérias (ver, por exemplo, Reynolds e Walsby, 1975), porém, a eutrofização é reconhecida como um dos principais impulsionadores do seu aumento nos ambientes aquáticos, promovendo alterações na estrutura do fitoplâncton (Fogg, 1969; Paerl, 1988; Conley et al., 2009; Smith e Schindler, 2009). Nesse sentido, os programas de recuperação de lagos eutróficos em todo o mundo têm tradicionalmente concentrado a sua atenção na redução das fontes externas de nutrientes (Kleeberg e Kozerski, 1997). Embora tanto o fósforo quanto o nitrogênio sejam importantes no desenvolvimento das florações de cianobactérias (Downing et al., 2001; Giani et al., 2005; Elser et al., 2007; Paerl e Huisman, 2009), o fósforo é historicamente considerado como o principal nutriente limitante em ecossistemas de água doce (Schindler, 1974; Schindler, 1977; Kaebernick e Neilan, 2001; Schindler et al., 2008) e, por isso, tem sido o principal alvo para o controle da eutrofização.

Além da necessidade de se reduzirem as fontes externas de fósforo (Cooke et al., 2005; Welch e Cooke, 2005), a carga interna deste elemento, conhecida como “*internal P-loading*”, também precisa ser controlada para que a restauração efetiva do lago seja garantida, tendo em vista que a liberação do fósforo a partir dos sedimentos pode atrasar o seu tempo de recuperação (Moos et al., 2014; Waajen et al., 2016). A argila ionicamente modificada com lantânio, conhecida

comercialmente como Phoslock®, é um material de geo-engenharia que vem ganhando destaque no controle da carga interna de fósforo em lagos eutróficos. Essa argila remove o fósforo da coluna d'água e o fixa no sedimento, tornando-o indisponível para o fitoplâncton (Spears et al., 2013; Copetti et al., 2016). Embora alguns trabalhos tenham relatado a efetividade do Phoslock na redução das populações de cianobactérias e no aumento da diversidade do fitoplâncton em escala de campo (Bishop et al., 2014; Bishop et al., 2018), outros trabalhos demonstraram que o tratamento não atingiu os resultados esperados na redução do fósforo ou, ainda, que os efeitos positivos observados no fitoplâncton não foram sustentados a longo prazo (Lang et al., 2016).

O reservatório da Pampulha, objeto de estudo do presente trabalho, é um pequeno lago tropical localizado em uma área de captação densamente povoada na cidade de Belo Horizonte, cercada por indústrias e pela agricultura intensiva, o que torna o lago extremamente vulnerável à poluição causada por esgotos domésticos e industriais não completamente tratados e pelo escoamento superficial. Além da eutrofização, o reservatório tem sofrido um severo processo de assoreamento que resultou na perda de um terço da sua superfície (Resck et al., 2007). Devido a sua importância cultural para a cidade de Belo Horizonte, a prefeitura vem realizando diversas medidas na tentativa de reduzir a eutrofização do reservatório da Pampulha, minimizar os incômodos provocados pelas florações de cianobactérias, que se tornaram persistentes no reservatório nos últimos anos (Figueredo et al., 2016), e recuperar a qualidade de água da lagoa. Dentre essas medidas, destaque-se um tratamento em larga escala, baseado em aplicações diárias de Phoslock em todo o reservatório, que teve início em abril de 2016.

Embora o Phoslock tenha sido aplicado em alguns ecossistemas aquáticos eutróficos ao redor do mundo (Spears et al., 2016), os efeitos do tratamento no ambiente, que abordem as respostas do fitoplâncton, são raros e, geralmente, disponíveis apenas para lagos de regiões temperadas (por exemplo, Bishop et al., 2014; Lang et al., 2016). As informações sobre as respostas das populações de cianobactérias durante tratamento com Phoslock em lagos tropicais são, portanto, necessárias e podem revelar informações adicionais que podem desempenhar um papel fundamental na tomada de decisões em planos de gestão desses lagos que são muito vulneráveis a florações persistentes de cianobactérias potencialmente tóxicas.

## **2. OBJETIVOS E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

### **2.1 Objetivo geral e hipótese**

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a eficácia global do tratamento com Phoslock® no reservatório da Pampulha, um lago hipereutrófico, com um longo histórico de poluição com altas cargas de nutrientes.

A hipótese principal deste estudo foi que o tratamento com Phoslock® levaria a uma mudança no mecanismo interno de circulação do fósforo, o que resultaria em uma redução progressiva das populações de cianobactérias e no aumento da diversidade de outros grupos do fitoplâncton.

Os resultados do estudo estão apresentados na forma de dois capítulos, cujos objetivos específicos serão apresentados a seguir.

### **2.2 Objetivos específicos e capítulos da dissertação**

1- No primeiro capítulo, objetivou-se:

- Avaliar a eficácia e os efeitos a longo prazo promovidos pelo tratamento com Phoslock na qualidade da água reservatório da Pampulha e nas florações de cianobactérias.
- Acompanhar as eventuais mudanças ocorridas na estrutura do fitoplâncton durante as aplicações.

2- No segundo capítulo, objetivou-se:

- Avaliar a composição das espécies de cianobactérias do reservatório da Pampulha no período de estudo.
- Investigar quais cianotoxinas ocorrem nesse ambiente e avaliar a sua relação com as espécies de cianobactérias encontradas, visando identificar quais são as prováveis espécies produtoras dessas toxinas.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bishop, W.M., Hyde, S., McNabb, T., Cormican, I., Willis, B.E., 2014. Operational evaluation of Phoslock phosphorus locking technology in Laguna Niguel Lake, CA. *Water, Air, Soil Pollut.* 225: 1-11.
- Bishop, W.M., Richardson, R.J., 2018. Influence of Phoslock® on legacy phosphorus, nutrient ratios, and algal assemblage composition in hypereutrophic water resources. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 4544-4557.
- Brookes, J.D., Carey, C.C., 2011. Resilience to Blooms. *Science* 334: 46-47.
- Carmichael, W.W., Boyer, G.L., 2016. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae.* 54: 194-212.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* World Health Organization/E&FN Spon/Routledge, London.
- Conley, D.J., Paerl, H.W., Howarth, R.W., Boesch, D.F., Seitzinger, S.P., Karl E. Havens, K.E., Lancelot, C., Likens, G.E., 2009. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science* 323: 1014-1015.
- Cooke, G.D.; Welch, E.B.; Peterson, S.A.; Nichols, S.A., 2005. *Restoration and Management of Lakes and Reservoirs*; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
- Copetti, D., Finsterle, K., Marziali, L., Stefani, F., Tartari, G., Douglas, G., Reitzel, K., Spears, B.M., Winfield, I.J., Crosa, G., D'haese, P., Yasserli, S., Lürling, M., 2016. Eutrophication management in surface waters using lanthanum modified bentonite: a review. *Water Res.* 97: 162-174.
- Downing, J.A., Watson, S.B., McCauley, E., 2001. Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 1905-1908.
- Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., et al., 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 10: 1135-42.
- Figueredo, C.C., Pinto-Coelho, R.M., Lopes, A.M.M.B., Lima, P.H.O., Gücker, B., Giani, A., 2016. From intermittent to persistent cyanobacterial blooms: identifying the main drivers in an urban tropical reservoir. *J. Limnol.* 75: 445-454.
- Fogg, G.E., 1969. The physiology of an algal nuisance. *Proceedings of the Royal Society London B* 173: 175-189.
- Giani, A., Bird, D., Prairie, Y., Lawrence, J., 2005. Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62: 2100-2109.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 1-9.

- Kleeberg, A., Kozerski, H.P., 1997. Phosphorus release in Lake Grosser Müggelsee and its implications for lake restoration. *Hydrobiologia* 342/343: 9–26.
- Lang, P., Meis, S., Procházková, L., Carvalho, L., Mackay, E.B., Woods, H.J., Pottier, J., Milne, I., Taylor, C., Maberly, S.C., Spears, B.M., 2016. Phytoplankton community responses in a shallow lake following lanthanum-bentonite application. *Water Res.* 97: 55-68.
- Moss, M.T., Taffs, K.H., Longstaff, B.J., Ginn, B.K., 2014. Establishing ecological reference conditions and tracking post-application effectiveness of lanthanum saturated bentonite clay (Phoslock®) for reducing phosphorous in aquatic ecosystems: an applied paleolimnological approach. *J. Environ. Manage.* 141: 77-85.
- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313-334.
- Paerl, H.W., 1988. Nuisance phytoplanktonic blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnol. Oceanogr.* 33: 823-847.
- Paerl, H.W., Huisman J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Rep.* 1: 27-37.
- Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65: 995–1010.
- Resck, R.P., Bezerra-Neto, J.F., Pinto-Coelho, R.M., 2007. Nova batimetria e avaliação de parâmetros morfológicos da Lagoa da Pampulha (Belo Horizonte, Brasil). *Geografias Artigos Científicos*, Belo Horizonte, 3: 24-37.
- Reynolds, C.S., Walsby, A.E., 1975. Water-blooms. *Biol. Rev.*, 50: 437-481.
- Schindler, D.W., 1974. Eutrophication and Recovery in Experimental Lakes: Implications for Lake Management. *Science* 184: 897–899.
- Schindler, D.W., 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* 195: 260-262.
- Schindler, D.W.; Hecky, R.E.; Findlay, D.L.; Stainton, M.P.; Parker, B.R.; Paterson, M.; Beaty, K.G.; Lyng, M.; Kasian, S.E.M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37 year whole ecosystem experiment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 11254-11258.
- Smith, V.H., Schindler, D.W., 2009. Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends Ecol. Evol.* 24: 201-207.
- Spears, B.M., Lurling, M., Yasserli, S., Castro-Castellon, A.T., Gibbs, M., Meis, S., McDonald, C., McIntosh, J., Sleep, D., Van Oosterhout, F., 2013. Lake responses following lanthanum-modified bentonite clay (Phoslock®) application: an analysis of water column lanthanum data from 16 case study lakes. *Water Res.* 47: 5930-5942.
- Spears, B.M., Mackay, E.B., Yasserli, S., Gunn, I.D.M., Waters, K.E., Andrews, C., Cole, S., De Ville, M., Kelly, A., Meis, S., Moore, A.L., Nürnberg, G.K., van Oosterhout, F., Pitt, J.A., Madgwick, G., Woods, H.J., Lürling, M., 2016. A meta-analysis of water quality and aquatic



macrophyte responses in 18 lakes treated with lanthanum modified bentonite (Phoslock®). *Water Res.* 97: 111–121.

Waajen, G., van Oosterhout, F., Douglas, G., Lürling, M., 2016. Geo-engineering experiments in two urban ponds to control eutrophication. *Water Res.* 97: 69-82.

Welch, E.B., Cooke, G.D., 2005. Internal Phosphorus Loading in Shallow Lakes: Importance and Control. *Lake Reserv. Manag.* 21: 209–217.

## CAPÍTULO 1

---

### **Cyanobacterial bloom dynamics in a tropical urban eutrophic reservoir treated with a lanthanum-enriched clay**

Bruna Barçante, Nilo O. Nascimento, Talita F.G. Silva, Alessandra Giani

**Abstract:** Environmental degradation leads to increasing eutrophication in aquatic systems and intensification of potentially toxic cyanobacteria blooms. External nutrient inputs are accounted as main causes of bloom occurrence, but studies revealed that phosphorus released from sediments accelerates eutrophication. In-lake sediment treatments have been presented as additional manipulation methods to reduce internal loading. Here we will present results from a study performed in a eutrophic reservoir in Brazil with persistent blooms following a large-scale application of a lanthanum-enriched clay (Phoslock®), designed to precipitate phosphorus from the water column and bind it in the sediments. Our aim was to evaluate the effectiveness of the treatment on bloom reduction and record changes in the phytoplankton community. Sampling was performed during 50 months. Overall, the treatment did not reach the expected results and phosphorus concentration did not decrease significantly. However, positive responses were observed in the phytoplankton on two different occasions. After five months of treatment, results showed reduction of cyanobacteria biomass, with a 4-fold increase in water transparency. But, following a period of rain as well as a leakage occurred in the sewage system, cyanobacteria re-established in the lake. After adjustment in the application, cyanobacteria were replaced by chlorophytes, chryptophytes, euglenophytes and diatoms. Unfortunately, phytoplankton responses did not last long after interruption of the treatment, and blooms resumed, demonstrating resilience to treatment. This study offered an excellent opportunity to prove the efficacy of the treatment, while also showing its limitations in this reservoir. We also observed how fast the phytoplankton community could recover, in the presence of an efficient long-term control of phosphorous inputs.

**keywords:** cyanobacteria, Phoslock®, phytoplankton community, system recovery, Pampulha reservoir.

## 1. Introduction

Nutrient input in aquatic ecosystems, mainly phosphorus (P) and nitrogen (N), is among the primary causes of eutrophication of urban reservoirs worldwide, resulting in water quality deterioration and increase in phytoplankton biomass (Carpenter et al., 1998; Smith, 2003; Smith and Schindler, 2009). Eutrophication affects the structure and dynamics of the phytoplankton, causing changes in community attributes, such as species composition, density, richness, diversity and dominance. It is a global concern for the management of urban reservoirs due to the increase in the intensity, duration and frequency of Harmful Cyanobacterial Blooms (CyanoHABs) (Heisler et al., 2008; Smith and Schindler, 2009; Brookes and Carey, 2011; Schindler et al., 2016). Beside the problems associated with their high biomass (odor, anoxic deep layers), cyanobacteria can produce potent toxins that pose a serious risk to aquatic life, to the environment, as well to human health (Chorus et al., 2000; Smith, 2003; Giani et al., 2005). As a consequence, eutrophication threatens ecosystem freshwater services, such as fish production, drinking water supply and recreation (Chorus and Bartram, 1999; Brönmark and Hansson, 2002).

Phosphorus has been considered as a critical factor in CyanoHABs development and therefore represents the main challenge in the restoration of eutrophic reservoirs (Zurawell et al., 2005; Carpenter, 2008; Liu et al., 2012). There is a consensus that, in order to reverse the eutrophication in aquatic ecosystems, it is first necessary to reduce the external inputs of P (Sas, 1989; Cooke et al., 2005). However, in many cases, internal loads from P-rich sediments are very high and can delay the recovery time for decades (Søndergaard et al., 2003; Schindler et al., 2008; Spears et al., 2013), therefore they also need to be considered. The removal of internal P load has been highlighted in environmental restoration programs of eutrophic reservoirs and specific products to control the release of P supply from sediments have been tested and used (Mackay et al., 2014; Spears et al., 2016). Once phosphorous is eliminated from the water column and its release from the sediment is controlled, it becomes limiting to the phytoplankton, thus, theoretically leading to the recovery the ecological damages caused by eutrophication could be quickly reversed (Copetti et al., 2016).

The lanthanum-modified bentonite clay, commercially known as Phoslock®, is a geo-engineering material developed in the 1990s at the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) in Australia (Douglas, 2002) as a tool to remove dissolved phosphorus from the water column and to lock it in the sediment of eutrophic lakes (Spears et al., 2013). The mechanism of action of Phoslock is based on the binding of the lanthanum ion of the bentonite clay with phosphate ion from water, forming the mineral rhabdophane ( $\text{LaPO}_4$ ). The

rhabdophane is then precipitated from the water column and immobilized on the lake sediment. The ability of Phoslock to adsorb phosphate has been well studied in laboratory experiments (Ross et al., 2008; Haghseresht et al., 2009; Lürling et al., 2014) and it has already been applied in some lakes around the world, most of them, however, located in temperate regions (Lürling e van Oosterhout, 2013; Bishop et al., 2014; Gunn et al., 2014; Nürnberg and LaZerte, 2016; Epe et al., 2017). In contrast, monitoring of *in-situ* applications during cyanobacteria blooms have seldom been carried out and few scientific papers have addressed the treatment effective durability. Furthermore, the responses of the entire phytoplankton community to Phoslock are still poorly understood, especially in tropical environments where toxic cyanobacteria blooms may become persistent (McGreggor and Fabbro 2000; Figueredo and Giani, 2009; Figueredo et al., 2016).

Cyanobacteria have numerous adaptations that allow them to tolerate variable environmental conditions. Some groups are able to fix atmospheric nitrogen and have specialized cells and structures that turn them resistant to desiccation and high radiation, such as akinetes, photoprotective pigments and mucilaginous sheaths. Many species also have the ability to regulate their buoyancy in the water column thanks to the presence of gas vacuoles, thus, optimizing their access to both light and nutrients (Reynolds et al., 1987; Pearl, 2018). These species can also take up and store hypolimnetic P, when it is limiting in the epilimnion (Ganf and Oliver, 1982). In addition, some species are known to store intracellular phosphorus (Reynolds, 2006), which gives them an adaptive advantage in face of stressful and changing environmental conditions. These competitive advantages of cyanobacterial populations actually represent a challenge in lake management situations that need to deal with eutrophication control. Thus, it is important to follow the cyanobacteria responses to restoration processes to better evaluate the effectiveness of each treatment and to develop more appropriate strategies to control and mitigate CyanoHABs in eutrophic reservoirs.

Pampulha reservoir is a small tropical urban lake in southeastern Brazil. The reservoir was built originally to supply water to the city of Belo Horizonte, however, since 1970's, underwent deterioration following the rapid urbanization of its watershed and the input of domestic and industrial untreated effluents. As a consequence, a strong eutrophication process started in the early eighties in the reservoir (Giani et al., 1988), leading to the appearance of periodic harmful cyanobacterial blooms (Giani, 1994) and to the interruption of the lake use for water supply (Pinto-Coelho, 1998). Several studies carried out in the reservoir along the last decades, testified the advance of eutrophication in this system and showed strong modifications in the phytoplankton community structure, which is now dominated by persistent cyanobacterial blooms (Pinto-Coelho 1998; Figueredo and Giani 2001; Figueredo et al., 2016; Silva et al., 2016).

However, even with the severe degradation of its water quality, the reservoir remains an important tourist spot, and the “Pampulha Modern Ensemble”, designed by architect Oscar Niemeyer, was added to the UNESCO’s World Heritage list. For this reason, investment by the local municipality for the improvement and recovery of the lake lead to the implementation of a treatment based in periodic applications of the bentonite clay Phoslock. The aim of this study was, therefore, to investigate the effectiveness and lasting effects of the treatment on the water quality and cyanobacteria blooms, and to follow the eventual changes in the qualitative and quantitative composition of the phytoplankton community during the applications.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Sample collection and water quality measurements**

Pampulha reservoir is located in the city of Belo Horizonte (MG) (19°51'09"S, 43°58'42"W), Brazil. It has a surface area of about 1.8 km<sup>2</sup> and a mean and maximum depth of about 5.1 m and 16.2 m, respectively (Figueredo et al., 2016, Silva et al., 2016). The reservoir has eight tributaries: Ressaca and Sarandi streams are the two major contributors to external nutrient input into reservoir. They contribute together with 70% of the total water inflow of the reservoir (Torres et al., 2007). The climate of the region is characterized by two distinct seasons: a warm and rainy season between October and March and a colder and dry season between April and September.

For this study, the reservoir was sampled monthly from April 2016 to May 2018 at a fixed sample station located in the central region of the lake (maximal depth 9.5 m). The physical-chemical profiles of temperature (°C), dissolved oxygen (mg L<sup>-1</sup>), electric conductivity (μS cm<sup>-1</sup>) and pH were obtained in-situ every 0.5 m from the surface layer to the bottom using a multi-parameter probe Yellow Springs Instruments-YSI, model 556. Water transparency was estimated by Secchi disk. Water samples for analyses of dissolved nutrients, chlorophyll-a and phytoplankton biomass were collected at 0.5 m depth with a Van Dorn sampler. Water samples were also collected at 8.0 m depth for analysis of soluble reactive phosphorus and total phosphorus. Samples for the analyses of the quantitative composition of phytoplankton were immediately fixed with Lugol's solution. Water samples for the analysis of nitrite (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrate (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and soluble reactive phosphorus (SRP) were filtered on glass fiber filters (GF-1, Macherey- Nagel, 0.7 μm pore diameter) and frozen (-20 °C) until analysis. For the analysis of total phosphorus (TP), unfiltered samples were used. Nutrients measurements were performed

by colorimetric methods according to APHA (2005). Chlorophyll-a concentration was determined according to Nusch (1980). The phytoplankton species were identified and counted at 400X magnification using a ZEISS Axio Observer D1 inverted microscope following the method of Utermöhl (1958). The counts were performed until reaching a minimum of 100 individuals of the dominant species (to increase precision, when dominant species were extremely abundant, subdominants were used). Biovolume was calculated for each species using geometric approximations (Rott, 1981; Hillebrand et al., 1999) measured from a minimum of 20 randomly selected individuals.

Precipitation and air temperature data were obtained from the INMET (National Meteorological Institute), referring to station 83587 (Belo Horizonte city, MG).

## **2.2 Phoslock application**

Recently, the municipality of the Belo Horizonte city started a program aiming the water quality recovery of the reservoir. The project included 1) dredging the estimated volume of sediment input in a yearly base; 2) improvements of the sewage system; and, 3) an in-lake treatment by use of the lanthanum-enriched bentonite clay, Phoslock®.

The Phoslock treatment in Pampulha reservoir was performed by a Phoslock's Brazilian licensee (HydroScience company). The product was periodically distributed across four established regions and evenly added at the water surface as slurry, after mixing with lake water using a barge. The concentration of Phoslock applied in the lake varied according to phosphorus content in water, and the doses were adjusted according to lake responses, which were monitored during the restoration period by the company. The treatment started in April 2016 and was carried out until February 2018. A total amount of 900 tons of Phoslock was applied in Pampulha reservoir over almost two years of treatment.

## **2.3 Data analysis**

The data set was split in four time periods according to information about Phoslock applications and the reservoir response to external events. Period A shows the beginning of the treatment; period B presents the first positive response to the treatment; period C is characterized by partial failure of the treatment due to suddenly increased in nutrient inputs through stormwater from December/16 to February/17 and after a rupture of sewage pipes in March/17 and August/17; period D started in December/17, after the application adjustment to the new levels of phosphorus

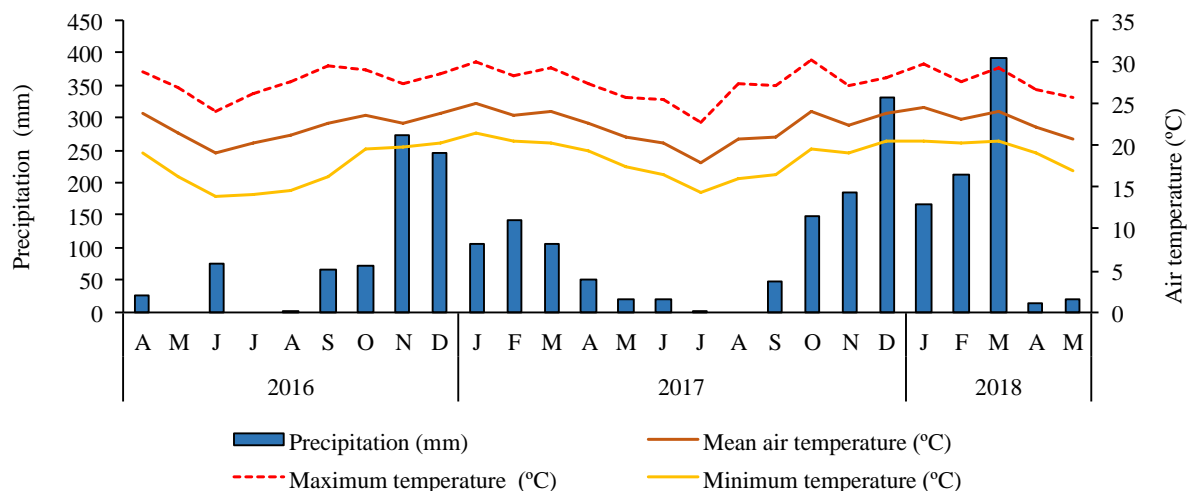
(started in November/17), and included a few months after the interruption of the treatment in February/18.

To extract the main trends between environmental and biotic parameters a redundancy analysis (RDA) was performed following Borcard et al., (2011). Prior to the analysis, the data were  $\log(x+1)$  transformed to attain normality. The statistical significance of the relationship was evaluated by Monte Carlo permutation tests, under 999 permutations. The analysis was done using the R software and the *vegan* package (Oksanen et al., 2013; R Development Core Team 2013).

### 3. Results

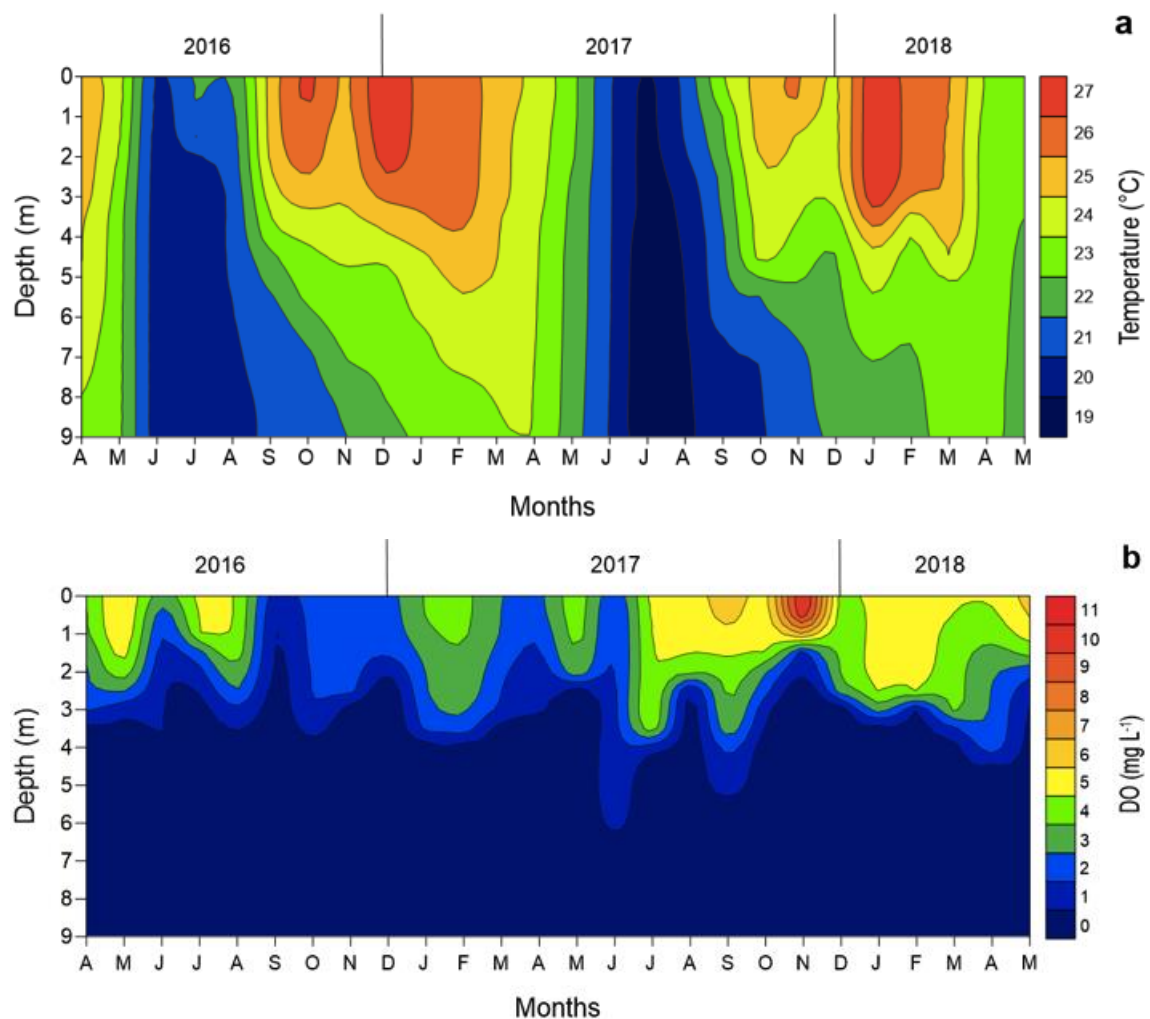
#### 3.1 Climatic, physical and chemical parameters

The temporal variation of monthly precipitation and air temperature during the studied period is shown in Figure 1. Precipitation ranged from 0 to 391 mm and rain distribution followed the seasonal pattern known for the region, with a period of less frequent rains between April and September (dry season) and the occurrence of heavier rains between October and March (rainy season). Lower values of precipitation were recorded during the dry season, with cumulative volume of 167 mm in 2016 and 139 mm in 2017. The rainy season showed higher precipitation values, with cumulative volume of 944 mm in 2016/2017 and 1435 mm in 2017/2018. The mean air temperature ranged from 17.8 to 25.0 °C during the entire period of study, with lower values during the dry season and higher during the rainy season. Minimum and maximum temperature values followed the same seasonal patterns of the average. The minimum recorded value was 13.8 °C in June/16, and the maximum was 30.2 °C, in October/17.



**Figure 1.** Temporal variation of precipitation (monthly accumulation) and air temperature (mean, minimum, maximum - based in daily means) in Belo Horizonte (Brazil) during the study period.

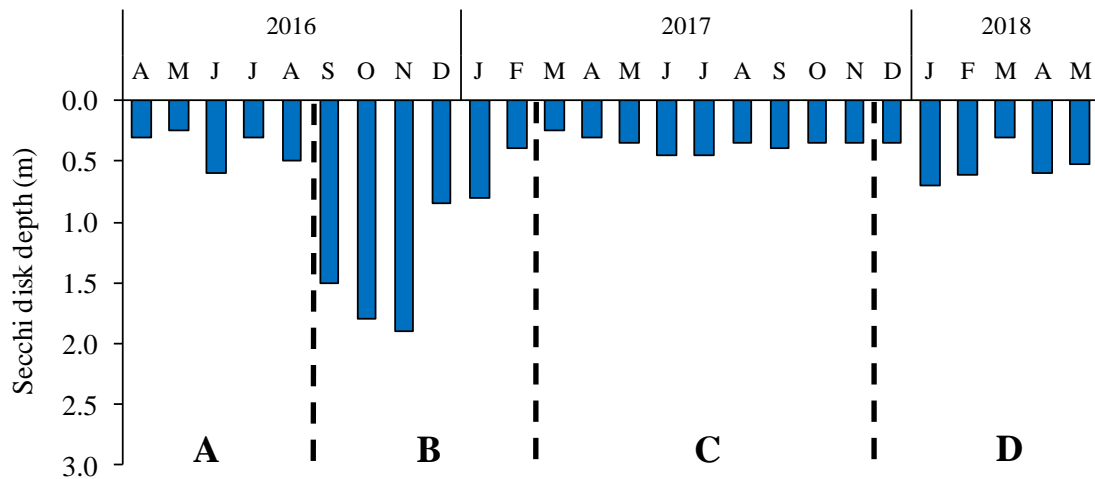
Water temperature vertical profiles (Fig. 2a) exhibited a clear seasonal pattern of thermal stratification of the water column in the warmest months (between October and March). The thermal amplitude in the water column during summer stratification periods was around 5 °C. In coldest months (May to August), the water column tended to be isothermal, normally well mixed or showing very small thermal amplitude from the surface to the bottom. The dissolved oxygen (DO) profiles showed (Fig. 2b) a trend of oxygen depletion and anoxic conditions with increasing depth. The period with lower oxygen concentration at the surface was observed between September and December 2016, with values as low as 2.2 mg L<sup>-1</sup>, likely due to the reduction of phytoplankton biomass following Phoslock applications.



**Figure 2.** Temporal variation of the (a) thermal water profile (°C) and (b) vertical dissolved oxygen profile (mg L<sup>-1</sup>) in Pampulha reservoir during the study period.



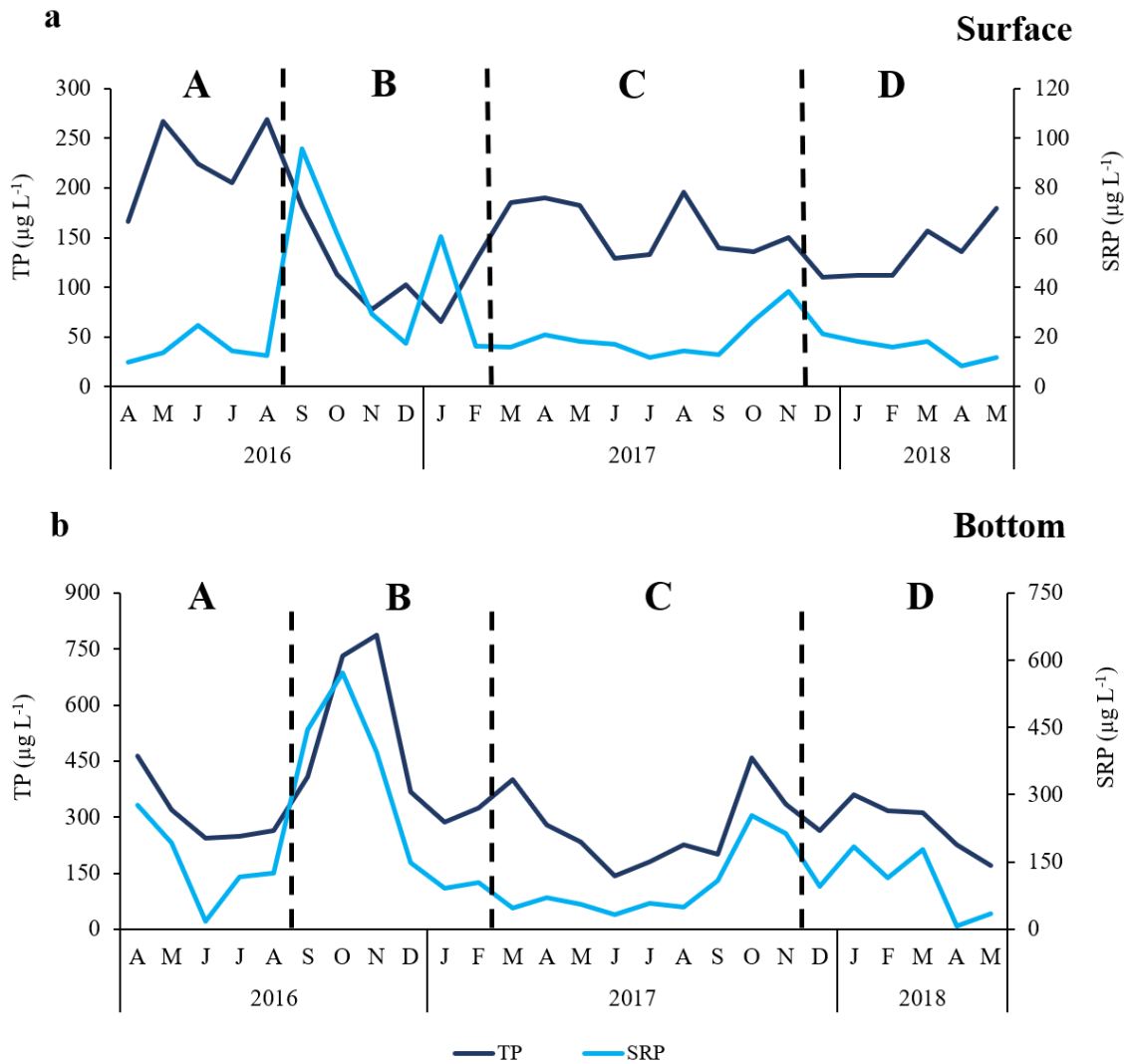
Figure 3 represents changes in water transparency in Pampulha reservoir, measured by Secchi disk depth. As described in the methodology (see section "Data analysis" for details), the graph was divided in four different periods that represent the observed changes in the lake, as a response to the Phoslock treatment. Values were often lower than 0.5 m, except between September/16 and February/17, when the water transparency increased nearly 4-fold, reaching approximately 2.0 m in November/16 and the water became clearer.



**Figure 3.** Temporal variation of Secchi disk depth (m) throughout the study period. Vertical dashed lines indicate periods of change in the Phoslock application or in the treatment response. (see section "Data analysis" for details).

Following the Phoslock treatment, phosphorus (TP and SRP) concentration largely varied over the study period in Pampulha reservoir (Fig. 4). In the surface layer (Fig. 4a), TP minimum and maximum values ranged from 66 to 269  $\mu\text{g L}^{-1}$ . TP concentration decreased from period A to period B, respectively showing mean values from 226 to 111  $\mu\text{g L}^{-1}$ . In period C, mean TP concentration was 160  $\mu\text{g L}^{-1}$  and in D, 134  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 4a). In contrast, the mean concentration of SRP in the surface layer increased from 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  in period A to 47  $\mu\text{g L}^{-1}$  in period B, which presented the highest concentration of SRP. There was a decrease in SRP from period B to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  in period C and 16  $\mu\text{g L}^{-1}$  in period D. During the entire period of study, SRP ranged from 8 to 96  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

TP concentration was always higher at the bottom, where it ranged from 143 to 786  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 4b). The highest TP mean values were found in period B (484  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). The mean bottom TP concentrations in periods A, C and D were 308, 273 and 274  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The SRP concentration ranged from 8 to 572  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The highest mean bottom SRP concentration was recorded in period B (293  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and the lowest was recorded in C (98  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). The mean SRP concentration in periods A and D were 146 and 102  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.



**Figure 4.** Temporal variation of total phosphorus (TP) and soluble reactive phosphorus (SRP) at the (a) surface (0.5m) and (b) bottom layer (8.0m) of Pampulha reservoir during the Phoslock treatment period. Vertical dashed lines: as in figure 4.

### 3.2 Composition and biomass of the phytoplankton community

Figure 5 shows changes in the quantitative and qualitative composition of the phytoplankton community and chlorophyll-a concentration. At different time periods, Phoslock had a distinct effect on the composition and biomass of the phytoplankton, with a positive effect in two periods (B and D) and a discrete effect or no effect observed in the other two (A and C).

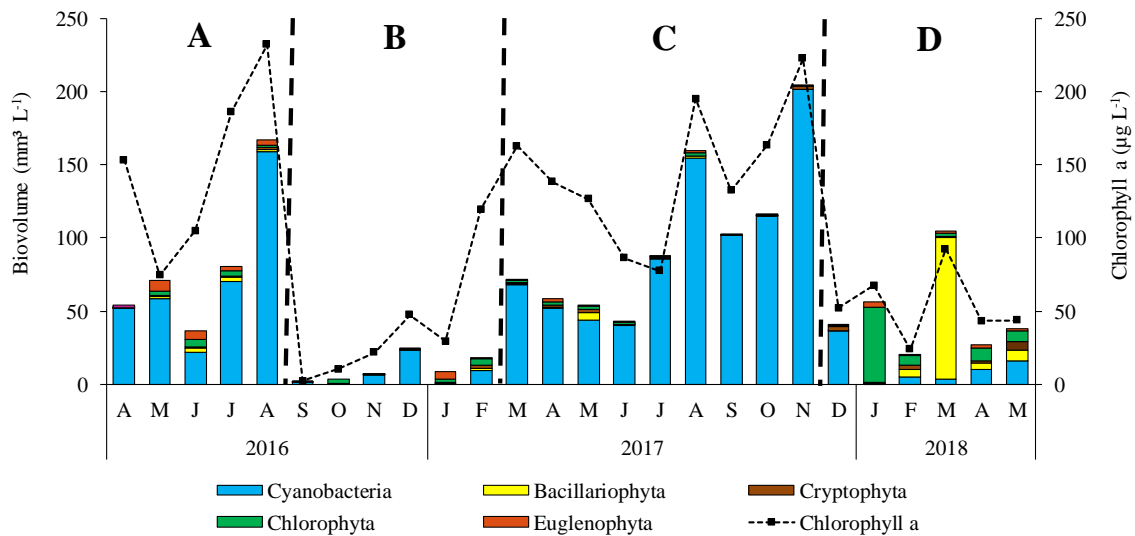
Cyanobacteria were dominant during almost the whole study period, contributing with more than 80% to the total phytoplankton biomass in several months. The most representative cyanobacteria species were *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales), *Planktothrix agardhii*, *P. isothrix* (Oscillatoriales), and *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales). Chlorophyta, Bacillariophyta, Euglenophyta, and other taxonomic groups were less abundant and made small

or no contribution to the total phytoplankton biomass in most months. The highest growth of these groups occurred in period D, when Chlorophyta and then Bacillariophyta became dominant. The lowest cyanobacteria biomass was recorded in period B (mean biovolume of  $7 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ ) followed by period D (mean  $12 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ ). In addition, in period B, cyanobacterial populations declined dramatically and almost completely disappeared from the reservoir, as well as most of the all phytoplankton species. The only exception was in December/16, when large colonies of *M. aeruginosa* developed in the reservoir dominating the phytoplankton community, even if at low biomass. The lowest concentration of chlorophyll-a was recorded in this period as well. The highest cyanobacteria biomass was recorded in 2017, during period C, when the phytoplankton biomass increased rapidly.

Despite the almost total disappearance of cyanobacteria in period B, they became dominant again throughout period C, showing large variations in species biomass, composition and dominance. They peaked in November/17, when the highest biomass of the whole study period was recorded ( $202 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ ). Then, cyanobacteria dramatically decreased in December/17 and remained at a low level over period D, registering their lowest values. During this period, small green algae and diatoms showed rapid growth in episodic blooms. Diatoms, for example, were rarely registered in Pampulha, but a large bloom of *Synedra ulna* was observed in March/18, dominating over the rest of the phytoplankton community. Chlorophytes dominated the phytoplankton in two occasions, October/16 (period B) and January/18 (period D). In both cases, their growth immediately followed the decrease of cyanobacteria in the lake. It was possible to notice profound shifts in the structure of the phytoplankton community in period D: elimination or effective decrease of cyanobacterial blooms, as well as changes in species composition, when other groups became more important and a greater species richness was observed in the community.

Chlorophyll-a concentration varied from  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  in September/16 to  $232 \mu\text{g L}^{-1}$  in August/16, showing a pattern of increase at the end of the dry season, when chlorophyll peaks usually occurred (Fig. 5). In period B, chlorophyll concentration showed a clear reduction of phytoplankton biomass, decreasing from an average of  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  in period A to  $38 \mu\text{g L}^{-1}$  in period B. In period C, fluctuations in chlorophyll concentration were observed, however the mean concentration in this period was high ( $145 \mu\text{g L}^{-1}$ ), and reached its maximum in November/17 ( $223 \mu\text{g L}^{-1}$ ), corresponding with the period of highest cyanobacteria biomass. Chlorophyll mean concentration decreased significantly from period C to D, which presented an average of  $54 \mu\text{g L}^{-1}$ . This decrease in chlorophyll concentration in period D was related to strong shifts in the composition and biomass of phytoplankton, showing a progressive reconstruction of the

phytoplankton community.

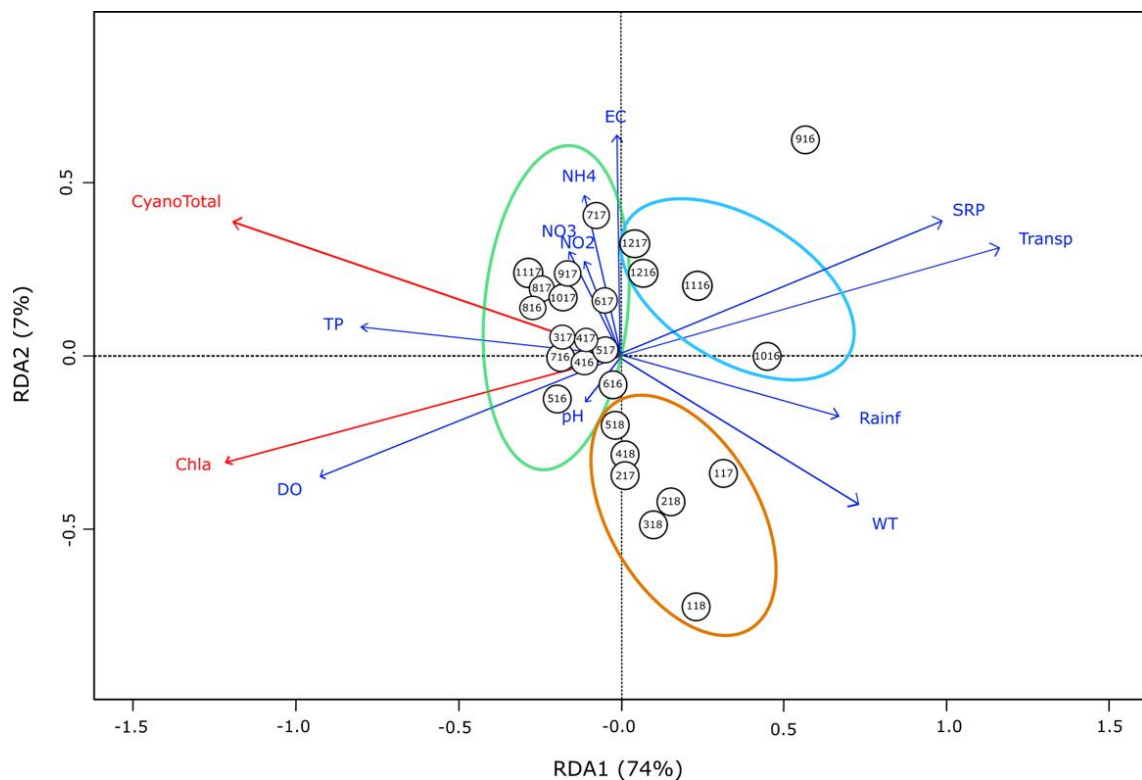


**Figure 5.** Temporal variation in the phytoplankton biomass and composition and chlorophyll-a concentration in Pampulha reservoir. Vertical dashed lines: as in figure 4.

The results of the redundancy analysis (RDA) are represented in Figure 6. The analysis showed that the model was highly significant and explained 81% of the variability (F ratio = 5.7,  $P < 0.001$ ). The first axis (RDA1) explained the larger proportion of the variance (74%) and axis 2 (RDA 2) only 7%. The main variables positively associated to the first ordination RDA axis were water transparency, rainfall and SRP, and, negatively, TP and dissolved oxygen (DO) (Table 1). The biotic variables, chlorophyll and cyanobacteria biomass, were both correlated to axis 1, showing a negative trend (Table 1). RDA1 showed a pattern of decreasing TP, chlorophyll and cyanobacteria, opposite to increasing rain, transparency and SRP. These parameters were directly linked to the Phoslock treatment, either as a response or as a disturbance factor. By precipitating phosphorous, Phoslock caused a decrease of cyanobacteria biomass and chlorophyll, consequently causing a lower production of oxygen (DO) and higher transparency, and even an increase of dissolved phosphorus (SRP), released from the lysis of dying cyanobacterial cells. Rain was a disturbance, since it buffered the effect of the treatment. Although axis 2 explained quite a lower portion of the variance, it was positively associated to ammonium ( $\text{NH}_4$ ), nitrite ( $\text{NO}_2$ ) nitrate ( $\text{NO}_3$ ) and conductivity (EC) and, negatively, with water temperature (Table 1).

The analysis revealed three quite well-defined groups of months, represented in Figure 6 by three separated ellipses. In the green ellipse are grouped those months with the highest cyanobacteria biomass. They are found on the negative side of axis 1, when TP concentration was also high. The blue, on the positive side of axis 1, defines the second part of 2016, when a sudden decrease of cyanobacteria biomass and increased transparency were observed. Interestingly, the

orange ellipse encloses the summer months from the beginning of both 2017 and 2018, when the highest phytoplankton richness was observed and algal groups other than cyanobacteria were dominant. These months are found on the negative side of axis 2, characterized by higher water temperature (summer) and lower concentration of nitrogenated nutrients and conductivity. These three assemblages by month are rather similar to the time periods proposed, based on the information of Phoslock application (see Data analysis in Methods), thus they are directly related to the action of the treatment in the lake.



**Figure 6.** Triplot redundancy analysis of the relationships found between abiotic parameters (blue arrows), biotic parameters (red arrows) and samples distribution (circles: the numbers inside the circles indicate month and year) in Pampulha reservoir (April/2016 to May/2018). The arrows indicate the direction of increase. The angles between variables reflect their correlations (angles close to  $90^\circ$  indicate no correlation, angles close to  $0^\circ$  indicate a high positive correlation and angles close to  $180^\circ$  indicate a high negative correlation). WT = water temperature; Rainf = rainfall; Transp = water transparency; DO = dissolved oxygen; EC = electrical conductivity; pH = hydrogenation potential; TP = total phosphorus; NH4 = ammonium; NO2 = nitrite; NO3 = nitrate; SRP= soluble reactive phosphorus; Chla = chlorophyll-a; CyanoTotal = total biomass of cyanobacteria. See text for explanation of the three ellipses.

**Table 1.** Redundancy analysis scores to axis-1 (RDA1) and axis-2 (RDA2) for biotic and environmental variables.

<b>Biotic variable scores</b>		
	<b>RDA1</b>	<b>RDA2</b>
Chla	<b>-1.713</b>	-0.481
CyanoTotal	<b>-1.521</b>	0.542
<b>Abiotic variables scores</b>		
	<b>RDA1</b>	<b>RDA2</b>
TP	<b>-0.594</b>	0.200
NH4	-0.107	<b>0.448</b>
NO3	-0.116	0.305
NO2	-0.087	0.268
EC	-0.071	<b>0.602</b>
DO	<b>-0.642</b>	-0.353
pH	-0.049	-0.120
WT	<b>0.536</b>	-0.490
Transp	<b>0.884</b>	0.205
Rainf	<b>0.502</b>	-0.264
SRP	<b>0.722</b>	0.332

Chla = Chlorophyll-a; CyanoTotal = Total biomass of cyanobacteria; TP = Total phosphorus; NH4 = Ammonium; NO3 = Nitrate; NO2 = Nitrite; EC = Electrical conductivity; DO = Dissolved oxygen; pH = Hydrogenation potential; WT = Water temperature; Transp = Water transparency; Rainf = rainfall; SRP = soluble reactive phosphorus.

#### 4. Discussion

The increase in phosphorus concentration in aquatic ecosystems has been reported as one of the main causes of the increase of cyanobacterial blooms around the world, although nitrogen limitation is also recognized as an important factor in their development (Spears et al., 2007; Carpenter, 2008; O'Neil et al., 2012). Increasing blooms represent a serious risk to environmental services of urban reservoirs because of the potential of some species to produce dangerous toxins that threaten human health (Downing et al., 2001; Codd et al., 2005). In Pampulha reservoir, studies carried out in the last decades demonstrate the continuous increase in the annual phosphorus concentration and the consequent increase in the frequency and duration of toxic cyanobacteria blooms (Giani, 1994; Pinto-Coelho, 1998; Figueredo et al., 2016). However, it is important to keep in mind that cyanobacterial blooms are complex events which are usually not

caused by a single factor, but by multiple and synchronous environmental drivers (Zurawell et al., 2005; Heisler et al., 2008; O'Neil et al., 2012). Apart from the influence of increased nutrient concentration, other environmental factors such as light availability, low water turbulence, higher temperature and stable mixing conditions of the water column are known to promote the maintenance of cyanobacteria blooms (Zevenboom and Mur 1984; Smith, 1986; Jöhnk et al., 2008). Furthermore, cyanobacteria have a great physiological flexibility that confer them wide ecological tolerance providing competitive advantages over other phytoplankton groups (Paerl et al., 2001; Sharma et al., 2011).

Cyanobacteria were resilient to P deficiency at the start of Phoslock applications, and the initial phytoplankton response (period B) was only seen after about five months from the start of the treatment. This resilience observed in the cyanobacteria outcome is probably due to their capacity to store enough phosphorus that allows them to perform two to four cell divisions (Mur et al., 1999), as well as for the time needed for the treatment to take action in an extremely P-rich environment. At the beginning of the treatment, cyanobacteria biomass in Pampulha reservoir was very high and cyanobacteria cells had probably enough intracellular phosphorus to keep growing even after the start of Phoslock applications. At this time, most P was in particulate form, thus incorporated into the cyanobacteria biomass as TP. It is known in the literature that Phoslock is not able to remove particulate P, in other words, Phoslock will not remove P inside the phytoplankton biomass (Lürling and van Oosterhout, 2013). As the phosphorus stock in the cells was depleted, however, cyanobacteria died progressively, resulting in a decrease in TP concentration in the water (Fig. 4). The delay observed in decreasing TP concentration and cyanobacterial response to Phoslock treatment were also found in other whole lake-scale studies (e.g. Nürnberg and LaZerte, 2016; Lang, et al., 2016; Epe et al., 2017). For example, in Swan Lake (Canada), Nürnberg and LaZerte (2016) registered a decrease of phytoplankton biomass only in the second post-treatment year, thus later than found in Pampulha. Contrariwise, Bishop et al., (2014) reported an effect on the structure of the phytoplankton community in Laguna Niguel (California, USA), two weeks after a four-days Phoslock application, when cyanobacteria dominance was replaced by other algal groups.

According to Epe et al., (2017), as progressive death of the biomass occurs, there is a decrease in TP concentration and a simultaneous release of SRP in the water. In the present study, both cyanobacteria and total phytoplankton biovolumes significantly decreased in period B, resulting in a 4-fold increase in water transparency and in a significant decrease of chlorophyll concentration, which was the lowest in the whole period of study. As statistically confirmed by the RDA, a negative correlation exists between water transparency and chlorophyll concentration

and cyanobacteria biomass. This result is in agreement with the reduction of TP and the increase of SRP in the water, also observed by Epe et al., (2017) in Bärensee lake (Germany), following Phoslock applications.

However, this initial cyanobacterial response to the treatment was not further sustained and increasing cyanobacteria biomass was recorded again in period C, when their populations maintained persistent blooms and low contribution of other algae was registered. As a response to Phoslock in Loch Flemington (Scotland, UK), Lang et al., (2016) reported total phytoplankton and cyanobacteria biomass decrease and higher contribution of other algal groups, indicating a more functionally diverse phytoplankton community. However, cyanobacteria blooms continued to develop during summer, even though at lower intensities. The authors attributed to weather this limited cyanobacteria reduction, arguing that high TP concentration observed in the lake could be associated with drier and hotter summer.

In Pampulha reservoir, we also observed the importance of climatic factors on the phytoplankton response to the treatment. High cyanobacteria biomass was recorded during the dry season, characterized by scarce rainfall, water column mixing, and elevated nutrient concentration. However, as also previously reported in the reservoir (Silva et al., 2016; Batista et al., 2018; Silva et al., 2019), external loads, caused by runoff at the beginning of the rainy season, produced a rapid increase in the concentration of phosphorous and other nutrients in the water body. Therefore, rain, followed by elevated nutrient input, was probably the reason of the first failure of the Phoslock treatment.

Furthermore, during period C (March/17 and August/17), atypical and unexpected episodes of sewage discharges into the reservoir due to disruption of interception pipelines were reported (city municipality, pers. comm.). The increased inflow of nutrients into the reservoir by these unpredicted factors was probably an additional obstacle to the Phoslock treatment in Pampulha during this period. Another factor that must be taken into account is that large amount of nutrients still enters in the reservoir by its tributaries (Silva et al., 2019), demonstrating that in order to achieve satisfactory results, Phoslock applications must be preceded by a reduction in external nutrient loads to sufficiently low levels (Cooke et al., 2005). Several studies mentioned the importance of reducing external P load through sewage system improvement in the watershed to obtain more adequate and long-lasting results following Phoslock treatments (e.g. Robb et al., 2003; Gunn et al., 2014; Lang et al., 2016).

In view of the increase in phosphorus inputs in the reservoir during period C, the amount of Phoslock was adjusted, at the beginning of November/17, leading to the second period of the treatment effectiveness in period D. However, unlike period B, in which there was an almost total



decrease of the whole phytoplankton, in period D there was a change in the phytoplankton community towards other algal groups. A larger contribution of chlorophytes, diatoms, cryptophytes and euglenophytes was observed. Such phytoplankton diversity was rarely reported in Pampulha reservoir in recent years (Batista et al., 2018).

It has been shown that whole-lake scale Phoslock applications are effective on the phosphorus reduction in water column and on changes in phytoplankton composition (Bishop et al., 2014; Lang et al., 2016; Bishop and Richardson, 2018). As a general response pattern, these studies reported a reconstruction of the phytoplankton community, with a frequently observed gradual decrease in cyanobacteria populations and a rise in the dominance of other algal groups, increasing community diversity. Likewise, our findings showed significant changes in the structure of the phytoplankton community in Pampulha reservoir during some periods of the Phoslock treatment.

It is interesting to note that the positive responses of lower cyanobacteria biomass and higher richness of the phytoplankton community to the Phoslock treatment occurred especially in summer (December-March), characterized by heavy rains (Fig. 1) and by thermal stratification of the water column (Fig. 2a). As such, environmental and climatic factors appear to have shaped the phytoplankton responses to Phoslock treatment in Pampulha reservoir. High volume of summer rains (December-January), for example, had a clear dilution effect on cyanobacteria biomass, as confirmed by the RDA, which has also resulted in increased water clarity. Similar effect of rainfall on the phytoplankton was previously described in Pampulha reservoir (Figueredo and Giani, 2001; Batista et al., 2018), when authors reported the importance of precipitation, and subsequent increase of water volume and lower residence time, in the dilution of nutrient concentration in water. As we stated earlier, it is important to keep in mind that rain plays a double role in this small tropical reservoir. The first rain events (September-October) are in general responsible for a sudden rise in the input of nutrients that were accumulating during the dry season over the watershed surface (Silva et al., 2016; Silva et al., 2019). The dilution effect is observed later in the season, when rainfall intensifies in the course of summer. The same phenomenon was also observed in other aquatic ecosystems (Jeppesen et al., 2009).

Even if moderate, the decrease in cyanobacteria biomass observed in this study can be recognized as a sign of the Phoslock effectiveness in controlling blooms, suggesting a slight ecological improvement of the lake. Cyanobacteria, whose populations were overall dominant throughout the year in Pampulha reservoir before the Phoslock applications, suffered strong oscillations in their biomass during the period of study, abruptly decreasing their populations in two episodes, as mentioned before. The decline of the cyanobacteria populations had a positive

effect on the phytoplankton community diversification, favoring smaller and fast-growing species, such as chlorophytes.

The ability of Phoslock to and remove phosphorus has already been shown in some studies (Robb et al., 2003; Ross et al., 2008; Haghseresht et al., 2009), nevertheless, in Pampulha, phosphorus concentration showed some changes only in period B, when a decline was recorded from August to November/2016. During these months, TP concentration was lower at the surface, but it increased close to the bottom (Fig. 4). For the rest of the study period, TP concentration maintained similar levels to those reported in previous years (Batista et al., 2018; Silva et al., 2019). Furthermore, it should be remarked that although Phoslock was able to precipitate phosphorus from the water column, the high TP levels close to the bottom suggest that the amount applied in Pampulha reservoir was not effective to permanently bind it in the sediment and to sustain the improvements observed in the water quality in period B. Lang et al., (2016) also suggested that the Phoslock dosage added in Loch Flemington was probably insufficient to control the P release from the sediment, supporting cyanobacterial blooms of smaller magnitude in post-application years. In fact, laboratory studies performed by Meis et al., (2013) with sediments from the same Loch Flemington demonstrated that, following Phoslock applications under aerobic conditions, no sediment P release occurred, while significant amounts of P were released under anaerobic conditions. According to Meis et al., (2013), additional Phoslock applications could be a viable option under prolonged periods of anoxia. In Pampulha reservoir, the hypolimnion is almost permanently anoxic (Fig. 2), which facilitates the continuous phosphorus release from the sediment to the water column. This indicates that the Phoslock dosage applied in Pampulha should probably be considerably increased in future recovery programs as to avoid P release from the anoxic sediments. Therefore, the almost permanently anoxic sediment in Pampulha reservoir was probably another drawback to the treatment efficacy.

Phosphorous levels in Pampulha reservoir are still too high to sustain the ecological improvements observed in the phytoplankton community composition in period D, since a slight tendency of cyanobacteria return was already noticeable (Fig. 5). Lürling and van Oosterhout (2013), following Phoslock applications in Lake Het Groene Eiland (The Netherlands), observed that the results did not meet the expectations and no significant decrease on phosphorus concentration was observed. In Pampulha, TP concentration was almost always above  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , demonstrating the high degree of eutrophication of the reservoir (OECD, 1982). Indeed, TP concentration higher than  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  was suggested as a turning point leading to cyanobacteria dominance in aquatic ecosystems (Downing et al., 2001). In 81% of the samples in Pampulha, cyanobacteria biovolume was often much higher than  $5 \text{ mm}^3 \text{ L}$ , indicating the hypertrophy of the

reservoir (Smith, 2003) and posing doubts about the efficacy of these first years of Phoslock treatment on the ecological improvement of this system. Finally, despite the clear relevance of phosphorus, it is not the only important factor in the maintenance of the high cyanobacteria biomass in Pampulha reservoir, where ammonium and nitrate concentrations, for example, also are extremely high (Pinto-Coelho et al., 1997; Figueredo et al., 2016). The RDA showed that nitrogenous nutrients have a different trend than phosphorus, thus they should be taken into account in the reservoir management program, when aiming for the full recovery of this water body.

In some lakes, the Phoslock treatment was designed by one whole-lake application, followed by some later reapplications (e.g. Epe et al., 2017). In Pampulha reservoir, Phoslock was applied daily for approximately two years and, even at high frequency, the results were not satisfactory. As suggested by Lüring and van Oosterhout (2013) for Lake Het Groene Eiland, constant Phoslock reapplications do not seem to be an effective and sustainable measure for the ecological lake recovery. Conversely, Meis et al., (2013) had opposite conclusions and found that smaller multiple doses were likely to increase the effectiveness of the treatment. However, they emphasized that the applications should be always conducted in parallel with the continuous reduction of external nutrient load. Also, according to the authors, the calculation of an "effective dose" is nearly impossible due to the complex mechanisms inherent to phosphorous cycling, indicating the need of constant monitoring and periodical dose readjustments to ensure better results.

## 5. Conclusions

Our study presents and discusses the results of a high frequency and long-term Phoslock treatment in an urban lake, the Pampulha reservoir, during which daily doses were applied on the whole water body for approximately two years. In these first two years, the treatment did not produce a significant reduction of phosphorus concentration in Pampulha reservoir, when values often above  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  were registered that prompted the maintenance of cyanobacteria blooms. Nevertheless, Phoslock positive effect on the phytoplankton community was remarkable in two periods: the first positive outcome occurred at the end of the first year of treatment and, the second, at the end of the second year. In both occasions, a reduction of cyanobacteria biomass and a shift towards other phytoplankton groups' dominance were observed, promoting greater diversity of the community. Yet, despite the fact that the Phoslock treatment was efficient in the temporary mitigation of cyanobacteria blooms as we verified, our findings indicate that this method was not

able to support effective and long-lasting responses in the ecological improvement of this highly eutrophic system. Several factors may have been responsible for the lack of better results such as: no sufficient removal of external sources of nutrients (with the additional sewage network problems reported); weather related factors (sudden runoff inputs at the beginning of the rain season); anoxic sediments, almost permanently present in Pampulha reservoir, which facilitated the continuous release of phosphorus.

## 6. References

- APHA – American Public Health Association. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, EUA: American Public Health Association.
- Batista, A.M.M., Figueredo, C.C., Giani, A., 2018. Variability in a permanent cyanobacterial bloom: species-specific responses to environmental drivers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94: fiy197.
- Bishop, W.M., Hyde, S., McNabb, T., Cormican, I., Willis, B.E., 2014. Operational evaluation of Phoslock phosphorus locking technology in Laguna Niguel Lake, CA. *Water, Air, Soil Pollut.* 225: 1-11.
- Bishop, W.M., Richardson, R.J., 2018. Influence of Phoslock® on legacy phosphorus, nutrient ratios, and algal assemblage composition in hypereutrophic water resources. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 4544-4557.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P., 2011. Numerical ecology with R. Use R! series. Springer Science, New York, NY, USA.
- Brönmark, C., Hansson, L., 2002. Environmental issues in lakes and ponds: current state and perspectives. *Environ. Conserv.* 29: 290-306.
- Brookes, J.D., Carey, C.C., 2011. Resilience to Blooms. *Science* 334: 46-47.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.W., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol. Appl.* 8: 559-568.
- Carpenter, S.R., 2008. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *PNAS* 105: 11039-11040.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management. London: WHO. Chapman & Hall. 416 pp.
- Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 3: 323-347.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203: 264-272.
- Cooke, G.D., Welch, E.B., Peterson, S.A., Nichols, S.A., 2005. Restoration and Management of

Lakes and Reservoirs. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Copetti, D., Finsterle, K., Marziali, L., Stefani, F., Tartari, G., Douglas, G., Reitzel, K., Spears, B.M., Winfield, I.J., Crosa, G., D'haese, P., Yasseri, S., Lüring, M., 2016. Eutrophication management in surface waters using lanthanum modified bentonite: a review. *Water Res.* 97: 162-174.

Douglas, G.B., 2002. US Patent 6350383: remediation material and remediation process for sediments. Alexandria, VA: U.S. Patent and Trademark Office.

Downing, J.A., Watson, S.B., McCauley, E., 2001. Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 1905-1908.

Epe, T.S., Finsterle, K., Yasseri, S., 2017. Nine years of phosphorus management with lanthanum modified bentonite (Phoslock) in a eutrophic, shallow swimming lake in Germany. *Lake Reserv Manage.* 33: 1-11.

Figueredo, C.C.; Giani, A., 2001. Seasonal variation in the diversity and species richness of the phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia* 445: 165-174.

Figueredo, C.C., Giani, A., 2009. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologica* 39: 264-272.

Figueredo, C.C., Pinto-Coelho, R.M., Lopes, A.M.M.B., Lima, P.H.O., Gücker, B., Giani, A., 2016. From intermittent to persistent cyanobacterial blooms: identifying the main drivers in an urban tropical reservoir. *J. Limnol.* 75: 445-454.

Ganf, G.G., Oliver, R.L., 1982. Vertical separation of the light and available nutrients as a factor of causing replacement of Green algae by Blue-green algae in the plankton of a stratified lake. *J. Ecol.* 70: 829-844.

Giani, A., Pinto-Coelho, R.M., Oliveira, S.J.M., Pelli, A., 1988. Seasonal cycle of physico-chemical water characteristics and horizontal distribution of nitrogen and phosphorus in Pampulha reservoir (Minas Gerais, Brazil) (original in Portuguese). *Cienc. Cult.* 40: 69-77.

Giani, A., 1994. Limnology in Pampulha Reservoir: some general observations with emphasis on the phytoplankton community. In: R.M. Pinto-Coelho, A. Giani and E. von Sperling (eds.), *Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais*. SEGRAC, Belo Horizonte, p.151-163.

Giani, A., Bird, D., Prairie, Y., Lawrence, J., 2005. Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62: 2100-2109.

Gunn, I.D.M., Meis, S., Maberly, S.C., Spears, B.M., 2014. Assessing the responses of aquatic macrophytes to the application of a lanthanum modified bentonite clay, at Loch Flemington, Scotland, UK. *Hydrobiologia* 737: 309-320.

Haghseresht, F.; Wang, S.; Do, D.D., 2009. A novel lanthanum modified bentonite, Phoslock, for phosphate removal from wastewaters. *Appl. Clay Sci.* 46: 369-375.

- Heisler, J., Glibert, P., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Gobler, C., Dortch, Q., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae* 8: 3-13.
- Hillebrand, H., Durselen, C. D. D., Kirschtel, U., Pollingher, T., Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35: 403-424.
- Jeppesen, E., Kronvang, B., Meerhoff, M., Søndergaard, M., Hansen, K.M., Andersen, H.E., Lauridsen, T.L., Liboriussen, L., Beklioglu, M., Ozen, A., Olesen, J.E., 2009. Climate change effects on runoff, catchment phosphorus loading and lake ecological state, and potential adaptations. *J Environ Qual* 38: 1930–1941.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P. M., Stroom, J. M., 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob. Change Biol.* 14: 495–512.
- Lang, P., Meis, S., Procházková, L., Carvalho, L., Mackay, E.B., Woods, H.J., Pottie, J., Milne, I., Taylor, C., Maberly, S.C., Spears, B.M., 2016. Phytoplankton community responses in a shallow lake following lanthanum-bentonite application. *Water Res.* 97: 55-68.
- Liu, B., Liu, X., Yang, J., Garman, D.E.J., Zhang, K., Zhang, H., 2012. Research and application of in-situ control technology for sediment rehabilitation in eutrophic water bodies. *Water Science & Technology* 65: 1190-1199.
- Lürling, M., van Oosterhout, F., 2013. Case study on the efficacy of a lanthanum-enriched clay (Phoslock®) in controlling eutrophication in Lake Het Groene Eiland (The Netherlands). *Hydrobiologia* 710: 253–263.
- Lürling, M., Waajen, G., van Oosterhout, F., 2014. Humic substances interfere with phosphate removal by lanthanum modified clay in controlling eutrophication. *Water Res.* 54: 78-88.
- Mackay, E.B., Maberly, S.C., Pan, G., Reitzel, K., Bruere, A., Corker, N., Douglas, G., Egemose, S., Hamilton, D., Hatton-Ellis, T., Huser, B., Li, W., Meis, S., Moss, B., Lürling, M., Phillips, G., Yasserli, S., Spears, B.M., 2014. Geoengineering in lakes: welcome attraction or fatal distraction? *Inland waters* 4: 349-356.
- McGreggor, G.B., Fabbro, L.D., 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoptokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 5: 195–205.
- Meis, S., Spears, B.M., Maberly, S.C., Perkins, R.G., 2013. Assessing the mode of action of Phoslock® in the control of phosphorus release from the bed sediments in a shallow lake (Loch Flemington, UK). *Water Res.* 47: 4460- 4473.
- Mur, L., Skulberg, O., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus, I., Bartram, J. [eds.], *Toxic cyanobacteria in water: A guide to public health significance, consequences, monitoring and management*, 15-40. E&FN SPON, London.
- Nürnberg, G.K, LaZerte, B.D., 2016. Trophic state decrease after lanthanum-modified bentonite (Phoslock) application to a hyper-eutrophic polymictic urban lake frequented by Canada geese (*Branta canadensis*). *Lake Reserv Manage.* 32: 74-88.

- Nusch, E.A., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.* 14: 14-36.
- OECD- Organization for Economic Co-Operation and Development, 1982. *Eutrophication of waters; monitoring, assessment and control.* OECD Paris, 154 pp.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2013. The vegan package. <http://cran.r-project.org/>, <http://vegan.r-forge.r-project.org/>.
- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313-334.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H., Dyble, J., 2001. Harmful freshwater algal blooms with an emphasis on cyanobacteria. *Scientific World Journal* 1: 76-113.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Rep.* 1: 27-37.
- Paerl, H.W., 2018. mitigating toxic planktonic cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems facing increasing anthropogenic and climatic pressures. *Toxins* 10: 1-16.
- Pinto-Coelho, R.M., Moura, R.T., Moreira, A., 1997. Zooplankton and bacteria contribution to phosphorus and nitrogen internal cycling in a tropical and eutrophic reservoir: Pampulha Lake, Brazil. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 82: 185-200.
- Pinto-Coelho, R.M., 1998. Effects of eutrophication on seasonal patterns of mesozooplankton in a tropical reservoir: a 4-year study in Pampulha Lake, Brazil. *Freshwater Biol.* 40: 159-173.
- R Development Core Team. 2013. R Development Core Team R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2013). <http://www.R-project.org>.
- Reynolds, C.S., Oliver, R.L., Walsby, A.E., 1987. Cyanobacterial dominance: The role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 21: 379-390.
- Reynolds, C.S. 2006. *Ecology of Phytoplankton.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Robb, M.S., Greenop, B., Goss, Z., Douglas, G., Adeney, J., 2003. Application of Phoslock, an innovative phosphorus binding clay, to two Western Australian waterways: preliminary findings. *Hydrobiologia* 494: 237-243.
- Ross, G., Haghseresht, F., Cloete, T. E., 2008. The effect of pH and anoxia on the performance of Phoslock, a phosphorus binding clay. *Harmful Algae* 7: 545-550.
- Rott, E., 1981. Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43: 34-62.
- Sas, H., 1989. *Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, Experiences, Extrapolations.* St. Augustin: Academia Verlag Richarz, 497 pp.

Schindler, D.W., Hecky, R.E., Findlay, D.L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M., Beaty, K.G., Lyng, M., Kasian, S.E.M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37 year whole ecosystem experiment. *PNAS* 105: 11254-11258.

Schindler, D.W., Carpenter, S.R., Chapra, S.C., Hecky, R.E., Orihel, D.M., 2016. Reducing Phosphorus to Curb Lake Eutrophication is a Success. *Environ. Sci. Technol.* 50: 8923-8929.

Sharma, N.K., Tiwari, S.P., Tripathi, K., Rai, A.K., 2011. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *J. Appl. Phycol.* 23: 1059-1081.

Silva, T.F.G., Giani, A., Figueredo, C.C., Viana, P.S., Khac, V.T., Lemaire, B.J., Tassin, B., Nascimento, N.O., Vinçon-Leite, B., 2016. Comparison of cyanobacteria monitoring methods in a tropical reservoir by in vivo and in situ spectrofluorometry. *Ecol. Eng.* 94: 79–87.

Silva, T., Vinçon-Leite, B., Lemaire, B.J., Petrucci, G., Giani, A., Figueredo, C.C., Nascimento, N.O., 2019. Urban stormwater runoff impacts on cyanobacteria dynamics in a tropical urban lake. *Water* 11: 1-28.

Smith, V. H., 1986. Light and Nutrient Effects on the Relative Biomass of Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 148–153.

Smith, V.H., 2003. Eutrophication of Freshwater and Coastal Marine Ecosystems: A Global Problem. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 10: 126-139.

Smith, V.H., Schindler, D.W., 2009. Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends Ecol. Evol.* 24: 201-207.

Søndergaard, M., Jensen, P.J., Jeppesen, E., 2003. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia* 506: 135-145.

Spears, B.M., Carvalho, L., Paterson, D.M., 2007. Phosphorus partitioning in a shallow lake: implications for water quality management. *Water Environ. J.* 21: 47-53.

Spears, B.M., Lurling, M., Yasseri, S., Castro-Castellon, A.T., Gibbs, M., Meis, S., McDonald, C., McIntosh, J., Sleep, D., Van Oosterhout, F., 2013. Lake responses following lanthanum-modified bentonite clay (Phoslock®) application: an analysis of water column lanthanum data from 16 case study lakes. *Water Res.* 47: 5930-5942.

Spears, B.M., Mackay, E.B., Yasseri, S., Gunn, I.D.M., Waters, K.E., Andrews, C., Cole, S., De Ville, M., Kelly, A., Meis, S., Moore, A.L., Nürnberg, G.K., van Oosterhout, F., Pitt, J.A., Madgwick, G., Woods, H.J., Lüring, M., 2016. A meta-analysis of water quality and aquatic macrophyte responses in 18 lakes treated with lanthanum modified bentonite (Phoslock®). *Water Res.* 97: 111–121.

Torres, I.C., Resck, R., Pinto-Coelho, R.M., 2007. Mass balance estimation of nitrogen, carbon, phosphorus and total suspended solids in the urban eutrophic Pampulha reservoir, Brazil. *Acta Limnol. Bras.* 19: 79-91.

Utermöhl H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9: 1-38.



Verspagen, J.M.N., Snelder, E.O.F.M., Visser, P.M., Huisman, J., Mur, L.R., Ibelings, B.W., 2004. Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension?. *J. Phycol.* 40: 260–270.

Zevenboom, W., Mur, L.R., 1984. Growth and photosynthetic response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in relation to photoperiodicity and irradiance. *Arch. Microbiol.* 139: 232-234.

Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepas, E.E., 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 8: 1-37.

## CAPÍTULO 2

---

### **Cianotoxinas e sua relação com espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas em um reservatório urbano hipereutrófico**

**Resumo:** Florações de cianobactérias representam um risco potencial à integridade dos ecossistemas aquáticos e da saúde humana. Algumas espécies podem produzir toxinas nocivas, que constituem um grande desafio para a gestão desses ecossistemas. No ambiente, várias espécies potencialmente produtoras de toxinas podem coexistir num mesmo evento de floração, e genótipos tóxicos e não-tóxicos de uma mesma espécie podem estar presentes. Neste estudo, visamos avaliar o estado atual da composição das populações de cianobactérias e a presença de cianotoxinas durante um estudo realizado no reservatório da Pampulha (Belo Horizonte, Brasil) entre abril/16 e maio/18. Nossos resultados mostraram que, apesar dos esforços realizados pela prefeitura da cidade para a reversão da eutrofização do reservatório da Pampulha, espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas ainda ocorrem e dominam em altas densidades nesse reservatório, sendo elas: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix* spp.. Mesmo que em baixas concentrações, as microcistinas estiveram presentes durante todo o período de estudo e foram correlacionadas com a presença da espécie *Microcystis aeruginosa*. Cinco análogos de saxitoxinas foram detectados (GTX1, GTX4, NeoSTX, dcSTX e STX), variando consideravelmente durante o período de estudo de acordo com a presença das espécies potencialmente produtoras dessas toxinas e das suas densidades no fitoplâncton. Nossos resultados mostraram que o gênero *Planktothrix* foi o melhor preditor da ocorrência das saxitoxinas não sulfatadas (NeoSTX e dcSTX) no reservatório da Pampulha, enquanto que, mesmo que em baixa proporção, *C. raciborskii* parece ter sido a principal produtora das saxitoxinas monossulfatadas (GTX1+GTX4). As baixas correlações encontradas entre a biomassa das cianobactérias produtoras e as concentrações de toxinas podem ser devido a fatores como: coexistência de genótipos tóxicos e não-tóxicos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes em uma mesma floração e menor produção de toxinas por cepas tóxicas devido as condições ambientais apresentadas pelo reservatório naquele momento. Este estudo demonstra que o atual estado das florações de cianobactérias do reservatório da Pampulha, com presença de toxinas, deve ser considerado uma ameaça potencial à saúde pública.

**Palavras-chave:** Eutrofização, saxitoxinas, microcistinas, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix*, reservatório da Pampulha.

## 1. Introdução

Florações de cianobactérias tóxicas estão se tornando cada vez mais frequentes e intensas em ecossistemas aquáticos em todo o mundo, causando sérias perturbações à integridade desses ambientes, prejudicando a sua qualidade de água para atividades humanas (Carmichael, 2008; Paerl e Huisman, 2009; Davis et al., 2009; Brookes e Carey, 2011). Embora as cianobactérias sejam importantes para os ambientes aquáticos, a sua alta biomassa causa vários impactos ao corpo d'água, como a redução da transparência, anoxia de camadas mais profundas, morte de peixes, perda de biodiversidade, mau cheiro e sabor da água (Reynolds, 1991; Dokulil e Teubner, 2000). Além disso, muitos gêneros podem produzir cianotoxinas nocivas, incluindo hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas, que ameaçam a saúde humana e a de outros animais (Carmichael et al., 2001; Downing et al., 2001; Codd et al., 2005).

As microcistinas são as cianotoxinas mais comumente encontradas nos ecossistemas aquáticos de água doce, seguidas das saxitoxinas (O'Neil et al., 2012). Embora haja um número crescente de estudos relativos as saxitoxinas, a sua ocorrência na água é geralmente menos investigada e, quando monitoradas juntamente com as microcistinas, são detectadas em uma menor frequência (Testai et al., 2016). As microcistinas são heptapeptídeos hepatotóxicos isolados primariamente da espécie *Microcystis aeruginosa* (Carmichael et al., 1990), embora também possam ser produzidas por vários gêneros de cianobactérias, como *Planktothrix*, *Dolichospermum* (*Anabaena*), e *Synechococcus* (O'Neil et al., 2012). Mais de 90 variantes de microcistinas são conhecidas atualmente, diferenciando-se umas das outras, por exemplo, pelas diferentes combinações de aminoácidos e por outras alterações, como a metilação ou desmetilação de grupos funcionais, que alteram o seu grau de toxicidade (Pearson et al., 2010; Buratti et al., 2017). Quanto as saxitoxinas, são alcaloides de carbamato, com efeitos neurotóxicos, pertencentes ao grupo das toxinas paralisantes de moluscos bivalves (PSTs- *paralytic shellfish toxins*). Elas podem ser produzidas tanto por alguns dinoflagelados, nos ambientes marinhos (Daranas et al., 2001), quanto por alguns gêneros de cianobactérias, nos ecossistemas de água doce (Negri e Jones, 1995; Mahmood e Carmichael, 1986; Lagos et al., 1999). Mais de 57 análogos de saxitoxinas são conhecidos, distribuídos em três grupos principais: não sulfatados (saxitoxinas- STXs), monossulfatados (goniautoxinas- GTXs) e dissulfatados (toxinas C), que possuem diferentes níveis de toxicidade e podem ser sintetizados por diferentes gêneros de cianobactérias, entre eles, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Planktothrix* (Etheridge, 2010; Wiese et al., 2010).

O aumento na frequência e na distribuição de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas tem gerado uma grande preocupação a nível mundial devido ao risco letal que as cianotoxinas apresentam à saúde humana (Davis et al., 2009). No Brasil, 52 pacientes morreram de insuficiência hepática aguda após serem submetidos à hemodiálise com água superficial contaminada com microcistinas (Azevedo et al., 2002), demonstrando o alto risco que a exposição a essas toxinas oferece à saúde humana. Por outro lado, mesmo que nenhum caso de morte ou intoxicação humana atribuída à contaminação aguda por saxitoxinas tenha sido relatado, elas podem acumular na cadeia trófica e exercer uma grande influência no ecossistema aquático (Casali et al., 2017; Vilariño et al., 2018). Embora haja um número crescente de estudos abordando a estrutura química das cianotoxinas, seu grau de toxicidade e a variação dos perfis de toxinas produzidos por cepas tóxicas isoladas de diferentes regiões geográficas (Banker et al., 1997; Lagos et al., 1999, Piccini et al., 2011), estudos que abordem a variação da produção das toxinas no ambiente natural ainda são escassos e, os fatores que levam à sua produção, pouco conhecidos (Szlag et al., 2015). Esses dados são importantes na predição de florações tóxicas e na adoção de medidas para a gestão de reservatórios eutrofizados.

O reservatório da Pampulha é um importante lago urbano localizado na cidade de Belo Horizonte, Brasil. Apesar da sua grande importância econômico-cultural, o reservatório tem sido profundamente impactado pela má qualidade da água e por constantes florações de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas desde os anos 80 (Giani, 1994; Pinto-Coelho, 1998; Figueredo e Giani, 2001; Pinto-Coelho et al., 2005a). Algumas medidas de mitigação foram realizadas pela prefeitura da cidade nas últimas décadas na tentativa de reduzir a eutrofização do reservatório. Entretanto, até o momento, nenhum desses esforços foi eficaz para a redução efetiva da carga anual de nutrientes e diminuição da dominância de cianobactérias (Figueredo e Giani, 2001; Pinto Coelho et al., 2005a, 2005b; Figueredo et al., 2016; Silva et al., 2016; Batista et al., 2018). No início da década de 1990, por exemplo, florações frequentes de *Microcystis* spp. eram observadas durante a estação seca e início da estação chuvosa (maio a dezembro) (Figueredo e Giani, 2001; Pinto-Coelho et al., 2005a). No entanto, Figueredo et al. (2016) relataram que as florações de cianobactérias que, anteriormente ocorriam apenas em poucos meses do ano, se tornaram permanentes no reservatório da Pampulha entre os anos de 2010 e 2011. De fato, estudos realizados neste sistema nos últimos anos mostraram a predominância de florações de cianobactérias durante todo o ano, principalmente de espécies potencialmente tóxicas, como *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales), *Microcystis* spp. (Chroococcales), *Planktothrix agardhii* e *P. isothrix* (Oscillatoriales) (Figueredo et al., 2016; Silva et al., 2016; Batista et al., 2018, Reis, 2019). Como consequência, é possível observar, com frequência, densas florações de

cianobactérias na coluna d'água e a presença de escumas flutuantes na superfície, além de peixes mortos, que prejudicam a funcionalidade do reservatório que é usado, atualmente, apenas para funções paisagísticas e de amortecimento de cheias.

O número crescente de estudos realizados no reservatório da Pampulha tem focado na qualidade da água e na composição sazonal das espécies de cianobactérias (Figueredo e Giani, 2001; Figueredo et al., 2016; Silva et al., 2016; Batista et al., 2018, Reis, 2019). Embora esses estudos tenham mostrado a presença de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas no reservatório, informações sobre quais toxinas ocorrem neste ambiente e suas potenciais espécies produtoras ainda não estão disponíveis. Além disso, é importante enfatizar que os cidadãos têm acesso irrestrito ao reservatório. Apesar da má qualidade da água, ainda é possível observar pessoas que pescam nesse ambiente, o que representa um grave risco à saúde pública, considerando que o grau de toxicidade das espécies encontradas no reservatório ainda é desconhecido. Isso mostra que dados sobre a composição das florações de cianobactérias e o estado atual da produção de toxinas no reservatório da Pampulha são urgentemente necessários para que medidas mais efetivas de controle da eutrofização possam ser tomadas.

O presente trabalho foi realizado no reservatório da Pampulha, durante um período no qual o reservatório estava passando por um processo de tratamento, realizado pela prefeitura de Belo Horizonte, baseado em aplicações diárias de um produto conhecido como Phoslock®, uma argila enriquecida por lantânio, cuja função é precipitar o fósforo da água e capturá-lo nos sedimentos. Nesse estudo, visamos investigar a produção de cianotoxinas nos diversos períodos do ano em relação a variação das espécies de cianobactérias presentes no reservatório da Pampulha.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Amostragem em campo e análises físico-químicas**

As amostragens no reservatório da Pampulha ocorreram mensalmente, de abril de 2016 a maio de 2018, conforme metodologia descrita no capítulo 1, onde também estão descritos os detalhes sobre as análises físico-químicas e do fitoplâncton.

As amostras de água para as análises de cianotoxinas foram coletadas a 0,5 m de profundidade com uma garrafa de Van Dorn e filtradas em filtros de fibra de vidro (GF-1, Macherey-Nagel, 0,7 µm de diâmetro de poro). Filtros e amostras filtradas foram congelados (-20 °C) até a análise.

## 2.2. Extração e análises de microcistinas intracelulares

As microcistinas intracelulares foram determinadas a partir de filtros com material sestônico congelado. A extração foi realizada por sonicação em gelo utilizando-se metanol a 75% (v/v), seguida de centrifugação (10 min, 10000 rpm). Este procedimento foi repetido mais duas vezes e os extratos foram combinados.

As análises dos níveis de microcistinas intracelulares totais foram realizadas pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (Beacon Plate Test Kit). As placas foram analisadas em um leitor de microplacas de ELISA (Bio-Tek, Elx 800) e a densidade óptica foi medida a 450 nm.

## 2.3. Extração e análises de saxitoxinas intracelulares

Para as extrações das saxitoxinas intracelulares, também se utilizaram filtros congelados. O material sestônico foi extraído três vezes por sonicação em gelo utilizando-se ácido acético 0,5 M e, em seguida, centrifugado (10 min, 10000 rpm). Os extratos obtidos a partir das três extrações foram combinados e analisados pelo método de cromatografia líquida de derivatização pós-coluna (Oshima, 1995; van de Riet et al., 2011). As amostras foram submetidas às análises de goniautoxinas (GTX 1 a GTX4) e saxitoxinas (STX, dcSTX e NeoSTX). As análises foram realizadas usando-se um sistema de HPLC (Waters Alliance 2695) acoplado com um detector de fluorescência (Waters 2475 Multi 1 Fluorescence Detector), e equipado com uma coluna C8 de fase reversa à base de sílica (Waters Symmetry). O procedimento cromatográfico foi realizado por uma eluição sob condições isocráticas, utilizando-se fases móveis específicas (fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>) para cada grupo de toxinas. Para as saxitoxinas (STX, NeoSTX, dcSTX), a fase móvel foi composta por heptanosulfonato de sódio 2mM, ácido fosfórico 30mM e 5 ml de acetonitrila para cada 100 ml de solução, o pH final foi de 7,1. Para as goniautoxinas (GTX1 a 4), a fase móvel foi composta por heptanosulfonato de sódio 2mM e ácido fosfórico 10mM, tendo o pH final de 7,1. A derivatização pós-coluna foi realizada em um forno à 85 °C, sendo o reagente oxidante composto por ácido periódico 7mM e fosfato dipotássico 50mM (pH9,0) e o reagente acidificante composto por ácido acético 0,5 M. A identificação e quantificação dos compostos foi realizada com um detector de fluorescência (Waters 2475) com excitação a 330nm e emissão a 390nm. A identificação e quantificação dos picos foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos picos e as áreas integradas de padrões analíticos certificados para saxitoxinas obtidos da CIFGA (Espanha).

## 2.4. Análises dos dados

Regressões múltiplas foram utilizadas para avaliar as relações entre as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas e as variáveis ambientais, em dados log transformados. Variáveis que apresentaram colinearidade ( $VIF > 10$ ) foram removidas individualmente durante a construção dos modelos. As análises foram realizadas através do *software* SigmaPlot 11.0 e os resultados foram interpretados ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para verificar o grau de associação entre as toxinas e a biomassa das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, foram realizadas análises de correlação. Os dados foram transformados através da raiz quadrada. As variantes de goniatoxinas, GTX1 e GTX4, foram consideradas em conjunto na análise de correlação, por serem epímeros e terem a capacidade de modificação da molécula entre elas. As duas espécies de *Plankothrix*, observadas nesse estudo, foram também analisadas em conjunto para a análise de correlação.

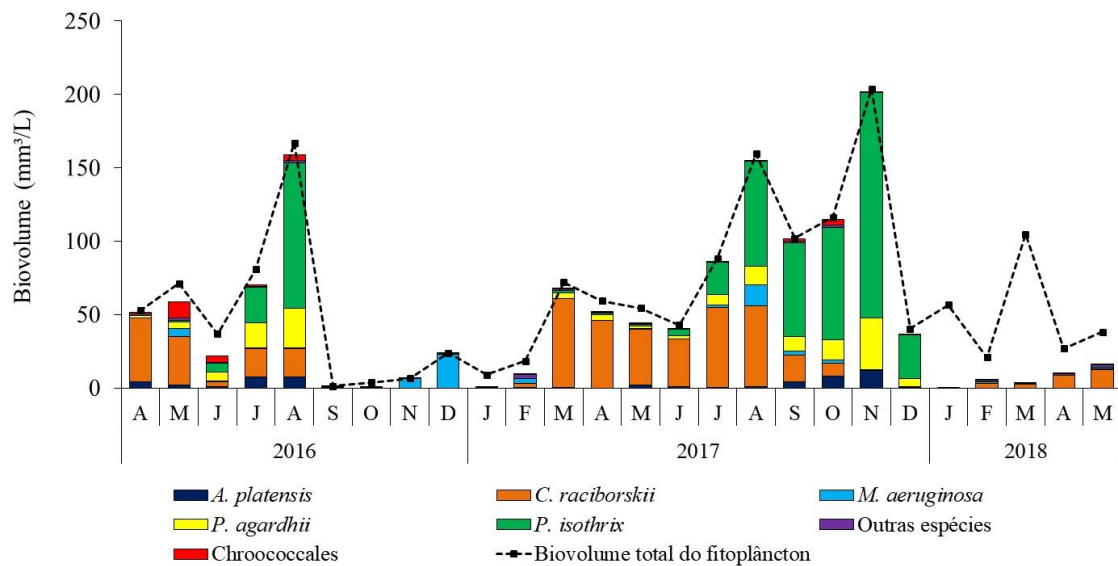
Uma análise de redundância (RDA) foi utilizada para verificar as relações entre a concentração de cianotoxinas e a biomassa das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. A análise foi realizada seguindo Borcard et al. (2011). Os dados foram log transformados antes da análise, para que a normalidade fosse atingida. A significância estatística da RDA foi avaliada pelos testes de permutação de Monte Carlo, sob 999 permutações, e as conclusões foram feitas com base no nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A análise foi feita através do *software* R, usando-se o pacote Vegan (Oksanen et al., 2013; R Development Core Team, 2013).

## 3. Resultados

### 3.1. Variações temporais das populações de cianobactérias

As cianobactérias dominaram amplamente por um período de tempo relativamente longo durante esse estudo, e a sua contribuição percentual para a biomassa total do fitoplâncton permaneceu acima de 80% na maioria dos meses (Fig. 1). Apesar da sua forte dominância, tanto a biomassa quanto a composição das espécies variaram substancialmente durante o período do estudo, apresentando uma redução em dois períodos: o primeiro ocorreu de setembro/16 a fevereiro/17, e o segundo, de dezembro/17 a maio/18. A biomassa total das cianobactérias variou de  $0 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  em janeiro/18 a  $201 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  em novembro/17. Com relação as espécies presentes, a comunidade de cianobactérias foi composta por 11 espécies, sendo que quatro delas são

conhecidas por serem potencialmente tóxicas: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *P. isothrix*.



**Figura 1.** Variação temporal da biomassa das principais espécies de cianobactérias e do biovolume total do fitoplâncton no reservatório da Pampulha, no período de estudo.

As análises de regressão múltipla mostraram que a precipitação e a zona eufótica foram as principais variáveis para prever as densidades de *Cylindrospermopsis raciborskii* ( $p < 0,001$ ). A temperatura da água, fósforo total e nitrato foram as variáveis preditoras das densidades tanto de *Planktothrix agardhii* ( $p = 0,002$ ) quanto de *P. isothrix* ( $p < 0,001$ ). Com relação a *Microcystis aeruginosa*, que ocorreu em um número menor de meses e em concentrações menores (Fig. 1), nenhuma variável analisada foi significativa na predição das densidades dessa espécie.



**Tabela 1.** Parâmetros dos modelos de regressões múltiplas das relações entre as espécies de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e as variáveis ambientais.

Variável dependente	Variáveis independentes	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t	p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	p (modelo)
<i>C. raciborskii</i>	Constante	0,0731	5,323	0,0137	0,989	0,804	0,743	<0,001
	PT	-0,718	0,822	-0,873	0,394			
	Temp.	-1,22	2,658	-0,459	0,651			
	NO3	-0,149	0,122	-1,223	0,236			
	Precip.	-0,0443	0,0203	-2,187	<b>0,041</b>			
	Zeu	-2,982	0,757	-3,939	<b>&lt;0,001</b>			
	CE	2,343	1,509	1,552	0,137			
<i>M. aeruginosa</i>	Constante	-3,515	5,517	-0,637	0,531	0,146	0	0,482
	PT	0,149	0,759	0,196	0,847			
	NH4	0,743	0,489	1,518	0,144			
	Temp.	0,582	2,852	0,204	0,84			
	NO3	0,0603	0,145	0,415	0,682			
<i>P. agardhii</i>	Constante	4,736	4,656	1,017	0,321	0,595	0,494	<b>0,002</b>
	PT	1,882	0,66	2,85	<b>0,01</b>			
	NH4	-0,176	0,509	-0,346	0,733			
	Temp.	-5,97	2,704	-2,207	<b>0,039</b>			
	NO3	0,353	0,123	2,864	<b>0,01</b>			
	Precip.	0,0128	0,0232	0,552	0,587			
<i>P. isothrix</i>	Constante	12,062	6,656	1,812	0,085	0,625	0,531	<0,001
	PT	2,019	0,944	2,139	<b>0,045</b>			
	NH4	-0,219	0,728	-0,301	0,766			
	Temp.	-11,803	3,866	-3,053	<b>0,006</b>			
	NO3	0,692	0,176	3,932	<b>&lt;0,001</b>			
	Precip.	0,0435	0,0331	1,313	0,204			

*C. raciborskii* = *Cylindrospermopsis raciborskii*, *M. aeruginosa* = *Microcystis aeruginosa*, *P. agardhii* = *Planktothrix agardhii*, *P. isothrix* = *Planktothrix isothrix*, PT = fósforo total, Temp. = temperatura da água, NO3 = nitrato, Precip. = precipitação, Zeu = zona eufótica, CE = condutividade elétrica.

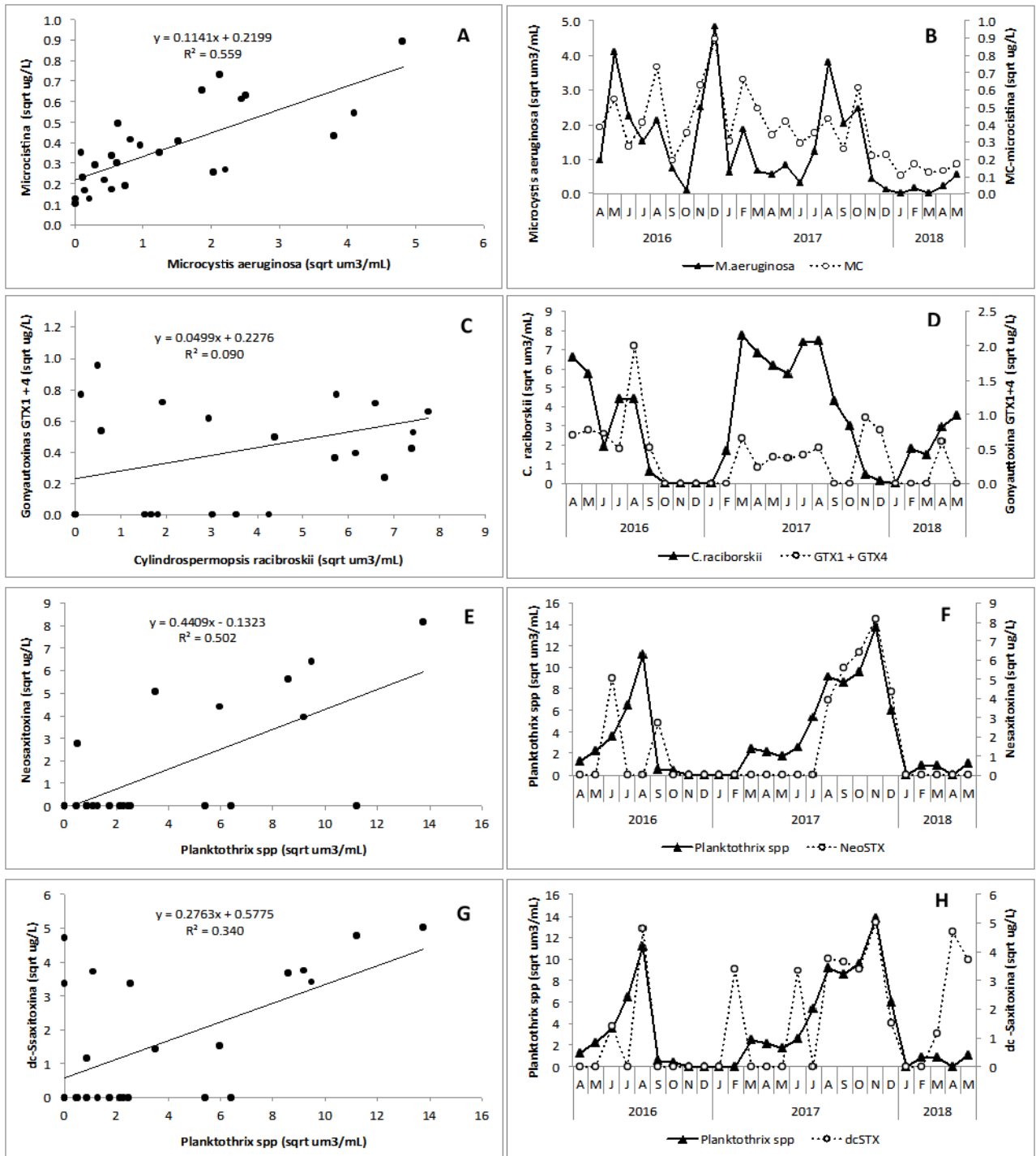
### 3.2. Variações temporais das cianotoxinas e das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas

Na figura 2 estão apresentadas as correlações entre as espécies potencialmente produtoras de cianotoxinas e as toxinas detectadas durante o nosso estudo, bem como as variações sazonais do biovolume das espécies produtoras e suas respectivas cianotoxinas, no reservatório da Pampulha. Embora as microcistinas tenham sido detectadas em todo o período de estudo, nenhuma das amostras apresentou níveis acima de 1,0 µg L<sup>-1</sup>. Suas concentrações variaram de 0,01 µg L<sup>-1</sup> (janeiro/18) a 0,80 µg L<sup>-1</sup> (dezembro/16). As maiores concentrações de microcistinas geralmente

coincideram com os períodos de maior biomassa de *Microcystis aeruginosa* (Fig. 2B), que explicou cerca de 56% da variação encontrada nas concentrações dessa toxina ( $R^2= 0,559$ ; Fig. 2A).

A ocorrência e a concentração dos diferentes análogos de saxitoxinas variaram consideravelmente durante o período de estudo. Do grupo das saxitoxinas, a dcSTX foi a mais comuns, presente em 50% das amostras analisadas, apresentando uma concentração máxima de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  em novembro/17 (Fig. 2H), que coincidiu com o período em que as espécies de *Planktothrix* dominavam no reservatório com altas biomassas. Padrão similar foi observado para NeoSTX, que foi detectada com maior concentração também em novembro/17 ( $66 \mu\text{g L}^{-1}$ ), quando *Planktothrix* sp. era dominante. Esse gênero foi responsável por 50% da variação da NeoSTX e 34% da variação da dcSTX (Fig. 2 E e G, respectivamente). A STX foi detectada em apenas 3 amostras (setembro/16, fevereiro/17 e outubro/17), sendo considerada extremamente rara no reservatório da Pampulha. A maior concentração desse análogo foi  $7 \mu\text{g L}^{-1}$ , em outubro/17 (dados não apresentados).

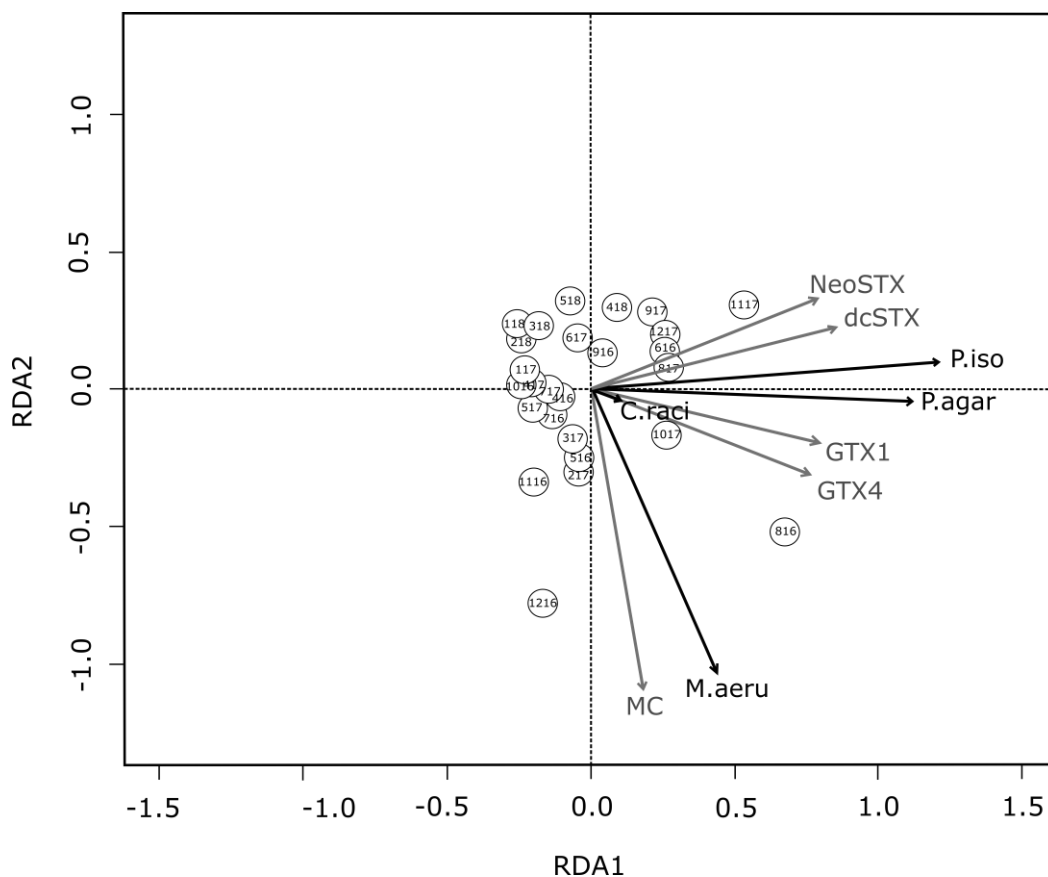
Do grupo das goniatoxinas, apenas GTX1 e GTX4 foram detectadas durante o período de estudo. Embora a variação sazonal dessas toxinas, em conjunto, tenha seguido aproximadamente o mesmo padrão de sazonalidade da biomassa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Fig. 2 D), a análise de correlação explicou apenas 9% da variação encontrada para essas toxinas ( $R^2= 0,09$ ; Fig. 2 C). Concentração baixa de toxinas em período de maior biomassa de *C. raciborskii*, como por exemplo nos meses de abril e maio/16, assim como concentrações relativamente altas de toxinas, com baixa biomassa da espécie, como nos meses de novembro e dezembro/17, devem ter contribuído para esta baixa correlação.



**Figura 2.** Correlações entre concentração de toxina e biovolume da potencial espécie produtora (A, C, E, G) e variação temporal da toxina e da potencial espécie produtora (B, D, F, H) no reservatório da Pampulha, no período de estudo (dados transformados em raiz quadrada - sqrt).

Os resultados da análise de redundância (RDA) das relações entre o biovolume das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas e as concentrações de cianotoxinas estão apresentados na Figura 3 e na tabela 2. Os dois primeiros eixos da ordenação da RDA representaram 35% da variância total, para explicar a concentração encontrada de cianotoxinas em decorrência da biomassa registrada de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. Embora a porcentagem

explicativa não foi muito elevada, o modelo da análise como um todo foi altamente significativo ( $F=3,924$ ,  $p \leq 0,001$ ). As espécies *Planktothrix agardhii* e *P. isothrix* estiveram positivamente associadas ao eixo RDA1 (Tabela 2), assim como as toxinas NeoSTX e dcSTX e, com correlação um pouco menor, GTX1 e GTX4. *C. raciborskii* mostrou estar pouco correlacionada aos eixos RDA1 e RDA2 escolhidos para representar estes resultados. Ela foi assim mesmo mantida na análise, por ser uma espécie descrita como potencialmente produtora de saxitoxinas. O eixo 1, associado as saxitoxinas, teve uma explicação mais alta para esta espécie do que o eixo 2. O eixo RDA2 foi correlacionado positivamente com as microcistinas (MC) e com *Microcystis aeruginosa*, confirmando a associação entre elas (Tabela 2).



**Figura 3.** Gráfico “triplo” da análise de redundância das relações encontradas entre as espécies de cianobactérias (setas pretas), toxinas (setas cinzas) e a distribuição das amostras (círculos: os números dentro dos círculos indicam mês e ano) no reservatório da Pampulha (abril/2016 a maio/2018). As setas indicam a direção do aumento. Os ângulos entre as variáveis refletem suas correlações (ângulos próximos a  $90^\circ$  não indicam correlação, ângulos próximos a  $0^\circ$  indicam correlação positiva alta e ângulos próximos a  $180^\circ$  indicam uma alta correlação negativa). *C.raci* = *Cylindrospermopsis raciborskii*; *M.aeru* = *Microcystis aeruginosa*; *P.agar* = *Planktothrix agardhii*; *P.iso* = *Planktothrix isothrix*; MC = microcistina; GTX4 = goniautoxina 4; GTX1 = goniautoxina 1; dcSTX = decarbamoilsaxitoxina; NeoSTX = neosaxitoxina.

**Tabela 2.** Resultados da análise de redundância para o eixo-1 (RDA1) e eixo-2 (RDA2) para as cianotoxinas e as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas.

<b>Variáveis dependentes</b>		
	<b>RDA1</b>	<b>RDA2</b>
MC	-0.0367	<b>1.0823</b>
GTX1	<b>0.6597</b>	0.0814
GTX4	<b>0.7076</b>	-0.0432
NeoSTX	<b>1.0788</b>	0.1448
dcSTX	<b>0.7778</b>	-0.1795

<b>Variáveis independentes</b>		
	<b>RDA1</b>	<b>RDA2</b>
M.aeru	-0.0199	<b>0.91660</b>
C.raci	0.0864	0.00779
P.agar	<b>0.8920</b>	0.17396
P.iso	<b>0.9725</b>	0.08368

MC = microcistina; GTX1 = goniatóxina 1; GTX4 = goniatóxina 4; NeoSTX = neosaxitóxina; dcSTX = decarbamoilsaxitóxina; M.aeru = *Microcystis aeruginosa*; C.raci = *Cylindrospermopsis raciborskii*; P.agar = *Planktothrix agardhii*; P.iso = *Planktothrix isothrix*.

#### 4. Discussão

As florações de cianobactérias têm um impacto negativo no funcionamento dos ecossistemas aquáticos de água doce e representam uma ameaça à saúde humana. O problema é ainda mais grave quando o crescimento excessivo desses organismos afeta reservatórios urbanos usados como fontes de água potável ou como áreas recreativa e de pesca, tendo em vista que várias espécies de cianobactérias têm a capacidade de produzir toxinas que tornam a água imprópria para o consumo e para recreação (Chorus e Bartram, 1999; Giani et al., 2005; Paerl e Otten, 2013). No Brasil, florações de cianobactérias potencialmente tóxicas têm se tornado muito comuns (Souza et al., 1998; Bouvy et al., 1999; Huszar et al., 2000; Molica et al., 2005; Costa et al., 2006; Figueredo e Giani, 2009; Figueredo et al., 2016). Um típico exemplo é o reservatório da Pampulha, onde a

fase avançada do processo de eutrofização culminou na dominância permanente das cianobactérias ao longo de todo o ciclo anual (Figueredo et al., 2016).

Durante o presente estudo, as populações de cianobactérias sofreram variações em termos de biomassa, composição e dominância das espécies, sendo observados declínios da sua biomassa em dois períodos distintos: o primeiro ocorreu de setembro/16 a fevereiro/17 e, o segundo, de dezembro/17 a maio/18 (Fig. 1). Conforme discutido no capítulo 1, esses resultados foram associados ao tratamento com Phoslock que estava sendo realizado no reservatório durante o período do nosso estudo.

Como esperado para ambientes eutróficos, uma baixa diversidade de espécies foi observada (Smith e Schindler, 2009) e o fitoplâncton no reservatório da Pampulha foi, em geral, dominado por uma ou poucas espécies. Das espécies de cianobactérias encontradas durante o nosso estudo, quatro delas são conhecidas por serem potencialmente tóxicas (Chorus e Bartram, 1999), sendo elas: *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales), *Planktothrix agardhii* e *P. isotrix* (Oscillatoriales) e *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales). A espécies filamentosas *C. raciborskii* e *Planktothrix* spp. foram as mais abundantes e predominantes, mantendo uma marcada alternância de dominância durante o ciclo anual, embora tenham coexistido durante alguns períodos. *C. raciborskii* foi predominante principalmente na estação seca, embora também tenha mantido populações com menor biomassa durante quase todo o restante do estudo (exceto nos períodos de quase desaparecimento total das cianobactérias – de setembro/16 a janeiro/17 e em janeiro/18). As espécies de *Planktothrix* mantiveram-se dominantes principalmente no período de transição entre as estações seca e chuvosa, porém também dominaram no início da estação chuvosa de 2017/2018. *M. aeruginosa* esteve presente, mesmo que com baixa abundância, durante quase todo o período de estudo (células isoladas de Chroococcales foram aqui consideradas), embora só tenha sido dominante no fitoplâncton em novembro e dezembro/16, quando desenvolveu florações quase que monoespecíficas, representando mais de 98% do biovolume total do fitoplâncton. Todas essas espécies já foram encontradas anteriormente no reservatório da Pampulha (Figueredo e Giani, 2001, Figueredo et al., 2016, Silva et al., 2016, Batista et al., 2018; Reis, 2019). É importante ressaltar que as variações sazonais previamente observadas para estas espécies (Batista et al., 2018; Reis, 2019), sofreram algumas alterações nos seus padrões, provavelmente em decorrência do tratamento com Phoslock. Um exemplo, é a redução relativa de biomassa de *C. raciborskii* em períodos de chuva, com relação a estudos anteriores.

No Brasil, florações de *C. raciborskii* são muito comuns, sendo, em alguns casos, persistentes ao longo de todo o ano (Figueredo e Giani, 2009; Tonetta et al., 2013; Batista et al., 2018) e, frequentemente, altas concentrações de saxitoxinas são observadas durante a dominância

desta espécie (Bouvy et al., 1999; Molica et al., 2002, Molica et al., 2005; Costa et al., 2006, Ferrão-Filho et al., 2009; Clemente et al., 2010). A espécie já foi dominante no reservatório da Pampulha durante todo o ano (Batista et al., 2018) e, mais recentemente, foi observada a sua coexistência ou uma alternância de dominância com outras espécies de cianobactérias (Silva et al., 2016, Reis, 2019). Nossos dados confirmam esta coexistência. Diferentes variantes de saxitoxinas já foram detectadas em cepas de *C. raciborskii* isoladas de reservatórios brasileiros, sendo elas: STX, NeoSTX, dcSTX, dcNeoSTX, GTX2, GTX3 e GTX5 (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Castro et al., 2004; Hoff-Risseti et al., 2013; Lopes et al., 2015).

Os gêneros *Microcystis* e *Planktothrix* também são muito comuns no Brasil (Magalhães et al., 2001; Figueredo e Giani, 2001; Azevedo et al., 2002; Bittencourt-Oliveira et al., 2012; Barros et al., 2017), sendo conhecidos mundialmente pela sua habilidade de produzirem microcistinas (Neilan et al., 2013). Embora o gênero *Planktothrix* também seja relatado na literatura como potencial produtor de saxitoxinas (Pomati et al., 2000; Wiese et al., 2010; Neilan et al., 2013), a maior parte dos estudos com esse gênero são associados a produção de microcistinas (por exemplo, Fastner et al., 1999; Christiansen et al., 2003; Kurmayer et al., 2004; Tonk et al., 2005), enquanto que informações sobre a produção de saxitoxinas por *Planktothrix* ainda são muito escassas. O primeiro relato da produção de saxitoxinas por esse gênero foi feito por Pomati et al. (2000) que, após detectarem a presença de saxitoxinas em um lago com forte dominância de *Planktothrix* (lago Verese, Itália), confirmaram a produção da toxina por esse gênero através de uma cepa isolada do mesmo lago. No Brasil, segundo o nosso conhecimento, a produção de saxitoxinas por *Planktothrix* só foi verificada, até o momento, por Lopes et al. (2015), que detectaram o análogo dcGTX em uma cepa de *Planktothrix agardhii* isolada do reservatório Sítios Novos, no Ceará. A presença de saxitoxinas no reservatório da Pampulha, em períodos de dominância de *Planktothrix*, também foi registrada por Reis (2019), em anos anteriores ao nosso estudo.

No nosso estudo, observamos grandes variações tanto nos perfis de cianotoxinas encontrados, bem como nas suas concentrações ao longo tempo. Mesmo que em quantidades vestigiais, as microcistinas foram detectadas durante todo o período de estudo, sendo fortemente correlacionadas com a biomassa de *Microcystis aeruginosa*, que se demonstrou como melhor preditora da ocorrência de microcistinas no reservatório da Pampulha. De fato, as maiores concentrações dessa toxina geralmente coincidiram com os períodos de maior biomassa de *M. aeruginosa*. A análise de correlação apresentada na figura 2A demonstra que *M. aeruginosa* foi responsável por mais da metade da variação das microcistinas. A predominância de outros gêneros produtores de microcistinas pode influenciar na relação entre as *Microcystis* e as microcistinas, como relatado por Davis et al. (2009), em um estudo em quatro lagos com florações de *Microcystis*

sp. localizados no Estados Unidos. No nosso estudo, além de *Microcystis*, encontramos duas espécies potencialmente produtoras de microcistinas, pertencentes ao gênero *Planktothrix*, que poderiam ter resultado no restante dessa variação. No entanto, embora *Planktothrix* spp. fossem altamente predominantes em certos períodos, elas não foram importantes preditoras da presença de microcistinas no reservatório da Pampulha (Fig. 3), pois concentrações muito baixas de microcistinas foram detectadas quando *Planktothrix* era dominante no fitoplâncton. Embora a espécie *Planktothrix agardhii*, encontrada em nosso estudo, seja frequentemente reportada na literatura como produtora de microcistinas (Fastner et al., 1999), estudos vêm demonstrando que a produção de toxinas por cianobactérias é altamente variável e depende dos genótipos das cepas encontrados em determinadas regiões geográficas, que podem ou não possuir os genes responsáveis pela sua produção. Por exemplo, estudos realizados por Christiansen et al. (2006) com cepas de *Planktothrix* mostraram que mutações pontuais dentro do cluster do gene *mcy*, responsável pela síntese de microcistinas, podem levar a perda na síntese da toxina, resultando em diferentes genótipos de *Planktothrix*.

Embora as microcistinas tenham sido detectadas em todo o período de estudo, é importante ressaltar que as concentrações dessa toxina no reservatório da Pampulha não excederam, em nenhuma amostra, o limite de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o máximo aceitável para a exposição crônica em reservatórios utilizados para abastecimento humano. No entanto, mesmo que em baixas concentrações e, embora o reservatório da Pampulha tenha perdido a sua função de abastecimento público ainda na década de 80, a presença de microcistinas nas suas águas representa um risco a saúde dos cidadãos que frequentam o local e que têm contato com a água (Chorus e Bartran, 1999).

Com relação as saxitoxinas, cinco variantes foram detectadas no reservatório da Pampulha durante o nosso estudo, sendo elas: as não sulfatadas (STX, NeoSTX e dcSTX) e as monossulfatadas (GTX1 e GTX4). O perfil de distribuição das saxitoxinas apresentou uma grande variação ao longo do período de estudo e, de uma forma geral, acompanhou a tendência temporal observada na biomassa dos gêneros potencialmente produtores dessas toxinas encontrados no reservatório da Pampulha (Fig. 2 D, F e H). O fato de *C. raciborskii* e *Planktothrix* spp. terem coexistido na maior parte do período de estudo, interferiu na porcentagem de explicação dos modelos de correlação dificultando, por exemplo, as interpretações de qual espécie é a principal preditora da presença de goniautoxinas no reservatório da Pampulha. No entanto, é possível perceber que as goniautoxinas seguiram quase que a mesma tendência da variação temporal observada no biovolume de *C. raciborskii* (Fig. 2 D), embora essa espécie tenha explicado apenas 9% da variação das goniautoxinas (Fig. 2 C). Na análise de RDA, é possível observar de uma



forma mais clara que a espécie *C. raciborskii* parece não ser um fator de grande importância na predição das saxitoxinas no reservatório da Pampulha no período desse estudo, e que essas toxinas apresentaram maior correlação com as espécies de *Planktothrix*, que parecem ser as principais produtoras de certas saxitoxinas no reservatório (Fig. 3). De fato, as maiores concentrações de saxitoxinas não sulfatadas (NeoSTX e dcSTX) coincidiram com os períodos de forte dominância de *Planktothrix* spp. (Fig 2 F e H). No geral, NeoSTX apresentou uma tendência de aumento na medida em que ocorreu a alternância de dominância de *C. raciborskii* para *Planktothrix* spp. no final da estação seca de 2017 e início da estação chuvosa de 2017/2018 (agosto a novembro/2017). De forma similar, dcSTX também apresentou uma tendência de aumento nos períodos de forte dominância de *Planktothrix* spp., embora alguns picos detectados dessa toxina correspondam a períodos de dominância de *C. raciborskii* (Fig. 2 H).

É interessante notar que as maiores concentrações de NeoSTX e dcSTX foram registradas em novembro/2017, quando também foi registrado o maior biovolume de *Planktothrix* spp., enquanto *C. raciborskii* foi rara. Após esse pico observado na biomassa de *Planktothrix* spp. e na produção de saxitoxinas, houve um declínio na biomassa das cianobactérias, discutido no capítulo 1, seguido da diminuição da produção das toxinas. Após essa queda, tanto das populações de cianobactérias quanto das concentrações de toxinas, NeoSTX não foi mais detectada, GTX foi detectada em abril/18 quando *C. raciborskii* era a espécie dominante e mais dois picos de dcSTX foram observados em abril e maio/2018, quando *C. raciborskii* era a espécie dominante.

A produção de cianotoxinas no ambiente natural é altamente variável e representa um grande desafio no monitoramento de ecossistemas aquáticos e na predição de florações tóxicas. Florações de cianobactérias podem ser compostas por diferentes gêneros que, por sua vez, podem produzir diferentes tipos de toxinas (Chorus e Bartram, 1999), o que dificulta as previsões das concentrações de cianotoxinas apenas a partir da abundância de uma determinada espécie potencialmente produtora identificada microscopicamente. Além disso, altas concentrações de células não indica a presença de altas concentrações de toxinas ou mesmo a sua ocorrência. No nosso estudo, observamos alguns períodos em que havia a presença das espécies potencialmente produtoras de saxitoxinas, mas nenhum análogo foi detectado. Segundo Davis et al., (2009), uma dada espécie de cianobactéria pode ter uma variedade de cepas toxigênicas e não-toxigênicas, que não podem ser distinguidas morfológicamente. Além do mais, em uma mesma floração, genótipos tóxicos e não-tóxicos de uma mesma espécie ou de espécie diferentes podem coexistir (Chorus e Bartram, 1999; Kurmayer et al., 2002; Davis et al., 2009; Dolman et al., 2012; Pimentel e Giani, 2013). Genótipos tóxicos podem, ainda, controlar a produção de toxinas, produzindo em menores

concentrações, dependendo da influência das condições ambientais ou até da idade da floração (Lyck, 2004; Pimentel e Giani, 2014; Szlag et al., 2015).

A presença de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, bem como de cianotoxinas no reservatório da Pampulha refletem o fato de que as estratégias de recuperação da qualidade das suas águas, que vem sendo realizados nos últimos anos, ainda não tiveram sucesso. O trabalho enfatiza também a importância de se acrescentar a mensuração das cianotoxinas em programas de monitoramento que envolvem apenas a avaliação de parâmetros microbiológicos e físico-químicos da água. A detecção de saxitoxinas no reservatório da Pampulha deve ser tomado como um alerta de que essas toxinas podem ser mais amplamente distribuídas em água doce do que já foi notificado e que outras espécies menos reportadas na literatura podem estar associadas a florações com altas concentrações de saxitoxinas. Nossos resultados mostraram que o gênero *Planktothrix* foi o mais importante preditor das saxitoxinas no reservatório da Pampulha. Embora esse gênero venha sendo recentemente citado na literatura como potencial produtor de saxitoxinas, são raros os estudos que mostram florações de *Planktothrix* associadas a ocorrência de saxitoxinas e muito pouco se sabe sobre quais variantes esse gênero pode produzir.

Nosso estudo oferece uma contribuição para o conhecimento sobre a presença de toxinas em lagos urbanos e eutróficos, e a sua variação sazonal em decorrência das mudanças das espécies de cianobactérias potencialmente produtoras naquele ambiente.

## 5. Referências

- Azevedo, S.M., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology* 181: 441–446.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.* 33: 613–616.
- Barros, M.U.G., Lopes, I.K.C., Carvalho, S.M.C., Capelo Neto, J., 2017. Impact of filamentous cyanobacteria on the water quality of two tropical reservoirs. *RBRH* 22: 1-11.
- Batista, A.M.M., Figueredo, C.C., Giani, A., 2018. Variability in a permanent cyanobacterial bloom: species-specific responses to environmental drivers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94: fiy197.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Dias, S.N., Moura, A.N., Cordeiro-Araújo, M.K., Dantas, E.W., 2012. Seasonal dynamics of cyanobacteria in a eutrophic reservoir (Arcoverde) in a semi-arid region of Brazil. *Braz. J. Biol.* 72: 533-544.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P., 2011. Numerical ecology with R. Use R! series. Springer Science, New York, NY, USA.

- Bouvy, M., Molica, R., de Oliveira, S., Marinho, M., Beker, B., 1999. The dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semiarid region of northeast. *Brazil Aquat. Microb. Ecol.* 20: 285–297.
- Brookes, J.D., Carey, C.C., 2011. Resilience to blooms. *Science* 334: 46-47.
- Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 91: 1049-1130.
- Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G., 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Hall, S., Strichartz, G. [Eds]. *Marine toxins, origin, structure and molecular pharmacology*, Vol. 418, American Chemical Society, Washington D.C., 87-106.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109: 663-668.
- Carmichael, W.W., 2008. A world overview – one-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria – where do we go from here? In, *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms, State of the Science and Research Needs*. H. K. Hudnell (Ed.), Springer New York. 619: 105-126.
- Casali, S.P., Santos, A.C.A., Falco, P.B., Calijuri, M.C., 2017. Influence of environmental variables on saxitoxin yields by *Cylindrospermopsis raciborskii* in a mesotrophic subtropical reservoir. *J. Water Health* 15: 509-518.
- Castro, D., Diana Vera, D., Néstor Lagos, N., Carlos García, C., Vásquez, M., 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44: 483-489.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E., 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* 185: 564-572.
- Christiansen G, Kurmayer R, Liu Q, Börner T (2006) Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 117-123
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. World Health Organization/E&FN Spon/Routledge, London.
- Clemente, Z., Busato, R.H., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Wosiack, A.C, Silva de Assis, H.C., 2010. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicon*, 55: 396-406.
- Codd, G.A., Morrison, L.F, Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203: 264-272.

- Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M. Chellappa, N.T., 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.* 66: 211-219.
- Daranas, A.H., Norte, M., Fernández, J.J., 2001. Review: Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101-1132.
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J., 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8: 715-725.
- Dokulil, M.T., Teubner., K., 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438: 1-12.
- Dolman, A.M., Rucker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., Wiedner, C., 2012. Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *Plos One* 7: e38757.
- Downing, J.A., Watson, S.B., McCauley, E., 2001. Predicting cyanobacteria dominance in lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 1905-1908.
- Etheridge, S. M., 2010. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon*, 56: 108–122.
- Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Rönicke, H., Chorus, I., 1999. Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch. Hydrobiol.* 145:147–163.
- Ferrão-Filho, A.S., Soares, M.C., Rocha, M.I.A., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M.F.O., 2009. Florações de cianobactérias tóxicas no reservatório do Funil: dinâmica sazonal e Consequências para o zooplâncton. *Oecol. Bras.* 13: 346–365.
- Figueredo, C.C., Giani, A., 2001. Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia* 445: 165–174.
- Figueredo, C.C., Pinto-Coelho, R.M., Lopes, A.M.M.B., Lima, P.H.O., Gücker, B., Giani, A., 2016. From intermittent to persistent cyanobacterial blooms: identifying the main drivers in an urban tropical reservoir. *J. Limnol.* 75: 445-454.
- Giani, A., 1994. Limnology in Pampulha Reservoir: some general observations with emphasis on the phytoplankton community. In: R.M. Pinto-Coelho, A. Giani and E. von Sperling (eds.), *Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais*. SEGRAC, Belo Horizonte, p.151-163.
- Giani, A., Bird, D., Prairie, Y., Lawrence, J., 2005. Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62: 2100-2109.
- Hoff-Rissetti, C.; Dörr, F.A.; Schaker, P.D.C.; Pinto, E.; Werner, V.R.; Fiore, M.F., 2013. *Cylindrospermopsin* and *saxitoxin synthetase* genes in *Cylindrospermopsis raciborkii* strains from Brazilian freshwater. *Plos One*, 8: e74238.

- Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S., Marinho, M., Domingos, P., Sant'Anna, C.L., 2000. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424: 67–77.
- Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., Chorus, I., 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb. Ecol.* 43: 107–118.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J., Börner, T., 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp.. *Environ. Microbiol.* 6: 831-841.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.
- Lopes, I.K.C., Barros, M.U.G., Pestana, C.J., Capelo Neto, J., 2015. Prevalence of paralytic shellfish poison-producing *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Brazilian semi-arid reservoir. *Acta Limnol. Bras.* 27: 238-246.
- Lyck, S., 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *J. Plankton Res.* 26: 727-736.
- Magalhães, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077-1085
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24: 175-186.
- Molica, R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S., Lagos, N., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycology* 41: 606-611.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A. N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4: 743–753
- Negri, A.P., Jones, G.J., 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussels *Alathrya condola*. *Toxicon* 33: 667-678.
- Neilan, B.A.; Pearson, L.A.; Muenchhoff, J.; Moffitt, M.C.; Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 15: 1239-1253.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpsons, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2013. The vegan package. <http://cran.r-project.org/>, <http://vegan.r-forge.r-project.org/>.

- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313-334.
- Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78: 528–532.
- Paerl, H.W., Huisman J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Rep.* 1: 27-37.
- Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65: 995–1010.
- Pearson, L.; Mihali, T.; Moffitt, M.; Kellmann, R.; Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* 8: 1650–1680.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S., 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10: 644–653.
- Pimentel, J. S. M., Giani, A., 2013. Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. *J. Appl. Phycol.* 25: 1545–1554.
- Pimentel, J.S.M., Giani, A., 2014. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic microcystis strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 5836-5843.
- Pinto-Coelho, R.M., 1998. Effects of eutrophication on seasonal patterns of mesozooplankton in a tropical reservoir: a 4-year study in Pampulha Lake, Brazil. *Freshwater Biol.* 40: 159-173.
- Pinto-Coelho, R.M., Giani, A., Morais-JR., C.A., Carvalho-JR., E.R., Bezerra-Neto, J.F., 2005a. The nutritional status of zooplankton in a tropical reservoir: effects of food quality and community structure. *Braz. J. Biol.*, 65: 313-324.
- Pinto-Coelho, R.M., Bezerra-Neto, J.F., Morais-Jr., C.A., 2005b. Effects of eutrophication on size and biomass of crustacean zooplankton in a tropical reservoir. *Braz. J. Biol.* 65: 325-338.
- Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* 36: 553–562.
- R Development Core Team., 2013. R Development Core Team R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Reis, L.A., 2019. Dominância de cianobactérias em um reservatório tropical hipereutrófico: aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos. Tese de doutorado (requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Reynolds, C. S., 1991. Toxic blue-green algae: the problem in perspective. *Freshwat. For.* 1: 29-38.
- Silva, T.F.G., Giani, A., Figueredo, C.C., Viana, P.S., Khac, V.T., Lemaire, B.J., Tassin, B., Nascimento, N.O., Vinçon-Leite, B., 2016. Comparison of cyanobacteria monitoring methods in a tropical reservoir by in vivo and in situ spectrofluorometry. *Ecol. Eng.* 94: 79–87.
- Smith, V.H., Schindler, D.W., 2009. Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends Ecol. Evol.* 24: 201-207.
- Souza, R.C.R., Carvalho, M.C., Truzzi, A.C., 1998. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings reservoir Brazil. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 73–81.
- Szlag, D.C., Sinclair, J.L., Southwell, B., Westrick, J.A., 2015. Cyanobacteria and cyanotoxins occurrence and removal from five high-risk conventional treatment drinking water plants. *Toxins* 7: 2198-2220.
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F.M., Enzo, E., 2016. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* 46: 385–419.
- Tonetta, D., Petrucio, M.M., Laudares-Silva, R., 2013. Temporal variation in phytoplankton community in a freshwater coastal lake of southern Brazil. *Acta Limnol. Bras.* 25: 99-110.
- Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O.F.N, Wiedner, C., Mur, L.R., Huisman, J., 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5177-5181.
- Van de Riet, J., Gibbs, R.S., Muggah, P.M., Rourke, W.A., Macneil, J.D., Quilliam, M.A., 2011. Liquid chromatography post-column oxidation (PCOXC) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: collaborative study. *J. AOAC Int.* 94: 1154-1176.
- Vilariño, N., Louzao, M.C., Aba, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2018. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins* 10: 1-38.
- Wiese, M., D'Agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs* 8: 2185-2211.

## CONCLUSÕES GERAIS

No capítulo 1, mostramos que, embora o tratamento com Phoslock não tenha sido capaz de impedir totalmente a formação de florações de cianobactérias no reservatório da Pampulha, ele alterou a composição e a biomassa do fitoplâncton durante alguns períodos. A predominância das altas biomassas das cianobactérias neste sistema provavelmente se deve ao fato de efluentes não tratados ainda chegarem ao reservatório pelos principais tributários e, na estação chuvosa, a poluição difusa aumenta, levando a uma piora na qualidade da água. Esses resultados reforçam a premissa de que o tratamento com Phoslock sozinho provavelmente não será capaz de promover uma recuperação rápida e sustentável de um reservatório com um longo histórico de contaminação por fósforo, como é o caso do reservatório da Pampulha. O Phoslock se mostrou eficaz na mitigação temporária de alguns sintomas da eutrofização, através dos sinais de melhorias observados na diminuição da biomassa de cianobactérias, diversificação do fitoplâncton e aumento da transparência da água, visualizados em alguns períodos. Isso sugere que produtos como o Phoslock só serão efetivos a longo prazo se medidas de intervenção forem realizadas em toda a bacia visando controlar os aportes de fósforo que ainda entram no reservatório da Pampulha.

No segundo capítulo, mostramos que o fitoplâncton do reservatório da Pampulha é dominado predominantemente por espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, sendo elas: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *P. isoethrix*. Dentre as cianotoxinas encontradas durante o nosso estudo, as microcistinas foram as mais frequentes. Mesmo que em baixas concentrações, as microcistinas foram detectadas em todas as amostras e as maiores concentrações dessa toxina geralmente coincidiram com os períodos de dominância de *M. aeruginosa*, que foi responsável por cerca de 56% da variação encontrada para as microcistinas. Com relação as saxitoxinas, cinco variantes foram detectadas: as saxitoxinas (STX, NeoSTX, dcSTX) e as goniautoxinas (GTX1 e GTX4). *Planktothrix* spp. se correlacionou com os análogos NeoSTX e dcSTX, que tiveram uma tendência de aumento quando esse gênero era dominante no fitoplâncton. As goniautoxinas (GTX1+GTX4) tiveram uma tendência similar de variação sazonal apresentada pelo biovolume de *C. raciborskii*, embora essa espécie só tenha explicado 9% da variação dessas toxinas. As discrepâncias entre a biomassa das cianobactérias e as concentrações de toxinas podem ter resultado nas fracas correlações encontradas entre biovolume de espécies potencialmente produtoras e concentrações de toxinas. Isso pode ser parcialmente devido ao fato que, em uma mesma floração, genótipos e não-tóxicos coexistem. Além disso, cepas toxigênicas poderiam estar produzindo toxinas em menores concentrações, em respostas as condições ambientais apresentadas pelo reservatório da Pampulha naquele momento.



A presença das cianobactérias potencialmente tóxicas e das suas toxinas no reservatório da Pampulha adiciona um nível de complexidade maior para a gestão bem-sucedida das florações de cianobactérias nesse ambiente. Devido a variação sazonal das espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas no reservatório da Pampulha e dos fatores que levam a produção de toxinas por cepas toxigênicas, a toxicidade das florações é difícil de ser prevista apenas por análises limnológicas convencionais, mostrando a necessidade de monitoramentos que incluam análises das toxinas e das espécies potencialmente produtoras.